



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS
ÁREA BIOLOGÍA

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“Plasticidad de la inervación simpática uterina:
Contribución de la respuesta inflamatoria
y la matriz extracelular”**

Lic. Paola Bianchimano

LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS CLEMENTE ESTABLE

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Mónica Brauer

TRIBUNAL

Dra. Patricia Cassina

Dra. Silvia Olivera

Dra. Giselle Prunell

RESUMEN	3
INTRODUCCION.....	5
I ANTECEDENTES GENERALES	5
I.2 <i>Inervación simpática del útero: orígenes, rutas y distribución</i>	6
I.3 <i>Plasticidad fisiológica de la inervación simpática del útero</i>	8
I.4 <i>Papel del estrógeno</i>	9
I.5 <i>Papel del efector</i>	10
I.6 <i>Moléculas que regulan las repuestas de la inervación simpática al estrógeno</i>	10
I.7 <i>Posible participación de otras señales y mediadores</i>	13
¿Por qué estudiar la inflamación?	13
¿Por qué estudiar la matriz extracelular?	14
II HIPOTESIS Y OBJETIVOS	15
II HIPOTESIS Y OBJETIVOS	15
CAPITULO I. INFLAMACION	16
I ANTECEDENTES PARTICULARES	17
I.1 <i>La inflamación como componente clave en procesos neurodegenerativos</i>	17
I.1.1 <i>Efectos en el Sistema Nervioso Central</i>	17
I.1.2 <i>Efectos en el Sistema Nervioso Periférico</i>	19
I.2 <i>Glucocorticoides</i>	20
I.2.1 <i>Los glucocorticoides son los antiinflamatorios más potentes conocidos</i>	20
I.2.2 <i>Los niveles elevados de glucocorticoides asociados con la respuesta al estrés antagonizan los efectos del estrógeno sobre la reproducción</i>	22
I.3.1 <i>Eicosanoides y sus enzimas de síntesis</i>	24
I.3.2 <i>Inhibidores de la síntesis de eicosanoides como antiinflamatorios</i>	26
II ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	29
II.1 <i>Modelo animal</i>	29
II.2 <i>Inhibición farmacológica del proceso inflamatorio</i>	29
II.3 <i>Evaluación del efecto anti-inflamatorio</i>	30
II.4 <i>Efectos sobre la inervación uterina y la infiltración de eosinófilos</i>	30
III MATERIALES Y MÉTODOS	31
III.1 <i>Animales</i>	31
III.2 <i>Tratamientos con estrógeno</i>	31
III.3 <i>Tratamiento con antiinflamatorios</i>	31
III.4 <i>Obtención y preparación de los tejidos</i>	32
III.5 <i>Inmunohistoquímica</i>	33
III.6 <i>Evaluación de los efectos de los tratamientos sobre la inervación</i>	33
III.7 <i>Conteo de leucocitos eosinófilos</i>	37
III.8 <i>Análisis estadístico</i>	37
IV RESULTADOS	38
IV.1 <i>Tratamientos a largo plazo</i>	38
IV.1.1 <i>Efectos generales</i>	38
IV.1.2 <i>Efectos sobre el útero</i>	39
IV.1.3 <i>Efectos sobre los nervios simpáticos</i>	43
IV.2 <i>Tratamientos a corto plazo</i>	47
IV.2.1 <i>Efectos generales</i>	47
IV.2.2 <i>Efectos sobre el útero</i>	48
IV.2.3 <i>Efectos sobre los nervios simpáticos</i>	49
V DISCUSION	53
V.1 <i>Acciones generales de los tratamientos</i>	53
V.2 <i>Efectos tróficos sobre el útero</i>	54
V.2.1 <i>Estrógeno y Dexametasona</i>	54
V.2.2 <i>Inhibición de las vías de procesamiento del ácido araquidónico</i>	56
V.3 <i>Efectos sobre la infiltración de leucocitos eosinófilos</i>	57
V.4 <i>Efectos del estrógeno y la dexametasona sobre la inervación simpática uterina</i>	59
V.5 <i>La inhibición de las vías de procesamiento del ácido araquidónico no afecta la degeneración de la inervación uterina inducida por estrógeno</i>	63
V.6 <i>Eosinófilos y la neurodegeneración simpática del útero</i>	66
V.6.1 <i>Eosinófilos y semaforinas</i>	67

CAPITULO II. MATRIZ EXTRACEULAR	69
I ANTECEDENTES PARTICULARES	70
I.1 La matriz extracelular en el guiado axonal	70
I.2 Algunos componentes de la MEC se encuentran alterados en diferentes condiciones patológicas en el sistema nervioso central y periférico.	72
I.3 La matriz extracelular uterina se remodela en respuesta a las hormonas sexuales	75
II ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	79
II.1 El Método de Criocultivo	79
II.2 Sustrato uterino	79
II.3 Neuronas simpáticas	79
II.4 Análisis del crecimiento neurítico	80
III MATERIALES Y METODOS	81
III.1 Animales	81
III.2 Ovariectomía y tratamientos	81
III.3 Criocultivo	82
III.3.1 Obtención de cortes	82
III.3.2 Obtención de explantos	83
III.3.3 Condiciones de cultivo	83
III.4 Visualización del crecimiento neurítico	83
III.5 Análisis del crecimiento neurítico	84
III.5.1 Miometrio	84
III.5.2 Endometrio	86
III.6 Evaluación de la migración celular	86
III.7 Análisis estadístico	87
IV RESULTADOS	88
IV.1 Influencia del sustrato uterino en el patrón de crecimiento neurítico simpático in vitro	88
IV.1.1 Puesta a punto de la técnica	88
IV.1.2 Análisis del patrón de crecimiento neurítico en criocultivo	90
IV.1.3 Células no-neuronales	94
IV.2 Crecimiento neurítico sobre cortes de tejido uterino provenientes de ratas tratadas con estrógeno	96
IV.2.1 Miometrio	96
IV.2.2 Endometrio	99
IV.3 Respuesta de las neuronas adultas al sustrato uterino	101
IV.3.1 Miometrio	101
IV.3.2 Endometrio	102
IV.4 Efecto del NGF en el crecimiento neurítico simpático de explantos adultos sobre sustratos estrogenizados	104
IV.5 Participación del colágeno fibrilar	106
V DISCUSION	108
V.1 El sustrato uterino sustenta el crecimiento neurítico simpático en cultivo	108
V.2 El sustrato miometrial contribuye a establecer el patrón organotípico de inervación simpática	108
V.3 Las células no neuronales ganglionares no contribuyen al direccionamiento de las neuritas en cultivo en el miometrio	110
V.4 El tratamiento con estrógeno restringe el crecimiento neurítico sobre miometrio	111
V.5 El estrógeno reduce el crecimiento neurítico sobre sustrato endometrial	111
V.6 Papel del colágeno	113
CONCLUSIONES & PERSPECTIVAS	116
REFERENCIAS	120
ANEXO. PUBLICACIONES	137

Resumen

La innervación simpática uterina sufre procesos cíclicos de degeneración y regeneración dirigidos por fluctuaciones naturales en los niveles de estrógeno en la circulación sanguínea; constituyendo uno de los ejemplos más remarcables de plasticidad fisiológica en el sistema nervioso autónomo maduro. Esta influencia del estrógeno es mediada a través de cambios en las propiedades neuritogénicas del tejido uterino, e implica un desbalance en la producción de señales con efectos positivos y negativos para el crecimiento de los nervios simpáticos.

Como ha demostrado ser el caso en otras condiciones fisiopatológicas, actualmente comprendemos la neurodegeneración iniciada en la innervación del útero por la acción del estrógeno como un fenómeno bajo una regulación multifactorial que involucra la participación de diversos mediadores celulares y moleculares, cuyas funciones recién comienzan a ser comprendidas.

En otros modelos de plasticidad fisiopatológicos y experimentales, distintas líneas de evidencia señalan como reguladores o desencadenantes al proceso inflamatorio y las señales moleculares pertenecientes o asociadas a la matriz extracelular. En este contexto, surge como hipótesis que la respuesta inflamatoria y las señales no difusibles pertenecientes al sustrato participarían en la regulación de la plasticidad de la innervación simpática uterina iniciada por el estrógeno.

Es conocido que en el útero, el estrógeno induce una respuesta inflamatoria caracterizada por vasodilatación, edema, acumulación de fluido en la cavidad uterina e infiltración de leucocitos eosinófilos. La inflamación se asocia con un aumento en la producción de distintos mediadores, algunos de los cuales han mostrado tener efectos deletéreos sobre neuronas y terminales en el sistema nervioso central y periférico. Sin embargo, una posible asociación entre la respuesta inflamatoria y la neurodegeneración simpática inducida por el estrógeno en el útero no ha sido estudiada hasta el momento. Para evaluar el posible rol de la inflamación en nuestro modelo, utilizamos un abordaje farmacológico *in vivo*. Se evaluó el efecto de la administración de estrógeno a corto y largo plazo; y la capacidad de distintos antiinflamatorios de contrarrestar los efectos de la hormona sobre las terminales simpáticas uterinas. En una primera instancia, se utilizó el glucocorticoide dexametasona como inhibidor general de la respuesta inflamatoria. En una segunda etapa, se inhibieron de forma selectiva las distintas vías de procesamiento del ácido araquidónico, con el fin de evaluar una posible participación de los eicosanoides. Los principales hallazgos obtenidos en esta etapa fueron que: (I) Además de mostrar efectos proneuritogénicos propios, la dexametasona redujo significativamente el impacto neurodegenerativo del estrógeno sobre los nervios simpáticos del útero. (II) El efecto de la dexametasona no fue mimetizado por la inhibición de las distintas vías de procesamiento del

ácido araquidónico. (III) Se observó una correlación espacio-temporal entre la infiltración de leucocitos eosinófilos al tejido uterino y la pérdida de terminales simpáticas, demostrándose que solamente los tratamientos con estrógeno que provocaron infiltración eosinofílica provocaron también neurodegeneración. Complementariamente, solamente dexametasona, el único antiinflamatorio que logró prevenir el reclutamiento de leucocitos eosinófilos al tejido uterino logró impedir el efecto neurodegenerativo del estrógeno.

Por su parte, las señales pertenecientes al sustrato, incluyendo componentes intrínsecos de la matriz extracelular, han mostrado jugar un papel clave durante el desarrollo del sistema nervioso y en la regulación de fenómenos de plasticidad en la vida adulta. En el útero, la expresión de la gran mayoría de los componentes de la matriz extracelular es regulada por las hormonas sexuales; aunque el impacto de esta regulación sobre las propiedades neuritogénicas del tejido uterino no ha sido analizado anteriormente.

Utilizando la técnica de criocultivo, que permite evaluar la contribución de los componentes del sustrato en el crecimiento neurítico y migración celular logramos determinar que: (I) El crecimiento neurítico simpático es altamente influenciado por las características histológicas del sustrato uterino. (II) El tratamiento con estrógeno a donantes de sustrato inhibe el crecimiento neurítico simpático sobre miometrio y endometrio uterino. (III) Las neuronas simpáticas neonatales y adultas responden de manera similar a las señales presentes en el sustrato uterino, y a las alteraciones producidas en el mismo por el estrógeno. (IV) El NGF es capaz de modular la respuesta de las neuronas adultas al endometrio estrogenizado, pero no afectan la inhibición establecida en el miometrio. (V) El colágeno emerge como un candidato interesante en la regulación de estos procesos.

Tomados en su conjunto, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que tanto la respuesta inflamatoria como los cambios que produce el estrógeno en el sustrato uterino contribuyen a disminuir la capacidad neuritogénica observada en el útero en respuesta a la hormona. El proceso inflamatorio y el sustrato uterino surgen así del presente trabajo como dos nuevos actores dentro del complejo conjunto de mediadores que contribuyen a la regulación de la plasticidad de la innervación uterina.

Creemos que los avances realizados en nuestro modelo podrían aportar información relevante para la comprensión de los mecanismos que subyacen a otros procesos neurodegenerativos periféricos. Consideramos también que los resultados surgidos de esta Tesis pueden aportar a la comprensión de los mecanismos que regulan las alteraciones en la innervación uterina observada en ciertas patologías ginecológicas como la miomatosis, endometriosis y adenomiosis, y de esa manera contribuir al diseño de herramientas diagnósticas y estrategias terapéuticas para estas patologías.

Introducción

I ANTECEDENTES GENERALES

II.1 Anatomía del útero

En los roedores, el útero está formado por dos cuernos que convergen en el cuerpo uterino, el cual se continúa en el cuello uterino, que comunica con la vagina. En un corte transversal del cuerno uterino (Fig. 1), se puede observar que el mismo está compuesto por dos compartimentos principales, miometrio y endometrio. El miometrio consta de una capa externa denominada capa muscular longitudinal (LML) en la que las fibras musculares lisas se disponen de forma paralela al eje mayor del cuerno, y una capa más interna en la que las fibras musculares se orientan de forma concéntrica rodeando el endometrio (capa muscular circular, CML). La capa muscular longitudinal se extiende hacia uno de los lados formando el tejido parametrial o mesometrio, en cuyo extremo lateral se encuentran la arteria y la vena uterina. El endometrio consta de una mucosa bien desarrollada conteniendo múltiples glándulas tubulares, originadas a partir del epitelio endometrial. Adyacente al endometrio se encuentra una capa de epitelio monoestratificado que recubre la luz del órgano.

El útero recibe innervación simpática y parasimpática que regula de forma conjunta la contracción/relajación del miometrio, el tono vascular, y la secreción glandular; e innervación sensorial que envía información al sistema nervioso central y modulan la transmisión autónoma. De esta forma la innervación uterina participa de la regulación de funciones reproductivas como el transporte de espermatozoides y blastocistos, la acomodación del feto y la activación de contracciones que conducen al parto ([Papka & Traurig, 1993](#); [Traurig & Papka, 1993](#)).

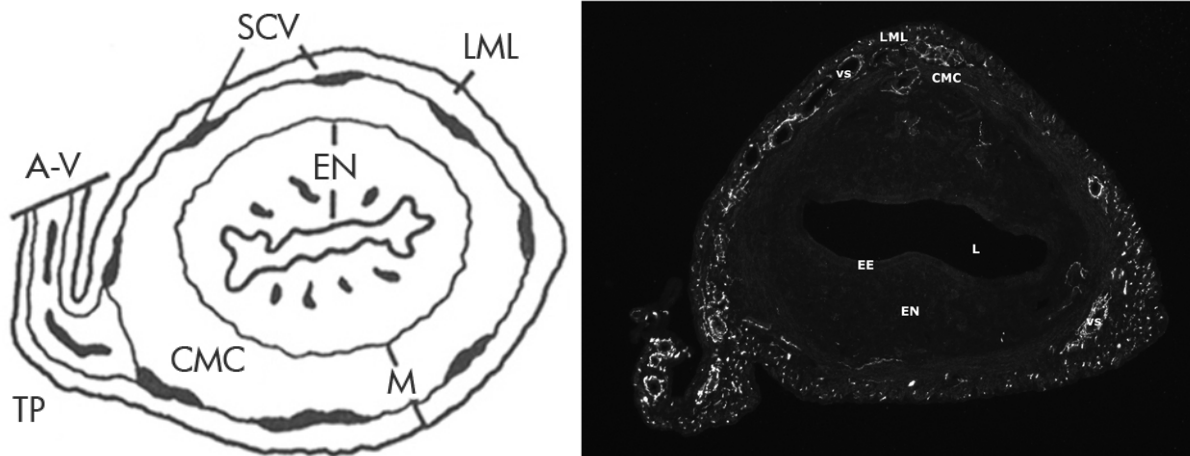


Figura 1. Anatomía del cuerno uterino de la rata y distribución de la innervación simpática. Panel izquierdo: Representación esquemática de un corte transversal de cuerno uterino de rata. Panel derecho: Corte transversal del cuerno uterino de la rata mostrando la distribución de las fibras simpáticas inmunomarcadas para tirosina hidroxilasa. LML: capa miometrial longitudinal. CC: capa miometrial circular. M: miometrio. EN: endometrio. SCV: septo conjuntivo-vascular. TP: tejido parametrial. A-V: arteria-vena uterina. vs: vaso sanguíneo. EE: epitelio endometrial.

I.2 Innervación simpática del útero: orígenes, rutas y distribución

La innervación simpática del útero y cuello uterino de los mamíferos proviene de neuronas postganglionares ubicadas en ganglios simpáticos pre- y para-vertebrales; aunque la contribución relativa de los distintos ganglios presenta importantes variaciones entre especies (Fig. 1) (Houdeau et al., 1998; Papka & Traurig, 1993; Rosengren & Sjöberg, 1967; Vera et al., 1997). En la rata, la porción cefálica del cuerno uterino recibe la mayor parte de su innervación simpática desde la región tóraco-lumbar de la cadena paravertebral y el ganglio prevertebral suprarrenal, a través del plexo nervioso ovárico. También recibe una pequeña contribución de los ganglios prevertebrales celíaco y aórtico-renal (Vera et al., 1997; Houdeau et al., 1998), (Fig. 1). La porción caudal del cuerno uterino y el cuello reciben innervación de la cadena simpática, principalmente de la región lumbar, a través de los nervios espláncnicos, los cuales conectan posteriormente con los hipogástricos. Existe asimismo una pequeña contribución de los ganglios mesentérico inferior y suprarrenales, así como de las neuronas del plexo pélvico (Vera et al., 1997; Houdeau et al., 1998). Estos distintos orígenes y rutas permiten un control región-específico de la motilidad uterina, que se postula podría ser de gran relevancia funcional.

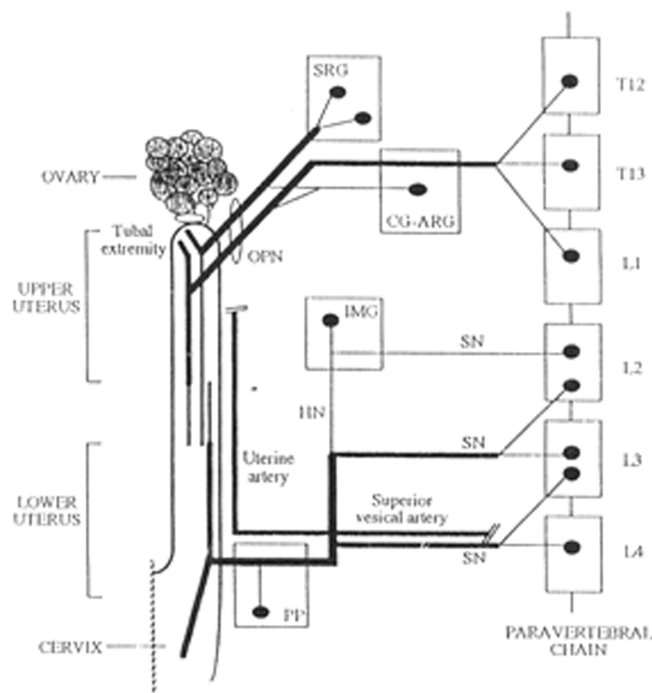


Figura 2. Esquema de los orígenes y rutas de las fibras simpáticas de proyección al útero. El grosor de las líneas indica la contribución relativa de cada fuente. Sólo las fuentes principales de la cadena paravertebral están representadas. Las fibras nerviosas que alcanzan la región superior del útero surgen del plexo nervioso ovárico (OPN) y se originan principalmente en los ganglios paravertebrales T12-L1 y el ganglio suprarrenal (SRG). Las proyecciones nerviosas a la región inferior del útero y el cuello pasan a través del plexo pélvico (PP) y se originan principalmente en los ganglios paravertebrales L2-L4. La mayor parte de estos axones vienen de nervios espláncnicos (SN) y atraviesan el ganglio mesentérico inferior (IMG) para conectarse con los nervios hipogástricos (HN). CG: ganglio celíaco, ARG: ganglio aórtico-renal. Modificado de [Houdeau et al., 1998](#).

Como se ilustra en la figura 1, las fibras simpáticas ingresan al útero a través del mesometrio, acompañando vasos sanguíneos o en forma de haces aislados. Dentro del cuerno uterino se distribuyen rodeando los vasos sanguíneos y en asociación con el miometrio, normalmente siguiendo la dirección de las fibras musculares lisas. El endometrio, en cambio, se encuentra pobremente innervado, aunque algunas fibras terminales son observadas en asociación con las arterias radiales. La innervación miometrial presenta importantes variaciones regionales. En la rata, la mayor parte de las fibras simpáticas en la región caudal se encuentran en la capa circular, particularmente en la región cercana al mesometrio. En la región cefálica, en cambio, las fibras simpáticas son más abundantes en la capa muscular longitudinal, encontrándose más densamente innervado el borde anti-mesometrial que las regiones mesometrial y laterales ([Chávez-Genaro et al., 2002](#); [Gnanamanickam & Llewellyn-Smith, 2011](#); [Melo & Machado, 1993](#); [Owman & Stjernquist, 1988](#); [Thorbert, 1979](#)).

I.3 Plasticidad fisiológica de la innervación simpática del útero

Durante la edad reproductiva, la innervación simpática uterina sufre procesos cíclicos de degeneración y regeneración que son iniciados por fluctuaciones naturales en los niveles de hormonas sexuales (particularmente estrógeno) en la circulación sanguínea. Este modelo constituye así uno de los ejemplos más remarcables de plasticidad fisiológica en el sistema nervioso autónomo maduro ([revisado en Brauer & Smith, 2015; Brauer, 2016](#)).

En la rata, la innervación simpática del cuerno uterino alcanza su máximo desarrollo en la etapa prepuberal, donde se observa un plexo vascular y capa muscular longitudinal ricamente innervados (Fig. 2). En respuesta a los cambios hormonales que acompañan la transición peripuberal se observa una disminución sustancial en la densidad de innervación miometrial, manteniéndose constante la densidad de innervación perivascular ([Brauer et al., 1992; Chávez-Genaro et al., 2002](#)). Entre el período peripuberal y la vida adulta se reduce aún más la densidad de fibras simpáticas no-vasculares en el cuerno uterino ([Brauer et al., 1992](#)). El patrón de innervación alcanzado en la rata madura no es definitivo, sino que continúa fluctuando durante toda la vida reproductiva. Así en las etapas de dominancia estrogénica del ciclo estral (estro y proestro) se produce un descenso significativo en la densidad de innervación simpática miometrial. Estos cambios constituyen una pérdida de fibras nerviosas, resultado de procesos neurodegenerativos a nivel de las terminales ([Zoubina & Smith 2000](#)).

Finalmente, el transcurso normal de la gestación implica una profunda remodelación del tejido uterino que incluye un aumento sustancial del tamaño del órgano, el cual es acompañado de una pronunciada reducción en la innervación simpática. Al igual que en el ciclo estral, esta disminución en la densidad de innervación ocurre como consecuencia de un proceso de degeneración de las terminales ([Sporrong et al., 1978](#)). Este fenómeno de neurodegeneración selectiva se ha demostrado en todas las especies de mamífero, incluyendo a los humanos ([Bell & Malcolm, 1988; Chávez-Genaro et al, 2002; Haase et al., 1997; Moustafa, 1988; Owman & Stjernquist, 1988; Thorbert, 1979](#)). El proceso de recuperación luego del parto es lento e incompleto en el cobayo ([Thorbert et al., 1979](#)), sin embargo, en la rata se ha demostrado a presencia de fibras simpáticas intrauterinas tan pronto como 7 días post-parto ([Bianchimano et al., 2007](#)).

I.4 Papel del estrógeno

Diversos estudios señalan al estrógeno como la hormona clave en los procesos de remodelación de la innervación simpática uterina en la hembra no gestante, pudiendo inhibir el crecimiento e inducir la degeneración de fibras nerviosas maduras.

En la rata, el tratamiento agudo con dosis suprafisiológicas de estrógeno en el período prepuberal provoca una disminución en la innervación simpática del músculo liso uterino tanto a nivel del cuerno como del tejido parametrial, sin afectar la innervación perivascular. Al mismo tiempo, los niveles de noradrenalina disminuyen en el cuerno uterino y se mantienen constantes en el tejido parametrial ([Brauer et al., 1995](#)). La misma dosis de estrógeno, administrada en un tratamiento crónico de inicio temprano, tiene un impacto aun mayor en la innervación simpática uterina. Así, la innervación miometrial desaparece por completo en el cuerno uterino. La innervación de los vasos intrauterinos es más fina mientras que la innervación vascular en el tejido parametrial no se ve afectada. Consistentemente, los niveles de noradrenalina en el cuerno bajan más que luego del tratamiento agudo ([Brauer et al., 1995](#)).

Cuando los mismos protocolos de administración de estrógeno son aplicados a ratas adultas, el impacto sobre la innervación es menor, sugiriendo que las fibras simpáticas inmaduras son más vulnerables que las maduras a los cambios en el entorno hormonal. Así, en ratas adultas ovariectomizadas, la administración aguda de estrógeno provoca, a las 24 horas, un marcado descenso en la densidad y cantidad total de fibras miometriales, sin afectar las perivasculares ([Zoubina et al., 2001](#)). Este efecto del estrógeno mimetiza lo que ocurre durante las etapas de dominancia estrogénica en el ciclo natural ([Zoubina et al., 1998](#)). En este caso, la administración crónica del tratamiento (niveles de estrógeno sostenidos similares a los observados al final de la gestación) no provoca cambios mayores, apoyando la idea de que las fibras maduras son menos sensibles que las fibras nerviosas en desarrollo.

El papel clave jugado por el estrógeno en la remodelación de la innervación simpática se vio ulteriormente sustentado por observaciones realizadas en ratones mutantes para el receptor de estrógeno alfa, los cuales presentan una hiperinnervación simpática miometrial, no muestran cambios en la innervación durante el ciclo estral y son insensibles a la acción neurodegenerativa del estrógeno ([Zoubina & Smith, 2001](#)). Tanto el miometrio como sus neuronas simpáticas de proyección expresan este subtipo de receptor ([Rabin et al., 1990](#); [Zoubina & Smith, 2002](#)) y son por lo tanto sensibles a la acción de la hormona.

I.5 Papel del efector

Estudios *in vivo* e *in vitro* señalan que el efector miometrial juega un papel clave en la regulación de la remodelación de su innervación en respuesta al estrógeno. Por ejemplo, cuando se transplanta miometrio proveniente de ratas prepúberes a la cámara anterior del ojo de ratas adultas ovariectomizadas, el mismo es reinervado según un patrón organotípico por neuronas del ganglio cervical superior (SCG), las cuales normalmente innervan el iris y otros efectores cefálicos (Brauer et al., 2000). Si el mismo ensayo es realizado utilizando miometrio previamente estrogenizado, el grado de reinervación es menor, y se observa una mayor proporción de haces nerviosos y una menor proporción de fibras terminales (aumento de la fasciculación), (Brauer et al., 2002). Finalmente, si se transplanta miometrio prepúber y el tratamiento con estrógeno es administrado a los animales hospederos, la reinervación no ocurre, aunque la innervación del iris no se ve afectada (Brauer et al., 2000), sugiriendo que el estrógeno actúa sobre el miometrio transplantado y no sobre las neuronas del SCG.

Una línea de evidencia complementaria proviene de ensayos de co-cultivo de SCG con miometrio uterino. Los mismos mostraron que mientras las neuronas extienden neuritas hacia un explanto de miometrio obtenido de ratas ovariectomizadas, el crecimiento neurítico es menor cuando se utiliza miometrio proveniente de ratas tratadas con estrógeno o cuando la hormona es agregada al medio en el co-cultivo (Krizsan-Agbas & Smith, 2002).

Conjuntamente, las evidencias aportadas por estos estudios demuestran que el estrógeno es capaz de modificar la capacidad neuritogénica del tejido uterino, afectando la innervación de manera indirecta, a través de cambios en el efector miometrial. Estos hallazgos dieron origen a una serie de estudios tendientes a identificar la naturaleza de las señales moleculares producidas por el miometrio estrogenizado y que regulan su innervación simpática (revisado en Brauer & Smith, 2015; Brauer, 2016).

I.6 Moléculas que regulan las repuestas de la innervación simpática al estrógeno

Inicialmente se evaluó si la denervación provocada por el estrógeno se debía a una disminución en el tejido uterino de la producción de factores neurotróficos con acciones proneuritogénicas sobre los nervios simpáticos. Estos estudios mostraron que los niveles uterinos de NGF (*Nerve Growth Factor*) y NT-3 (neurotrofina-3) no se reducen en respuesta al estrógeno, tanto en roedores sexualmente inmaduros como en hembras ovariectomizadas (Björling et al., 2002; Chávez-Genaro et al., 2002; Chalar et al., 2003). Al término de la gestación se produce un aumento en los niveles de NGF total, como resultado de la

acumulación de formas precursoras de la neurotrofina ([Lobos et al., 2005](#)); aunque esto no ha sido descrito en respuesta al tratamiento con estrógeno.

La expresión de BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) aumenta luego de la administración de estrógeno a ratas adultas castradas ([Krizsan-Agbas et al., 2003](#)). Esto resulta relevante, dado que fue demostrado a partir de ensayos funcionales *in vitro* que el BDNF producido por el miometrio estrogenizado es inhibitorio para el crecimiento neurítico simpático ([Krizsan-Agbas et al., 2003](#)).

Estudios de nuestro laboratorio demostraron en el útero de la rata la presencia de algunos miembros de la familia de las semaforinas (Semas), incluyendo a tres miembros secretados del grupo 3 (Semas 3A, 3F, 3G). En particular la expresión de Sema3F, que tiene acciones selectivas sobre los nervios simpáticos, aumenta más de 5 veces luego del tratamiento crónico con estrógeno a ratas prepúberes ([Richeri et al., 2011](#)). También se ha descrito que los niveles de Sema3A aumentan en el miometrio uterino en respuesta al estrógeno ([Richeri et al., 2008](#)), así como en el útero humano al término del embarazo ([Marzioni et al., 2004](#)).

Finalmente, un estudio de expresión génica a gran escala identificó el gen de la neurotrimina (Ntm) como un blanco inducido en respuesta al estrógeno en el miometrio de la rata. Ntm es una proteína de adhesión neural, capaz de inhibir el crecimiento de axones simpáticos en cultivo. Resulta interesante que la síntesis de Ntm aumenta en las fases del ciclo estral de dominancia estrogénica, así como en respuesta a la administración exógena de la hormona ([Krizsan-Agbas et al., 2008](#)).

En suma, estos resultados señalan la participación del tejido uterino en la modulación de su innervación simpática. La disminuida capacidad neuritogénica observada en el miometrio estrogenizado no ha logrado asociarse con la disminución de factores tróficos proneuritogénicos. Contrariamente, la evidencia disponible apunta a un incremento en la producción de una variedad de señales inhibitorias con efectos potencialmente redundantes para los nervios simpáticos. En vista de la regulación multifactorial de esta plasticidad, surge la posibilidad de que otros mecanismos y moléculas estén involucrados en este proceso neurodegenerativo.

En base a distintas líneas de evidencia que señalan la participación protagónica de los mediadores inflamatorios y de las señales no-difusibles del sustrato en la regulación de otros modelos de plasticidad fisiológicos y patológicos ([Amor et al., 2010, 2014](#); [Antoniou et al., 1996](#); [Celesia et al., 1991](#); [de Luca et al., 2014](#); [Gardner & Habecker, 2013](#); [Gavazzi et al., 1996](#);

[McGeer & McGeer, 2011, 2013; Miao et al., 2014; Wang et al., 2007; Fawcett, 2015](#)), surgió en nuestro grupo el interés por analizar la hipótesis de que los mediadores inflamatorios y los componentes de la matriz extracelular podrían asimismo contribuir a regular el proceso de remodelación de la inervación simpática del útero en respuesta al estrógeno.

I.7 Posible participación de otras señales y mediadores

¿Por qué estudiar la inflamación?

El proceso inflamatorio se asocia con un aumento en la producción de distintos mediadores tales como los metabolitos del ácido araquidónico, citoquinas, quimioquinas, óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, muchos de los cuales tienen efectos deletéreos sobre neuronas y terminales en el sistema nervioso ([Amor et al., 2010, 2014](#); [Heneka et al., 2015](#); [McGeer & McGeer, 2011, 2013](#); [Wang et al., 2007](#)).

En el útero, el estrógeno provoca una marcada respuesta inflamatoria caracterizada por vasodilatación, edema del endometrio y miometrio, acumulación de fluido en la cavidad uterina, e infiltración de distintos tipos de leucocitos ([Rhen et al 2003](#); [Stewart et al 1983](#)). Esta respuesta inflamatoria es parte de la fisiología normal del útero, participando de la regulación de distintos procesos tales como la menstruación, la gestación y el parto. Se ha descrito la participación de diversos mediadores celulares como macrófagos, neutrófilos, linfocitos T reguladores, células dendríticas, mastocitos y células NK (asesinas naturales); así como de mediadores moleculares, entre los que se encuentran citoquinas, quimioquinas, interleuquinas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y mediadores lipídicos ([Jabbour et al., 2009](#); [van Mourik et al., 2009](#); [Zenclussen & Hämmerling, 2015](#)).

Existe un particular interés por comprender los mecanismos activos durante la gestación temprana, donde el establecimiento de una respuesta inflamatoria finamente regulada, es fundamental para la implantación y el desarrollo posterior de una gestación exitosa ([Jabbour et al 2009](#); [Mor et al., 2012](#); [Zenclussen & Hämmerling, 2015](#)). La implantación requiere de una regulación bidireccional, en la que las células del trofoblasto secretan factores que atraen células NK y macrófagos, los cuales a su vez secretan citoquinas, quimioquinas y factores angiogénicos que controlan la remodelación del endometrio y lo preparan para recibir al feto ([Helige et al 2014](#)). Además de participar de la remodelación tisular y vascular, el sistema inmune tiene que compatibilizar la protección contra infecciones con la tolerancia al feto semiallogénico. Los linfocitos T reguladores son los principales mediadores celulares en el establecimiento de dicha tolerancia ([Aluvihare et al. 2004](#); [Zenclussen, 2005](#)).

A pesar del interés en el estudio del proceso inflamatorio en el útero, un posible vínculo entre la respuesta inflamatoria y la remodelación de las terminales simpáticas observadas en respuesta al estrógeno no ha sido estudiado hasta el momento. Abordar esta posibilidad constituye uno de los objetivos de esta Tesis.

¿Por qué estudiar la matriz extracelular?

La matriz extracelular (MEC) provee un soporte físico imprescindible para el crecimiento de los axones y contiene además moléculas capaces de influenciar la migración neuronal así como el crecimiento y ramificación de los axones. El patrón espacio-temporal de expresión de los diferentes componentes de la MEC es dinámico, y se modifica en los distintos estadios del desarrollo, en la vida adulta y en el envejecimiento ([Antoniou et al., 1996](#); [Gavazzi et al., 1996](#); [Watanabe et al., 1997](#)). Estas señales también juegan un papel muy relevante en las lesiones del sistema nervioso y ciertas enfermedades neurodegenerativas ([Antoniou et al., 1996](#); [Celesia et al., 1991](#); [de Luca et al., 2014](#); [Gardner & Habecker, 2013](#); [Miao et al., 2014](#); [Wang et al., 2007](#); [Fawcett, 2015](#)).

En términos generales, algunos componentes de la matriz extracelular tales como la laminina, la fibronectina y el colágeno son promotores del crecimiento axónico ([Anton et al., 1994](#); [de Curtis, 1991](#); [Lentz et al., 1997](#); [Raper & Tessier-Lavigne, 1999](#)). Otras moléculas tales como los condroitín-sulfato proteoglicanos (CSPG) son generalmente inhibitorios ([Becker & Becker, 2002](#); [Landolt et al., 1995](#); [Margolis & Margolis, 1997](#); [Schmalfeldt et al., 2000](#); [Snow et al., 2001](#)). Finalmente, otras moléculas como la netrina, la relina y la tenascina pueden atraer o repeler los axones en forma contexto-dependiente ([Porcinatto, 2006](#)).

En el útero, la expresión de la gran mayoría de los componentes constitutivos de la matriz extracelular muestra una expresión regulada por las hormonas sexuales ([Cidado et al., 1990](#); [Fazleabas et al., 1997](#); [Hjelm et al., 2002](#); [Pastore et al., 1992](#); [Russo et al., 2009](#); [Salgado et al., 2009a, b](#); [Shynlova et al., 2004](#)).

En este contexto, proponemos que los cambios inducidos por el estrógeno en la matriz extracelular uterina podrían afectar su capacidad de sustentar su inervación simpática.

II HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

La respuesta inflamatoria y los cambios que produce el estrógeno en la matriz extracelular uterina contribuyen a reducir la capacidad del útero de sustentar su inervación simpática.

OBJETIVO GENERAL

Profundizar en la comprensión de los mecanismos que regulan la remodelación de la inervación simpática del útero en respuesta al estrógeno.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1 - Estudiar la posible contribución del proceso inflamatorio a la degeneración simpática inducida por el estrógeno en el útero de la rata.

1.1 - Evaluar en qué medida la inhibición farmacológica de la respuesta inflamatoria es capaz de antagonizar el proceso de neurodegeneración.

1.2 - Analizar la participación de los distintos metabolitos del ácido araquidónico en este fenómeno.

Objetivo 2 – Estudiar la capacidad de la matriz extracelular uterina de regular el crecimiento neurítico simpático.

2.1 – Determinar la influencia del sustrato uterino en el establecimiento del patrón organotípico de inervación.

2.2 – Analizar si el sustrato uterino estrogenizado modifica su habilidad de sustentar el crecimiento neurítico simpático.

2.3 - Analizar si la respuesta a las alteraciones del sustrato uterino son detectadas de manera similar por las neuronas simpáticas neonatales y adultas.

2.4 - Determinar la capacidad del NGF de modular la respuesta de las neuronas simpáticas a las señales asociadas al sustrato uterino.

2.5 - Avanzar en la identificación de los componentes de la matriz extracelular que podrían participar en la regulación del crecimiento neurítico simpático, en particular aquellos que son regulados en su síntesis o distribución tisular por el estrógeno.

CAPITULO I

Inflamación

I ANTECEDENTES PARTICULARES

La respuesta inflamatoria es una reacción compleja del sistema inmune innato, que ocurre en tejidos vascularizados en respuesta a un estímulo nocivo. La misma se caracteriza por acumulación de leucocitos y proteínas plasmáticas en el sitio dañado, e implica la participación de múltiples mediadores inflamatorios entre los que se destacan citoquinas, aminas vasoactivas y metabolitos derivados del ácido araquidónico. La inflamación tiene un rol de protección frente al daño y reparación del tejido, aunque la imposibilidad de neutralizar el estímulo desencadenante puede derivar en el establecimiento de una respuesta inflamatoria crónica capaz de exacerbar el daño tisular.

I.1 La inflamación como componente clave en procesos neurodegenerativos

I.1.1 Efectos en el Sistema Nervioso Central

En el año 1987, un estudio pionero mostró la presencia de microglía reactiva en la corteza cerebral y el hipocampo de pacientes con enfermedad de Alzheimer, que coincidía con la localización de placas seniles, la característica histopatológica más notable de la enfermedad ([McGeer & McGeer 1987](#)). Este trabajo constituyó la primer publicación implicando una respuesta inmune innata endógena en un proceso neurodegenerativo en el sistema nervioso central (SNC) (Revisado en [McGeer & McGeer 2011, 2013](#)).

En la actualidad, es ampliamente reconocido que el establecimiento de una respuesta inflamatoria crónica es un elemento común a una gran variedad de procesos neurodegenerativos en el SNC, tales como Enfermedad de Parkinson (PD), Alzheimer (AD), Esclerosis lateral amiotrófica (ALS), Esclerosis múltiple (MS), Enfermedad de Huntington (HD), isquemia cerebral, lesión traumática de cerebro y médula espinal, infecciones neurotróficas; e incluso desórdenes como la depresión mayor y la esquizofrenia. Si bien estos procesos patológicos tienen orígenes y características diversas; en todos ellos se observa activación de la glía residente; producción de mediadores como citoquinas, quimioquinas, mediadores lipídicos, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) y factores tróficos. Al menos en algunos casos, también se observa infiltración de componentes celulares y moleculares del sistema inmune periférico, tanto innato como adaptativo ([Amor et al. 2010, 2014](#), [Heneka et al., 2015](#); [McGeer & McGeer, 2011, 2013](#); [Tansey & Goldberg, 2010](#)).

Más aún, tanto en el Parkinson como en el Alzheimer, existe evidencia de que el proceso inflamatorio sería parte de la patogénesis de la enfermedad, y no solamente un sistema pasivo

activado de forma secundaria al proceso patológico en curso ([Amor, et al. 2010, 2014](#); [Heneka, et al 2015](#); [Tansey & Goldberg, 2010](#)). Por ejemplo, algunos resultados que argumentan a favor de una etiología oxidativa-inflamatoria de la enfermedad de Parkinson son que tanto el líquido cefalorraquídeo como el cerebro de los pacientes contienen evidencia de la acumulación de citoquinas (incluyendo citoquinas proinflamatorias claves como IL-1 β , IL-6, TNF α), activación de la vía inflamatoria NF- κ B (Factor Nuclear kappa B) y proteínas con daño oxidativo ([Tansey & Goldberg, 2010](#)). Estos efectos son reproducidos en muchos modelos animales de la enfermedad. Así, la expresión de niveles elevados de α -sinucleína humana en ratones es suficiente para promover la activación de la microglía, infiltración de linfocitos B y T, y aumento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias; seguidos de la muerte de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra ([Theodore et al 2008](#)).

Las placas seniles, cuya acumulación caracteriza a la enfermedad de Alzheimer (AD), están compuestas principalmente de péptido β amiloide (A β), proteína tau fosforilada, microglia activada, astrocitos y neuronas en proceso de degeneración ([Dickson et al 1988](#), [Hickman et al 2008](#)). Se ha planteado una hipótesis inflamatoria para el origen de la AD, la cual propone que un insulto inicial quizás exacerbado por factores genéticos, causaría un daño neuronal inicial, generando detritos celulares que resultarían difíciles de eliminar para la microglía. Esta situación resultaría en la activación de la microglía y de la cascada clásica de activación del complemento. Los productos tóxicos de esta respuesta inflamatoria provocarían más muerte neuronal, generando un ciclo de inflamación-muerte neuronal que sería responsable de la progresión de la enfermedad ([McGeer & McGeer, 1998](#)). Ha sido demostrado que el propio péptido A β es capaz de activar la microglia y la cascada del complemento ([Rogers et al., 1992](#)). La activación de la microglia en respuesta al péptido A β , promueve la producción de citoquinas pro-inflamatorias y fagocitosis de A β . Durante el transcurso de la enfermedad, sin embargo, el fenotipo de la glía cambia hacia un predominio del efecto pro-inflamatorio y la secreción de citoquinas, y una disminución de la capacidad fagocítica y degradación de A β , lo que contribuye a la progresión de la patología ([Hickman et al., 2008](#)).

En el caso de la lesión traumática de médula espinal, la activación de la respuesta inflamatoria se produce en respuesta al daño mecánico, con el objetivo de eliminar restos celulares y facilitar la recuperación. La inhibición de esta respuesta inflamatoria impide la regeneración. Sin embargo, la infiltración de la microglía en la zona dañada, con la consiguiente acumulación de citoquinas pro-inflamatorias puede exacerbar el daño primario al tejido y constituir -junto con la isquemia- una fuente de daño secundario. La administración del antiinflamatorio metil-prednisolona, un glucocorticoide sintético, es el tratamiento de elección actual para la lesión aguda de médula espinal. Y se ha probado que su utilización reduce la muerte neuronal y

degeneración axonal en la lesión, al tiempo que evita la pérdida de vasos sanguíneos (con la consiguiente isquemia-hipoxia que también contribuye al daño secundario), reduce la infiltración de microglía a la zona dañada y disminuye la expresión de mediadores inflamatorios como iNOS, IL-1 β , y MCP-1 y estos efectos se acompañan de una recuperación funcional (Tang et al., 2015).

I.1.2 Efectos en el Sistema Nervioso Periférico

También en el sistema nervioso periférico existen ejemplos de situaciones inflamatorias que resultan en la alteración de la innervación de distintos efectores. Tal es el caso de la artritis reumatoidea, un proceso inflamatorio crónico y progresivo que compromete la integridad de las articulaciones. En esta patología, la inflamación articular se correlaciona con una menor presencia de fibras simpáticas en el tejido sinovial (Miller et al., 2000; Schaible & Straub 2014). La pérdida de terminales simpáticas provoca un desbalance que favorece a la innervación sensorial, lo que favorece la transmisión de dolor y la consolidación del proceso inflamatorio.

La hipersensibilidad bronquial característica del asma también se asocia con una remodelación de la innervación del músculo liso de las vías aéreas. También en este caso, la evidencia disponible señala que la respuesta inflamatoria es la responsable de establecer el vínculo entre la exposición temprana a un insulto desencadenante y la remodelación de la innervación autónoma y sensorial mediante la activación y reclutamiento de células inmunes productoras de sustancias neurotróficas (Durcan et al, 2006; Maddox et al. 2002; Patel et al., 2014).

Finalmente, en algunas patologías ginecológicas como la endometriosis se han reportado alteraciones en la innervación uterina asociadas con el establecimiento de condiciones inflamatorias. La endometriosis es una patología dependiente de estrógeno, caracterizada por la presencia de focos de tejido endometrial viable en localizaciones ectópicas. Aunque el origen de la patología no es comprendido en detalle, es sabido que existen alteraciones en la respuesta inmunitaria que llevan al establecimiento de una respuesta inflamatoria crónica e ineficiente, incapaz de eliminar los focos de endometrio ectópico, al punto que actualmente se considera a la endometriosis como una condición inflamatoria pélvica (Bruner-Tran et al., 2014). De relevancia en el contexto de la presente tesis, ha sido descrito que los focos endometrióticos se encuentran ricamente innervados por fibras sensoriales y autónomas, y que incluso el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis se encuentra anormalmente innervado (Tokushige et al., 2006, 2007). También en este caso la evidencia disponible apunta a un posible vínculo entre la inflamación pélvica y las alteraciones en la innervación (Tran et al., 2009).

I.2 Glucocorticoides

I.2.1 Los glucocorticoides son los antiinflamatorios más potentes conocidos.

Los glucocorticoides (GCs) naturales son hormonas esteroideas que participan en la regulación de múltiples aspectos de la fisiología de los vertebrados con el fin de asegurar el mantenimiento de la homeostasis ([Torres Uchoa et al., 2014](#)). Las mismas son producidas por la corteza de las glándulas suprarrenales, bajo control del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA). Además de ser producidos de forma circadiana, la exposición a distintos factores de estrés provoca la activación del eje, actuando a nivel del hipotálamo ([Sundhal et al., 2015](#)).

Los glucocorticoides regulan acciones anti- y pro-inflamatorias del sistema inmune durante la respuesta inflamatoria, y actualmente se reconoce que las elevaciones circadianas y ultradianas de corticoides son necesarias en todas las fases del desarrollo de una respuesta inmunitaria ([Busillo & Cidlowski., 2013](#)). Sin embargo, un rol fundamental de los corticoides endógenos es contrarrestar los efectos pro-inflamatorios adrenérgicos, suprimiendo la respuesta inmune.

En concordancia con esta función anti-inflamatoria de los glucocorticoides endógenos, los corticoides sintéticos son utilizados en la clínica como antiinflamatorios e inmunosupresores. Debido a los múltiples procesos fisiológicos regulados por los GCs, su utilización en la clínica tiene como limitante la aparición de diversos efectos adversos en algunos casos severos, tales como diabetes, osteoporosis e hipertensión. A pesar de las dificultades planteadas por la utilización de GCs, los mismos siguen siendo ampliamente utilizados para el tratamiento de algunas patologías inflamatorias como el asma y la artritis, dado que son los antiinflamatorios más potentes disponibles ([Stahn & Buttgeriet., 2008](#)). Como se mencionara anteriormente, e interesante desde la perspectiva de la presente tesis, el glucocorticoide metil-prednisolona es actualmente el tratamiento de elección en la lesión traumática de médula espinal, implicando a los corticoides en la supresión de la respuesta inflamatoria en un contexto en el que el proceso inflamatorio compromete la integridad de tejido nervioso ([Tang et al., 2015](#)). A nivel molecular, los efectos de los glucocorticoides son mediados a través de una variedad de mecanismos tanto genómicos como no genómicos (Cuadro I, Fig. 3).

Cuadro I: Múltiples mecanismos de acción de glucocorticoides

Los efectos de los glucocorticoides son mediados a través de su unión a receptores de glucocorticoides (GR), pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción dependientes de ligando. Consistente con su participación en la regulación de múltiples y diversos procesos fisiológicos, se ha reportado la expresión de receptores de glucocorticoides en prácticamente todos los tipos celulares del organismo ([Sundhal et al., 2015](#), [Stahn & Buttgereit, 2008](#)).

El complejo receptor-ligando se une a secuencias específicas en el ADN denominadas GRE (elementos de respuesta a GCs, por su sigla en inglés), modulando positiva o negativamente de forma directa la transcripción de genes conteniendo la secuencia en su región promotora. Este mecanismo directo es el implicado en la síntesis de algunas proteínas anti-inflamatorias como IL-10, anexina-1 (lipocortina-1), I κ B (inhibidor de NF- κ B), MKP-1 (mitogen-activated kinase phosphatase 1), y GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper) ([Stahn & Buttgereit, 2008](#)); aunque no es el principal mecanismo por el que los GC regulan la respuesta inflamatoria.

Dependiendo de la presencia de sitios de unión para otros factores de transcripción y la organización particular de la región promotora de cada gen, pueden existir fenómenos de cooperación o competencia entre los GRs y otros factores de transcripción en la regulación de algunos genes (sitios compuestos o competitivos). Los GRs también pueden modular la expresión de algunos genes de forma indirecta, a través de interacciones proteína-proteína con otros factores de transcripción (*tethering*), cooperando o inhibiendo su actividad. Por otra parte, pueden competir con otros factores de transcripción por cofactores necesarios para la transcripción. Estos mecanismos son clave en la supresión de la respuesta inflamatoria ([Stahn & Buttgereit, 2008](#)).

Las moléculas pro-inflamatorias liberadas durante la inflamación inician cascadas de señalización que culminan en la activación de varios factores de transcripción entre los que se destacan las familias de factores de transcripción AP-1 y NF- κ B ([Busillo & Cidlowski, 2013](#)). A su vez, AP-1 y NF- κ B regulan la transcripción de múltiples genes pro-inflamatorios, propagando de esa forma la respuesta inflamatoria.

Uno de los principales efectos anti-inflamatorios de los GC es interferir con la actividad transcripcional de AP-1 y NF- κ B. Los GRs pueden unirse tanto a AP-1 como a NF- κ B, bloqueando su actividad transcripcional directamente o a través del reclutamiento de proteínas intermediarias ([Busillo & Cidlowski, 2013](#)). También se ha descrito en algunos promotores la presencia de sitios compuestos, conteniendo GREs asociados a sitios de unión para AP-1, y esta es otra forma en la que los GRs interfieren con la actividad de AP-1. Como se mencionara anteriormente los GRs también interfieren con la actividad transcripcional de NF- κ B promoviendo la expresión de su inhibidor I κ B ([Auphan et al., 1995](#)); y con AP-1 promoviendo la expresión de la fosfatasa MKP-1, que desfosforila la quinasa JNK, la cual es necesaria para la activación de AP-1 ([Wang et al., 2008](#)).

Por otra parte, se han descrito distintos mecanismos de acción no-genómicos para los glucocorticoides. Luego de la unión al ligando, el GR citosólico o proteínas disociadas del complejo del que forma parte, pueden interactuar con proteínas citosólicas, y alterar cascadas de señalización intracelular ([Stahn & Buttgereit, 2008](#)). Por ejemplo, la dexametasona inhibe la activación de PLA₂ (fosfolipasa A₂) y liberación de ácido araquidónico inducidas en respuesta al factor de crecimiento epidérmico, efecto que sería mediado por la fosforilación de lipocortina-1 (inhibidor de la actividad de PLA₂) por la quinasa Src liberada del complejo citosólico que acompaña GR ([Croxtall et al., 2000](#)).

Una estrategia que permite asegurar la rapidez de la respuesta inflamatoria es la presencia de un reservorio de mensajeros inestables para algunas proteínas pro-inflamatorias. Los estímulos inflamatorios estabilizan estos mensajeros mediante la activación de la vía de la MAPK p38 (proteína quinasa activada por mitógenos p38), efecto que es bloqueado por los glucocorticoides ([Lasa et al., 2001](#)). El ARNm de la enzima ciclooxigenasa-2 es un ejemplo de este mecanismo de regulación.

En suma, existen múltiples mecanismos moleculares asociados a la acción de los glucocorticoides, la mayoría de los cuales han sido directamente implicados en la regulación de la respuesta inflamatoria. Esta multiplicidad de mecanismos, en conjunto con la expresión relativa de los distintos subtipos existentes del receptor, la regulación de su actividad, presencia de co-factores, tipo y disponibilidad de ligando, permiten una regulación muy fina, tejido-específica y altamente dependiente de contexto de los efectos biológicos de estos esteroides.

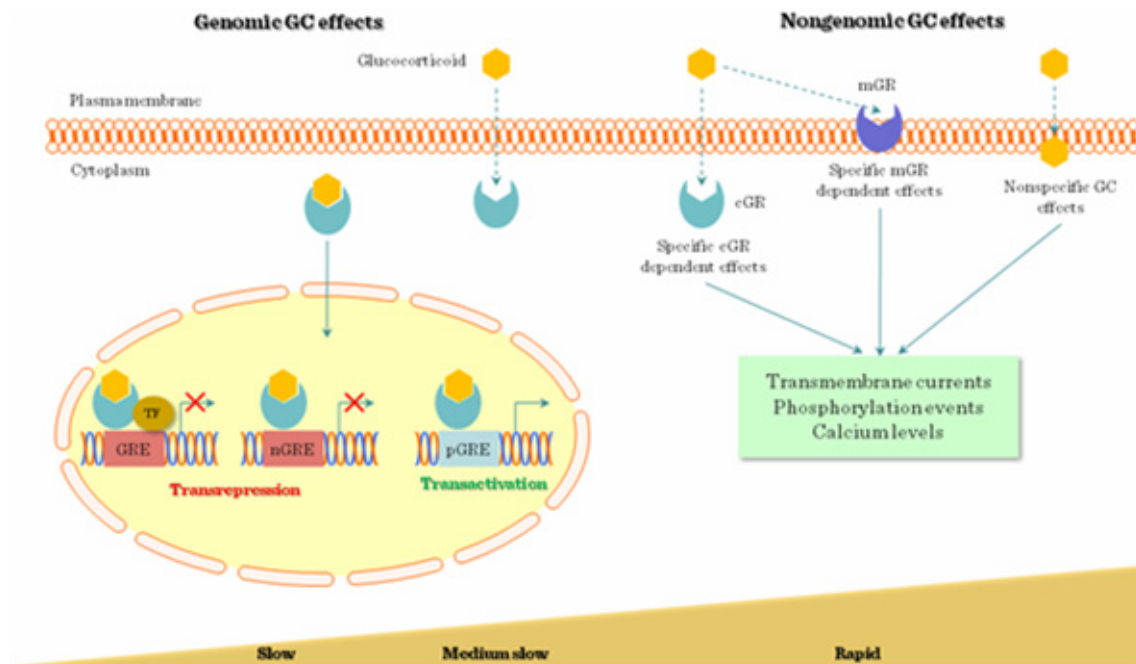


Figura 3. Representación esquemática de los mecanismos de acción de los glucocorticoides cGR receptor citosólico de glucocorticoides. mGR receptor de glucocorticoides de membrana. GRE elemento de respuesta a glucocorticoide. nGRE GRE negativo pGRE GRE positivo. TF factor de transcripción. Tomado de: http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Jelatvitel_en_book/images/dia70.png

1.2.2 Los niveles elevados de glucocorticoides asociados con la respuesta al estrés antagonizan los efectos del estrógeno sobre la reproducción

La función reproductiva en los mamíferos es regulada por la producción de hormonas sexuales gonadales, en particular estrógeno y progesterona en las hembras; cuya secreción es regulada por el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (HHG). Es sabido que existe comunicación entre los ejes hipotálamo-hipofisario-adrenal y gonadal, y que en condiciones homeostáticas los glucocorticoides producidos por el eje HHA participan de la regulación de múltiples aspectos de la reproducción actuando sobre el eje HHG. Así, los corticoides regulan el comienzo de la pubertad, la producción y liberación de esteroides sexuales que en las hembras orquestan el ciclo sexual y la ovulación, y participan de la regulación inmune necesaria para una concepción

y gestación exitosas ([Macfarland & Mann, 1977](#); [Peppler & Jacobs, 1976](#); [Shi et al., 2011](#); [Whirlledge & Cidlowski 2010, 2013a](#)).

Es un hecho reconocido que la exposición a distintos tipos de estrés compromete la función reproductiva tanto en hembras como en machos. Estos efectos pueden ser mimetizados por la administración de hormona adreno-corticotrópica (ACTH) o GCs, demostrando que el efecto del estrés está dado por la activación del eje HHA y consiguiente producción de glucocorticoides ([Harvey et al. 1987](#), [Herrenkohl, 1979; 1986](#); [Politch et al., 1984](#); [Smith et al., 2000](#)).

Diversas líneas de evidencia demostraron que estos efectos del estrés son mediados por la supresión del eje HHG en múltiples puntos de regulación ([Breen et al 2008](#); [Gore et al., 2006](#); [Hayashi et al., 1990](#) ; [Kilen et al., 1996](#) ; [Matteri et al., 1984](#)). Además de sus efectos sobre el eje HHG, se han descrito efectos directos de los GCs sobre el útero. En particular, los GCs son capaces de antagonizar el efecto del estrógeno sobre el crecimiento y diferenciación del tejido uterino ([Gunin et al., 2001](#); [Rabin et al., 1990](#); [Stewart et al., 1983](#)).

I.3 Vías de procesamiento del ácido araquidónico en procesos neurodegenerativos

I.3.1 Eicosanoides y sus enzimas de síntesis

El procesamiento del ácido araquidónico por distintos sistemas enzimáticos resulta en la producción de mediadores lipídicos como prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) y leucotrienos (LTs), colectivamente denominados eicosanoides (Cuadro II, Fig. 4). Distintos eicosanoides han sido asociados con funciones anti- y pro-inflamatorias, participando tanto del inicio como de la resolución de la respuesta inflamatoria. A pesar de esta dualidad, algunos mediadores han sido inequívocamente asociados al establecimiento o progresión de algunos procesos inflamatorios, e incluso implicados en patologías inflamatorias en el sistema nervioso central.

La principal PG sintetizada en el cerebro es PGD₂, la cual participa de la regulación del sueño y la percepción del dolor. PGD₂ y su serie de prostaglandinas derivadas PGJ₂ (PGJ₂, Δ12-PGJ₂ y 15d-PGJ₂) se encuentran elevadas en una variedad de procesos degenerativos en el SNC tales como enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y lesión traumática de cerebro entre otros; así como en modelos animales de estas enfermedades ([Figueiredo-Pereira et al 2015](#)). Estas prostaglandinas han mostrado ser neurotóxicas *in vitro*, y la delección o modulación farmacológica de algunos de sus receptores y enzimas de síntesis tienen efectos beneficiosos en algunos modelos ([Arnaud et al., 2009](#); [Metcalf et al., 2012](#); [Mohri et al., 2007](#)).

Los efectos neurotóxicos de estas prostaglandinas se relacionan con su capacidad de interferir con la vía ubiquitina-proteasoma y la función mitocondrial; y es sabido que al menos algunos de sus efectos biológicos están mediados por la reacción de estas prostaglandinas altamente electrofílicas con diversas proteínas celulares, formando aductos proteicos no funcionales y potencialmente tóxicos ([Arnaud et al., 2009](#); [Metcalf et al., 2012](#); [Figueiredo-Pereira et al., 2015](#)). PGD₂ se encuentra elevada en pacientes con AD, mientras que tanto la enzima de síntesis HPGD2 como el receptor DP1 se encuentran elevadas en placas seniles de pacientes y ratones Tg2576 ([Mohri et al., 2007](#)). Más aún, *in vitro*, el tratamiento de células de neuroblastoma humano o neuronas corticales de rata embrionaria con PGJ₂ provoca un aumento de la concentración de proteínas ubiquitinadas, la activación de caspasas, clivaje de proteína tau y posterior muerte neuronal ([Arnaud et al., 2009](#), [Metcalf et al., 2012](#)); coincidiendo con algunas de las características histopatológicas de la enfermedad de Parkinson.

Asimismo, la administración sub-crónica de PGI_2 en la sustancia nigra es utilizada como un modelo farmacológico de la enfermedad de Parkinson, dado que es capaz de recrear algunas de las características fisiopatológicas de la misma: pérdida masiva y selectiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra, formación de agregados de α -sinucleína y proteínas ubiquitinadas, activación glial y desórdenes motores (Pierre et al., 2009; Figueiredo-Pereira et al., 2015). Estos modelos constituyen evidencia a favor del origen inflamatorio de la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer, así como de la participación de los eicosanoides en el establecimiento de dichas patologías. Se postula que estas prostaglandinas podrían participar de la transición de la respuesta inflamatoria aguda al establecimiento de una respuesta inflamatoria crónica; función que sería clave en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas (Figueiredo-Pereira et al., 2015). Si bien existe abundante literatura describiendo la presencia y funciones de los metabolitos del ácido araquidónico en diversos tejidos y distintos contextos fisiológicos y patológicos, los mismos no tienen como foco el estudio de los efectos de estos mediadores sobre la innervación.

Cuadro II: Biología de los eicosanoides

El ácido araquidónico (AA) se encuentra formando parte de las membranas celulares y es liberado por acción de la enzima fosfolipasa A_2 (PLA_2) en respuesta a estímulos de diverso origen, incluyendo impulsos nerviosos, daño celular, isquemia, algunas hormonas, reacciones inmunes y neuropéptidos.

El AA es procesado por tres sistemas enzimáticos: la vía del citocromo P450, la vía de la ciclooxigenasa (COX) y la vía de la lipooxigenasa (LOX); aunque solamente las dos últimas vías están implicadas en el proceso inflamatorio.

Las ciclooxigenasas 1 y 2 son las isoformas de la enzima prostaglandina endoperoxido-sintasa (PGHS), que cataliza la ciclo-oxigenación de AA para producir prostaglandina G_2 (PGG_2), seguida de su hidro-peroxidación para producir prostaglandina H_2 (PGH_2). PGH_2 es el sustrato de una serie de sintasas e isomerasas que catalizan la síntesis de prostaglandinas (PGs: PGE_2 , PGF_2 , PGD_2 , PGI_2 - prostaciclina), y tromboxanos (TXA_2 , TXB_2); colectivamente denominados prostanoides (Simmons et al., 2004).

Por su parte, las lipooxigenasas constituyen una familia de proteínas que oxidan sin ciclar los ácidos poliénicos a nivel del carbono 5, 12 o 15, formando los correspondientes ácidos hidroxiperoxisatetraenoicos (HPETEs) e hidroxieicosatetraenoicos (HETEs). La principal lipooxigenasa es la 5-LOX, la cual al activarse es movilizada desde el citoplasma a la membrana plasmática donde se une a la proteína activadora de 5-LOX (FLAP) y cataliza la síntesis de leucotrieno A_4 (LTA_4). LTA_4 es un intermediario inestable que puede ser convertido en LTB_4 , por la enzima LTA_4 hidrolasa; o conjugado a glutatión reducido por acción de la enzima LTC_4 sintasa para producir el cisteinil-leucotrieno LTC_4 , seguido de los cys-LTs más estables LTD_4 , LTE_4 (Liu & Yokomizo, 2015). Otras lipooxigenasas catalizan la síntesis de lipoxinas, las cuales han sido implicadas en la resolución de la respuesta inflamatoria (Serhan 2010).

Prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos constituyen el grupo de los eicosanoides, los cuales son producidos de forma ubicua en el organismo, y participan en el mantenimiento de la homeostasis tisular actuando de forma autócrina o parácrina. Por ejemplo, es sabido que PGI_2 es un regulador clave de la homeostasis cardiovascular (Kawabe et al., 2010); mientras que $\text{PGF}_{2\alpha}$ junto con PGE_2 son las principales prostaglandinas implicadas en la fisiología reproductiva en las hembras, participando de la regulación procesos como la ovulación, luteólisis, contracción miometrial, menstruación, implantación, regulación del tono vascular en la placenta, remodelación y dilatación cervical, y el inicio del parto (Sales & Jabbour 2003).

La síntesis de eicosanoides aumenta rápidamente y de forma muy marcada en los tejidos inflamados, previo al reclutamiento de leucocitos y células inmunes. Estos mediadores lipídicos ejercen sus complejos efectos biológicos actuando sobre distintos tipos celulares. Por esta razón estas moléculas regulan diversos procesos tales como el tono y la permeabilidad vascular; la contracción del músculo liso del útero, vasos, y bronquios. Asimismo, actúan sobre la innervación parasimpática bronquial, regulando la broncoconstricción (Ricciotti & Fitzgerald., 2011).

En el contexto del sistema inmune los eicosanoides participan del reclutamiento y maduración de células inmunes por acciones directas sobre estas células e indirectas sobre los tejidos con respuestas inflamatorias activas, al mismo tiempo que son producidos por distintas células inmunes activadas. Finalmente, participan en la señalización del dolor actuando sobre neuronas centrales y periféricas (Ricciotti & Fitzgerald., 2011).

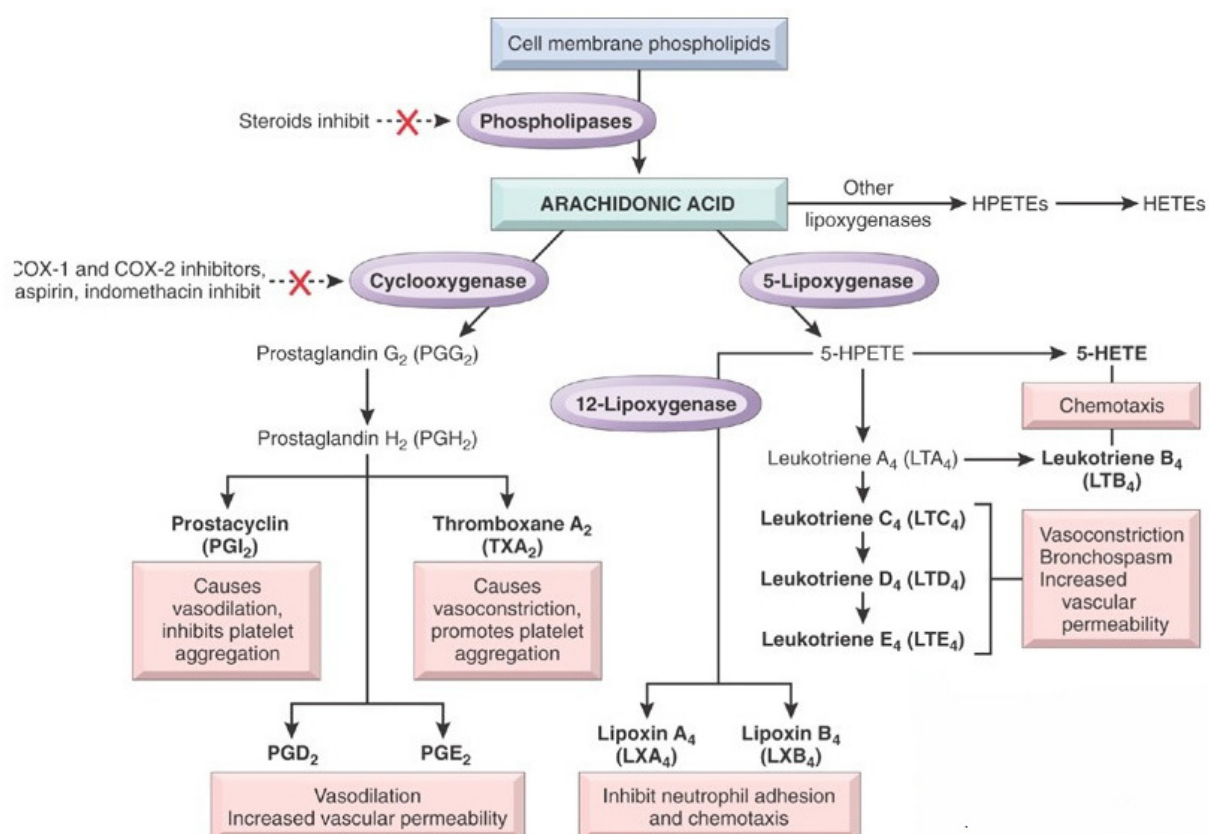


Figura 4. Esquema de las vías de procesamiento del ácido araquidónico. Se muestran los distintos eicosanoides producidos y sus principales efectos biológicos; enzimas de síntesis; y sitio de acción de fármacos antiinflamatorios. HPETEs: hidroxiperoxeicosatetraeinoicos. HETEs: hidroxieicosatetraeinoicos. Tomado de: Robbins & Cotran Pathological Basis of Disease 8th ed Kumar V et al (eds). Saunders Elsevier Philadelphia (2010)

I.3.2 Inhibidores de la síntesis de eicosanoides como antiinflamatorios

La evidencia que señala la presencia de un proceso neuroinflamatorio en la enfermedad de Alzheimer, llevó a plantear la hipótesis de que los pacientes bajo tratamiento con fármacos antiinflamatorios o con condiciones médicas que requirieran tratamientos crónicos con dichos

fármacos tendrían menor riesgo de desarrollar AD, lo que motivó la realización de múltiples estudios epidemiológicos analizando dicha posibilidad.

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) constituyen uno de los tipos de fármacos más utilizados en la práctica médica para el tratamiento de patologías inflamatorias crónicas como la artritis reumatoidea. Los mismos son inhibidores competitivos del sitio activo de ambas ciclooxygenasas, y actúan uniéndose a una de las subunidades de los homodímeros COX. La segunda subunidad de la enzima cumple una función alostérica, por lo que el bloqueo de uno de los sitios activos es suficiente para inhibir la producción de prostanoides ([Ricciotti & FitzGerald, 2015](#)). En 1996, se publicó el resultado de un meta-análisis de estudios en los que se analizaba la correlación entre el Alzheimer y el uso de AINEs, así como entre el Alzheimer y la artritis reumatoidea. El análisis conjunto de estos estudios mostró que el uso de AINEs reduce en un 50% el riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer ([McGeer & McGeer, 1996, 1998](#)). Desde entonces se ha estudiado una variedad de antiinflamatorios respecto de su potencial de mejorar la sintomatología y enlentecer la progresión de la enfermedad de Alzheimer.

Como conclusión general, los ensayos clínicos con inhibidores no selectivos de ciclooxygenasas, así como los que han utilizado inhibidores de las distintas isoformas de COX, no han dado resultados promisorios en pacientes diagnosticados con AD ([Heneka et al., 2015](#)). Las discrepancias entre los ensayos clínicos y los estudios epidemiológicos que muestran una demora en la aparición de la enfermedad y un enlentecimiento en su progresión, podrían estar dadas por un inicio tardío en el tratamiento, con la consiguiente dificultad de contrarrestar una respuesta inflamatoria completamente establecida. Como explicación alternativa, el tratamiento con AINEs inhibiría de forma no selectiva la producción de mediadores con efectos pro- y anti-inflamatorios, teniendo un impacto negativo sobre los mecanismos de resolución de la inflamación ([Heneka et al. 2015](#)).

A pesar de estos resultados negativos, algunos ensayos clínicos así como modelos animales han mostrado un efecto beneficioso de la inhibición de las vías de procesamiento del ácido araquidónico en la patología. Por ejemplo, el tratamiento con indometacina durante seis meses a un grupo de pacientes con AD, tuvo un efecto beneficioso sobre el deterioro cognitivo, comparado con un grupo de pacientes recibiendo placebo ([Rogers et al., 1993](#)). La inhibición de la vía de la COX-1 con el inhibidor selectivo SC560 en un modelo de AD en ratón mostró una reducción en los depósitos de A β y la hiperfosforilación de tau, disminución de marcadores inflamatorios en el hipocampo, y cambios en la microglia hacia fenotipos con una mayor actividad fagocítica; que se correspondieron con mejoras en la función cognitiva ([Choi et al.,](#)

2013). En otro trabajo, el efecto de la inhibición de COX-2 fue estudiado en dos modelos de PD experimental, inducidos por administración de las toxinas MPTP o 6-OHDA (6-hidroxidopamina). Estos ensayos mostraron que el inhibidor no selectivo salicilato de sodio tiene actividad neuroprotectora en ambos modelos de PD ([Sanchez-Pernaute et al., 2004](#), [Tansey & Goldberg, 2010](#)).

Recientemente, un estudio mostró que la inhibición de la vía de la lipooxigenasa con ácido cafeico tiene un efecto protector sobre el daño producido por la aplicación de un protocolo de isquemia-reperfusión global en el cerebro de ratas. Este efecto se vio acompañado de una disminución en los marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo analizados (NFkB y malón dialdehído, respectivamente), un aumento en la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa, mayor sobrevivencia neuronal en el hipocampo, y mejoras en el desempeño de los test conductuales ([Liang et al., 2015](#)).

Si bien existen resultados contradictorios respecto de la utilización de inhibidores de la síntesis de eicosanoides como estrategias en el tratamiento de la neuroinflamación, la constatación de la inflamación como mecanismo contribuyente a la progresión de enfermedades neurodegenerativas sugiere que es necesario continuar trabajando en determinar de forma precisa el blanco o blancos correctos dentro de los múltiples actores celulares y moleculares que participan de dicha respuesta inflamatoria, así como los protocolos indicados de tratamiento. Algunos resultados obtenidos con inhibidores selectivos de COX y LOX indican que algunos de los eicosanoides podrían encontrarse entre dichos blancos terapéuticos.

II ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

II.1 Modelo animal

Los estudios realizados se llevaron a cabo en ratas prepúberes (sexualmente inmaduras). Este modelo ha sido ampliamente caracterizado y utilizado en estudios previos del grupo, dado que permite evaluar de forma aislada los efectos del estrógeno sobre la innervación uterina, sin la interferencia de las hormonas sexuales endógenas (ej. progesterona). Por otra parte, existen sólidas evidencias que indican que las ratas prepúberes responden al estrógeno de manera similar a las ratas adultas castradas, y constituyen por lo tanto un modelo validado para estudiar la acción del estrógeno sobre el útero ([Brauer et al., 1995](#); [Rhen et al., 2003](#)).

II.2 Inhibición farmacológica del proceso inflamatorio

Con el objetivo de estudiar la contribución del proceso inflamatorio a la degeneración de las fibras nerviosas simpáticas intrauterinas inducida por el estrógeno, se realizaron una serie de inhibiciones farmacológicas de la respuesta inflamatoria.

En la primera etapa, se utilizó como inhibidor general el glucocorticoide dexametasona (DEX). DEX es un glucocorticoide sintético fluorinado, sin acción mineralocorticoide, entre 5 y 7 veces más potente que la metilprednisolona y prednisona, y 25 veces más potente que la hidrocortisona ([Zoorob & Cender, 1998](#)).

En una segunda etapa, y con el objetivo de analizar la posible participación de los distintos tipos de eicosanoides a este fenómeno, se realizaron inhibiciones selectivas de las distintas vías de procesamiento del ácido araquidónico utilizando una serie de fármacos desarrollados por el laboratorio Pfizer (Pfizer Global Research and Development, USA). Se trata de drogas altamente potentes y selectivas para la inhibición de ciclooxigenasas y lipooxigenasas.

Para la inhibición de la vía de la COX-1 se utilizó SC-58560 (de aquí en más SC560) ([Smith et al., 1998](#)), y para inhibir la vía de la COX-2 SC-58236 (de aquí en más SC536) ([Horrillo et al., 2007](#); [Lapchak et al., 2001](#)). Adicionalmente, se estudió el efecto de la indometacina (IND), por tratarse de un inhibidor general de la vía COX ampliamente utilizado en la clínica ([Smith et al., 1998](#)). La vía de la lipooxigenasa fue inhibida con el inhibidor no-redox CJ-013610-27 (de aquí en más CJ) ([Horrillo et al., 2007](#)).

II.3 Evaluación del efecto anti-inflamatorio

Inicialmente, se evaluó el efecto del estrógeno solo y en combinación con los distintos fármacos antiinflamatorios sobre órganos efectores seleccionados, incluyendo timo, glándulas suprarrenales (SR) y ovarios. Estos órganos fueron seleccionados para evaluar efectos generales, dado que son blancos conocidos de la acción de hormonas esteroideas. Las glándulas suprarrenales y los ovarios son, además, órganos productores de esteroides (glucocorticoides y estrógeno y progesterona, respectivamente). A nivel del útero, se determinó en qué medida los distintos fármacos empleados afectaban las respuestas tróficas inducidas por el estrógeno, valorando el peso húmedo y seco del órgano. Adicionalmente, y para caracterizar con mayor detalle los efectos de los tratamientos sobre los distintos compartimientos tisulares del útero, se realizaron medidas morfométricas sobre preparados histológicos del cuerno uterino ([Chávez-Genaro et al., 2002](#)).

II.4 Efectos sobre la innervación uterina y la infiltración de eosinófilos

El efecto de los distintos tratamientos sobre la innervación uterina y su respuesta al estrógeno fue analizado mediante el conteo de fibras nerviosas demostradas por inmunohistoquímica en cortes histológicos. Esta estrategia ha sido utilizada por nuestro y otros laboratorios para realizar un análisis regional y selectivo de la innervación. En nuestro caso, el estudio se centró fundamentalmente en la capa miometrial longitudinal de la porción cefálica del cuerno uterino, dado que es allí donde se concentra la mayor proporción de fibras simpáticas. Complementariamente, se realizó una valoración de los efectos de los tratamientos antes mencionados sobre el grado de infiltración de leucocitos eosinófilos en el útero en respuesta al estrógeno. Esta estrategia permitió evaluar de forma indirecta el efecto anti-inflamatorio de las drogas empleadas.

III MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Animales

Se utilizaron ratas prepúberes de la cepa Wistar de la colonia del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Las crías fueron sexadas entre los 0 y 2 días de vida, criadas en camadas de 8-9 hembras y destetadas a los 21 días de edad. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones constantes de temperatura (21°C) e iluminación (ciclo de 12hs luz/oscuridad), con libre acceso a agua y alimento. El peso y estado general de los animales fue registrado diariamente. El tratamiento y eutanasia se llevó a cabo siguiendo las normas internacionales aprobadas por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del IIBCE.

III.2 Tratamientos con estrógeno

Tomando en cuenta los efectos dosis- y tiempo-dependientes del estrógeno sobre el tejido uterino y su inervación simpática ([Brauer et al., 1995](#), [Chávez-Genaro et al., 2002](#)), se realizaron tratamientos a corto plazo (ST) y largo plazo (LT) con distintas dosis de la hormona.

En el caso de los tratamientos a corto plazo, se utilizó una única dosis subcutánea (s.c.) de 1µg o 2.5µg de 17-β-cipionato de estradiol (Laboratorios König, Argentina) diluido a dosis apropiadas con aceite de maní (Sigma-Aldrich, EEUU). La administración de la hormona fue realizada a los 25 días de edad y su efecto fue analizado 24 horas más tarde. En los tratamientos a largo plazo, se administró una única dosis s.c. de 25µg de estrógeno a los 19 días de edad; y su efecto fue analizado 7 días más tarde (26 días de edad). Los animales control recibieron volúmenes equivalentes de vehículo.

III.3 Tratamiento con antiinflamatorios

En la Tabla I se resumen los fármacos utilizados, sitios de acción, dosis y vehículos correspondientes.

Tabla I. Fármacos antiinflamatorios utilizados

Antiinflamatorio	Sitio de acción	dosis LT (mg/Kg)	dosis ST (mg/Kg/día)	Diluyente	Laboratorio
Dexametasona	PLA ₂ (*)	0.5	4	Suero fisiológico	Dispert (Uy)
Indometacina	COX (1)	5	40	NaHCO ₃ 1%	SIGMA (USA)
SC-58560	COX-1	10	80	DMSO	Pfizer (USA)
SC-58236	COX-2	10	80	DMSO	Pfizer (USA)
CJ-013610-27	LOX	10	80	DMSO	Pfizer (USA)

PLA₂: Fosfolipasa A₂, COX: ciclooxigenasa, LOX: lipooxigenasa

Para los tratamientos a corto plazo, una única dosis subcutánea de antiinflamatorio (AI) fue administrada conjuntamente con el estrógeno, y los efectos analizados a las 24 horas. En los tratamientos a largo plazo, los antiinflamatorios fueron administrados s.c. diariamente por 8 días consecutivos entre los 18 y 25 días de edad. En los animales recibiendo tratamientos a largo plazo con antiinflamatorio, se varió el sitio de inyección para evitar daños en el tejido. En la Figura 5 se ilustran los protocolos de inyección.

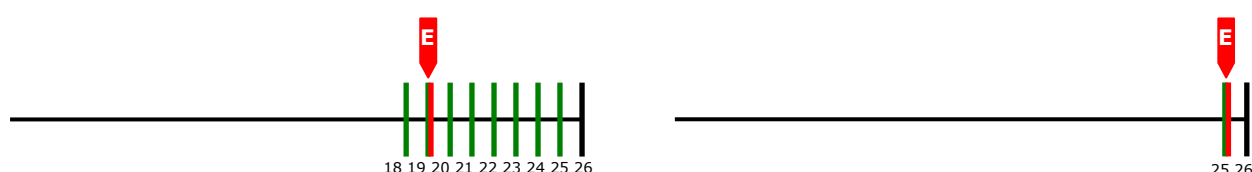


Figura 5. Protocolos de inyección de estrógeno y antiinflamatorios Izq: tratamiento a largo plazo. Der: tratamiento a corto plazo

III.4 Obtención y preparación de los tejidos

Las ratas fueron sacrificadas mediante una sobredosis de pentobarbital sódico administrada por vía intraperitoneal (i.p.), y posteriormente perfundidas por vía transcardíaca con solución salina seguida de paraformaldehído (PFA) al 4% en buffer fosfato (PBS). Al finalizar la perfusión se disecó el timo, glándulas suprarrenales y ovarios, y se registró el peso húmedo de dichos órganos. Los cuernos uterinos fueron disecados, post-fijados en PFA al 4% por 90min adicionales, lavados en PBS (3 X 15min) y crioprotegidos por 18 horas en una solución de sacarosa al 12% en PBS. Finalmente, los tejidos fueron colocados en moldes con medio de congelación (Shandon, USA) y congelados a -20°C.

Se utilizó un cuerno uterino de cada animal, del que se disecó un fragmento del tercio cefálico de 8mm aproximadamente; del segundo cuerno uterino se registró peso húmedo y seco. Se realizaron cortes a congelación de 12 μ m de espesor transversales al eje mayor de los cuernos uterinos utilizando un crióstato (Leica, Alemania). Los cortes fueron montados en portaobjetos de vidrio pretratados con gelatina. Durante la obtención de los cortes, se procedió de forma que los cortes adyacentes fueron colocados alternadamente en 3 portaobjetos, de manera de obtener triplicados que fueron utilizados para inmunomarcación e histología convencional (hematoxilina y eosina), el tercer portaobjetos sirvió de respaldo. Para cada bloque, se obtuvieron dos series de portaobjetos, correspondientes a dos zonas dentro de la región cefálica del cuerno uterino, separadas entre ellas por aproximadamente 1.5mm.

III.5 Inmunohistoquímica

Para la demostración de los nervios simpáticos se utilizó un anticuerpo policlonal generado en conejo dirigido contra la tirosina hidroxilasa, (anti-TH, dilución final 1:400; Affinity Bioreagents, USA). La tirosina hidroxilasa es la enzima que cataliza el paso limitante en la síntesis de noradrenalina, y es utilizada como marcador selectivo de nervios simpáticos a nivel periférico.

Como método de revelado se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo generado en cabra conjugado al fluorocromo AlexaFluor 488 (EX495nm/EM519nm) (goat anti-rabbit, dilución final 1:400; Molecular Probes, USA). Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo secundario los cortes fueron lavados en PBS (3 X 15min) y montados en un medio a base de glicerol:PBS con *antifade* (Citifluor, UK). La especificidad del anticuerpo contra TH ha sido caracterizada en nuestro laboratorio. La especificidad del anticuerpo secundario fue comprobada omitiendo el anticuerpo primario en algunos portaobjetos, que fueron posteriormente procesados en idénticas condiciones.

III.6 Evaluación de los efectos de los tratamientos sobre la innervación

Captura de imágenes. Los preparados inmunomarcados fueron observados en un microscopio Nikon E800 equipado con epifluorescencia (Nikon, Japón). Para observar la inmunofluorescencia para TH se utilizó un cubo de fluorescencia B-2E con un rango de longitud de onda de excitación de 450-490 nm y un filtro de barrera de emisión de 520-560 nm (EX450-490nm/BA520-560nm). Se realizaron pruebas de exposición para determinar las condiciones óptimas de captura, que fueron mantenidas durante todo el proceso de adquisición, y no se realizaron correcciones posteriores de brillo o contraste sobre las imágenes. Se realizó un mapeo de cada cuerno uterino utilizando una lente objetiva de 20 aumentos (20X), en el que se

obtuvo una imagen del borde anti-mesometrial y cuatro imágenes de las regiones laterales (Fig. 6).

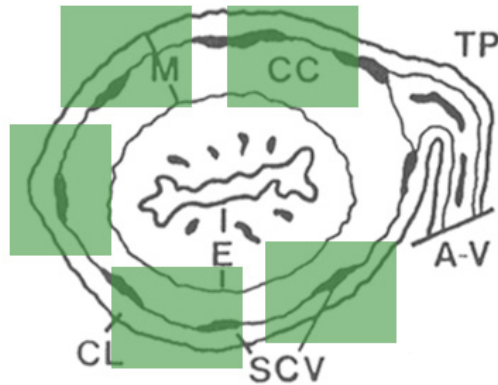


Figura 6. Mapeo fotográfico. Esquema de un corte transversal del cuerno uterino mostrando el mapeo fotográfico. Los rectángulos verdes representan las regiones fotografiadas (20X) para el análisis cuantitativo de la inervación simpática TH-I.

Las imágenes fueron capturadas utilizando una video-cámara monocroma refrigerada CoolSnap asociada al programa ImagePro Express (Media Cybernetics, USA). Para el análisis de las imágenes se utilizó el programa ImagePro Plus (Media Cybernetics, USA). En cada imagen obtenida, se delimitó manualmente el área de la imagen ocupada por la capa muscular longitudinal (LML) y se registró su área. Posteriormente, se seleccionaron de forma automática las fibras nerviosas inmunorreactivas para TH (TH-I) y se registró el valor de área ocupada por fibras nerviosas (AN, área nerviosa) dentro de la CML (Fig. 7).

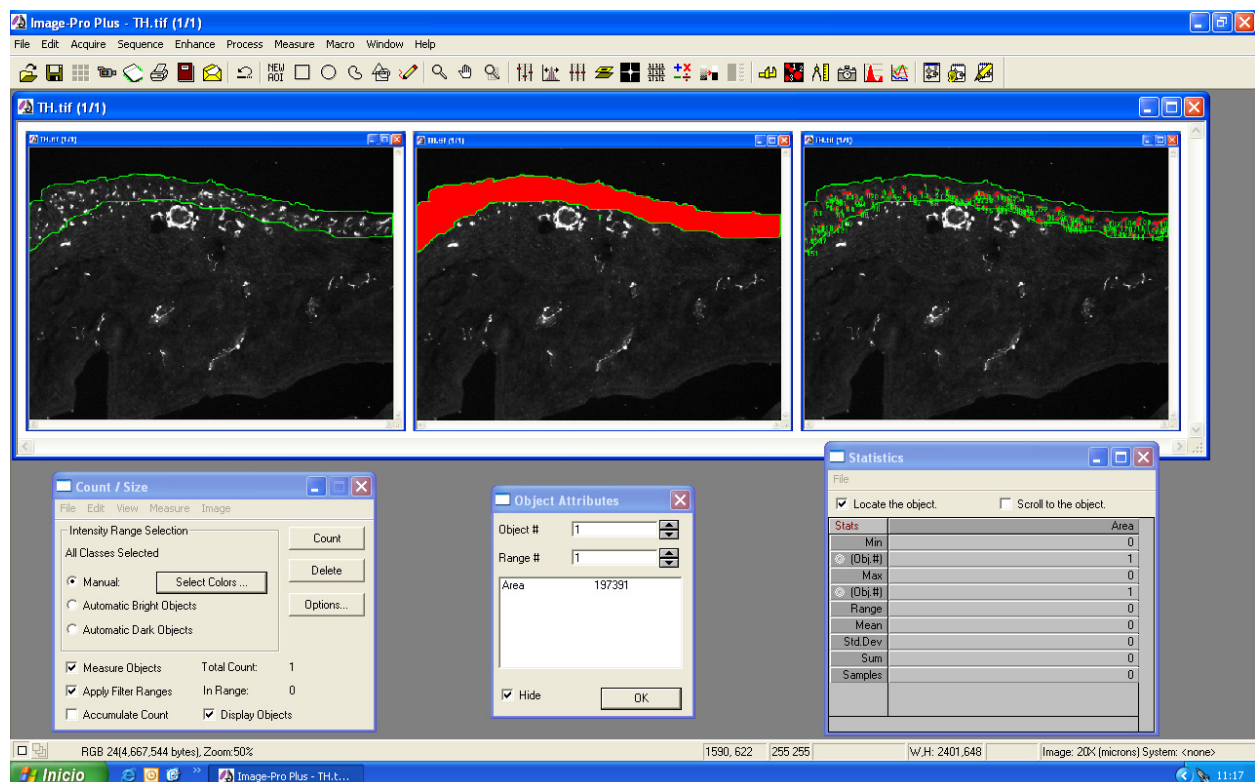


Figura 7. Análisis cuantitativo de la innervación Captura de pantalla del programa ImagePro Plus mostrando en orden el procedimiento de delimitación y medida de área parcial de la capa muscular longitudinal (LML) y la medida del área ocupada por nervios simpáticos inmunoreactivos para TH (TH-I).

Con el fin de evitar errores de medida ocasionados por la presencia de granulocitos eosinófilos que poseen una autofluorescencia intrínseca se procedió a capturar su imagen en cada campo usando un filtro Nikon-2A (EX 380-420; BA 450). La imagen digital obtenida fue sustraída antes de medir el área brillante ocupada por nervios TH-I (Fig. 8).

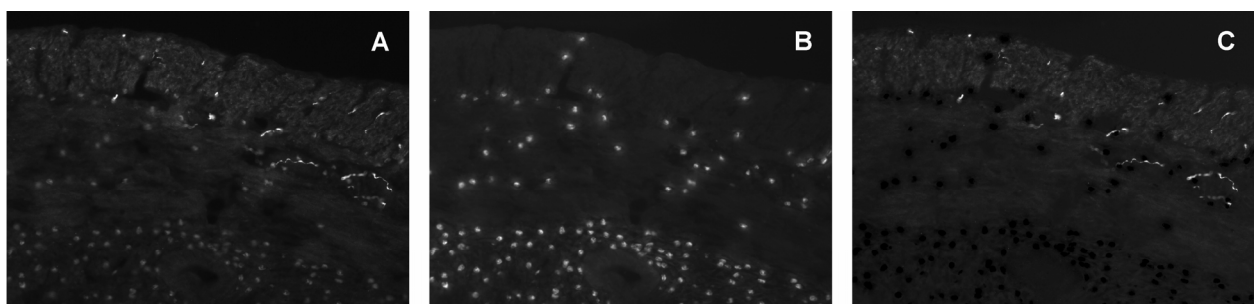


Figura 8. Proceso de sustracción de *background*. Secuencia de imágenes mostrando el proceso de sustracción de la señal inespecífica de los leucocitos eosinófilos en las imágenes de inmunotinción para TH. A: imagen capturada utilizando el filtro B-2E. B: imagen capturada utilizando el filtro 2A (utilizada además para realizar el conteo de leucocitos eosinófilos). C: imagen resultante luego del proceso de sustracción del *background*.

Medidas de densidad de innervación. Con los datos del área ocupada por la LML y los perfiles nerviosos TH-positivos, se obtuvo el porcentaje de área nerviosa (%AN) en cada imagen.

Posteriormente se promediaron los %AN de todas las imágenes obtenidas de un mismo corte. Este proceso se repitió en otro corte del mismo cuerno uterino (separado por una distancia de 1.5mm, ver más arriba). Los valores obtenidos de ambos cortes fueron promediados para obtener el %AN por animal y estos datos usados en las comparaciones estadísticas.

Dado que algunos de los tratamientos utilizados provocan cambios en el tamaño del útero, se calculó el área nerviosa total (ANT) que resulta de multiplicar el %AN por el tamaño total de la LML en el corte. El ANT es un indicador fiel de la inervación de un tejido, proporcionando una medida integrada de la cantidad y calibre de fibras nerviosas presentes en el mismo. El parámetro permite analizar los cambios en la inervación en un tejido independientemente de posibles alteraciones en el tamaño del mismo; y es por lo tanto una medida más apropiada de los cambios en la inervación en situaciones fisiológicas o experimentales en las que ocurren procesos tróficos ([Brauer et al., 1992](#)).

III.7 Conteo de leucocitos eosinófilos

Se utilizaron las imágenes capturadas utilizando el filtro Nikon-2A (Fig. 6b), en las cuales los leucocitos eosinófilos son reconocidos de forma automática por el programa como los únicos objetos brillantes. Se realizaron medidas de la densidad y cantidad total de leucocitos eosinófilos en el miometrio y endometrio, procediendo de forma análoga a la utilizada para medir las fibras nerviosas TH-I. Con el fin de confirmar la identidad de las células autofluorescentes, se realizó una tinción de Sirius Red, la cual es específica para marcar leucocitos eosinófilos (Fig. 9).

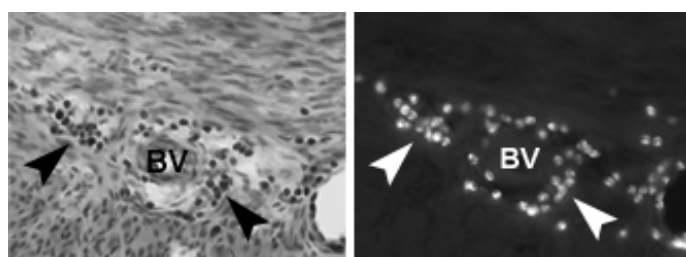


Figura 9. Demostración de leucocitos eosinófilos (a) Tinción con Sirius Red (SR), (b) Imagen capturada utilizando el cubo de fluorescencia Nikon-2A (EX 380-420; BA 450) Las puntas de flecha indican grupos de eosinófilos. Notar que la marca fluorescente coincide con la marcación específica con SR. BV: vaso sanguíneo.

III.8 Análisis estadístico

Los datos numéricos obtenidos para cada parámetro en cada animal fueron promediados, de forma que los datos provenientes de cada individuo fueron considerados como una observación independiente. Los datos fueron comparados utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Dunnett. Se establecieron comparaciones entre: (a) los tratamientos vs. control; y (b) los tratamientos combinados (E + AI) vs. tratamiento con estrógeno. Para las comparaciones múltiples se utilizó un ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey-Kramer. Para ambos tipos de análisis los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

IV RESULTADOS

IV.1 Tratamientos a largo plazo

IV.1.1 Efectos generales

Inicialmente, se evaluó el efecto del estrógeno (E), y los tratamientos combinados con dexametasona (DEX) y los distintos fármacos antiinflamatorios sobre el crecimiento de los animales; registrándose el peso corporal y los pesos normalizados de timo, glándulas suprarrenales y ovario (Tablas II, III).

El peso de los animales al término del tratamiento se vio incrementado en respuesta al estrógeno. La co-administración de E con DEX o SC560 provocó una disminución en el peso con respecto al tratamiento con E solo, mientras que la co-administración de IND, SC236 y CJ no provocó modificaciones.

En el caso del timo, el peso normalizado no se vio modificado en respuesta al estrógeno. El mismo disminuyó únicamente luego de los tratamientos combinados de E con DEX o SC560.

En las glándulas suprarrenales, las combinaciones de E+DEX y E+CJ provocaron un descenso del peso en comparación con el control. El valor de este parámetro aumentó en respuesta a la administración de E+SC560, no observándose cambios luego de los demás tratamientos.

En cuanto a la respuesta de los ovarios a los diferentes tratamientos, cabe destacar que no se observaron señales de ovulación en ninguno de los grupos experimentales. Solamente la combinación E+DEX provocó un aumento en los valores de peso ovárico, mientras que los tratamientos con E combinado con IND, SC236 o CJ, provocaron una disminución significativa en los valores de este parámetro.

Tabla II. Efecto de los tratamientos a largo plazo sobre el peso corporal; y los pesos húmedos de timo, glándulas suprarrenales y ovarios.

Tratamiento	PESO	PESO TIMO	PESO SR	PESO OVARIOS
Control	39.5 ± 2.5	131.6 ± 6.5	8.3 ± 0.2	10.9 ± 0.5
E	48.4 ± 1.5 ^a	123.6 ± 8.1	8.1 ± 0.2	9.6 ± 0.4
E+DEX	35.7 ± 0.9 ^b	15.3 ± 0.5 ^{a,b}	4.4 ± 0.3 ^{a,b}	13.1 ± 0.6 ^{a,b}
E+IND	49.6 ± 2.0 ^a	131.9 ± 8.2	8.7 ± 0.3	7.0 ± 0.4 ^{a,b}
E+SC560	32.1 ± 1.0 ^{a,b}	87.3 ± 6.9 ^{a,b}	12.8 ± 0.4 ^{a,b}	9.6 ± 0.3
E+SC236	47.1 ± 2.2 ^a	103.5 ± 6.3	9.0 ± 0.4	7.0 ± 0.4 ^{a,b}
E+CJ	53.0 ± 0.9 ^a	115.1 ± 2.8	6.9 ± 0.2 ^{a,b}	7.7 ± 0.6 ^{a,b}

Se expresa el peso de los animales (g), y los pesos de los distintos tejidos (mg) normalizados a 50 gramos de peso corporal. Los valores se expresan como media ± SEM. Los datos fueron analizados utilizando un ANOVA de una vía seguido del test de Dunnett. a: diferencia significativa con el control, b: diferencia significativa con el estrógeno.

Tabla III. Resumen del efecto de los tratamientos a largo plazo sobre el peso corporal y los pesos húmedos normalizados de timo, glándulas suprarrenales y ovarios.

Comparación	PESO	PESO TIMO	PESO SR	PESO OVARIOS
C vs. E	↑	-	-	-
E vs. E+DEX	↓	↓	↓	↑
E vs. E+IND	-	-	-	↓
E vs. E+SC560	↓	↓	↑	-
E vs. E+SC236	-	-	-	↓
E vs. E+CJ	-	-	↓	↓

Se esquematiza el cambio del E vs. el control, y el cambio de los tratamientos combinados vs. el E solo (E+AI vs. E). Se representan solamente las diferencias estadísticamente significativas.

IV.1.2 Efectos sobre el útero

Crecimiento uterino El efecto de los tratamientos sobre el útero fue evaluado como peso húmedo y seco del cuerno uterino, normalizado a 50 gramos de peso corporal, y como la relación entre ambos parámetros (razón PS/PH). Complementariamente y con el fin de realizar una evaluación regional del efecto de los tratamientos, se midió el área transversal total y las ocupadas por el miometrio y el endometrio (Tablas IV, V, VI).

El E provocó un aumento coordinado de los pesos húmedo y seco del útero, sin alterar la relación entre ambos parámetros (Tablas IV, VI). Coincidentemente, aumentó de forma significativa las áreas transversal total, endometrial y miometrial (Tablas V, VI). El tratamiento combinado de E con DEX o IND no modificó el efecto trófico inducido por el E aisladamente. En

cambio, la inhibición de las vías COX-1, COX-2 y LOX aumentó la razón PS/PH, aunque este cambio se produjo de manera diferente en respuesta a estos tres fármacos (Tablas IV, VI). Los tratamientos combinados no revirtieron el efecto del E sobre las áreas transversales. Más aún, el tratamiento de E+IND, provocó un aumento adicional en el área miometrial (Tablas V, VI).

Tabla IV. Efecto de los tratamientos a largo plazo sobre el peso uterino.

Tratamiento	PESO HUMEDO	PESO SECO	RAZON PS/PH
Control	10.8 $\pm$ 0.7	2.0 $\pm$ 0.1	0.19 $\pm$ 0.02
E25	64.1 $\pm$ 2.7 ^a	12.2 $\pm$ 0.4 ^a	0.19 $\pm$ 0.01
E25+DEX	63.0 $\pm$ 2.7 ^a	12.3 $\pm$ 1.0 ^a	0.19 $\pm$ 0.01
E+IND	49.8 $\pm$ 4.3 ^a	8.9 $\pm$ 0.5 ^a	0.18 $\pm$ 0.01
E+SC560	80.9 $\pm$ 6.1 ^{a,b}	19.9 $\pm$ 1.4 ^{a,b}	0.25 $\pm$ 0.01 ^{a,b}
E+SC236	71.3 $\pm$ 9.5 ^a	17.6 $\pm$ 1.9 ^{a,b}	0.25 $\pm$ 0.01 ^{a,b}
E+CJ	45.6 $\pm$ 2.7 ^{a,b}	11.2 $\pm$ 0.6 ^a	0.25 $\pm$ 0.01 ^{a,b}

Se muestran los pesos del cuerno uterino entero (mg), normalizados a 50 gramos de peso corporal. Los valores se expresan como media $\pm$ SEM. Los datos fueron analizados utilizando un ANOVA de una vía seguido del test de Dunnett. a: diferencia significativa con el control, b: diferencia significativa con el estrógeno.

Tabla V. Efecto de los tratamientos a largo plazo sobre las áreas transversales del cuerno uterino.

Tratamiento	AREA TOTAL	AREA ENDOMETRIO	AREA MIOMETRIO
Control	0.28 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.004
E	1.77 $\pm$ 0.06 ^a	0.78 $\pm$ 0.02 ^a	1.00 $\pm$ 0.05 ^a
E+DEX	1.67 $\pm$ 0.07 ^a	0.77 $\pm$ 0.06 ^a	0.89 $\pm$ 0.03 ^a
E+IND	2.07 $\pm$ 0.13 ^a	0.86 $\pm$ 0.06 ^a	1.21 $\pm$ 0.07 ^{a,b}
E+SC560	1.63 $\pm$ 0.13 ^a	0.73 $\pm$ 0.05 ^a	0.84 $\pm$ 0.08 ^a
E+SC236	1.68 $\pm$ 0.10 ^a	0.74 $\pm$ 0.06 ^a	0.94 $\pm$ 0.05 ^a
E+CJ	1.65 $\pm$ 0.10 ^a	0.73 $\pm$ 0.05 ^a	0.87 $\pm$ 0.06 ^a

Se muestran las áreas transversales (mm²) total, endometrial y miometrial. Los valores se expresan como media $\pm$ SEM. Los datos fueron analizados utilizando un ANOVA de una vía seguido del test de Dunnett. a: diferencia significativa con el control, b: diferencia significativa con el estrógeno.

Tabla VI. Resumen del efecto de los tratamientos a largo plazo sobre el cuerno uterino.

Comparación	PESO HUMEDO	PESO SECO	Ratio PS/PH	AREA TOTAL	AREA ENDOMETRIO	AREA MIOMETRIO
C vs. E	↑	↑	-	↑	↑	↑
E vs. E+DEX	-	-	-	-	-	-
E vs. E+IND	-	-	-	-	-	↑
E vs. E+SC560	↑	↑	↑	-	-	-
E vs. E+SC236	-	↑	↑	-	-	-
E vs. E+CJ	↓	-	↑	-	-	-

Se esquematiza el cambio del E vs. el control; y el cambio de los tratamientos combinados vs. el E solo (E+AI vs. E). Se representan solamente las diferencias estadísticamente significativas.

Infiltración de leucocitos eosinófilos En el cuerno uterino de ratas prepúberes control, no se observaron leucocitos eosinófilos (Fig. 10a). El tratamiento con estrógeno provocó el ingreso de estos leucocitos al miometrio y endometrio (Fig. 10b), siendo la proporción de células mayor en el compartimento endometrial (77% vs. 23%; Tablas VII, VIII).

La co-administración de DEX redujo en más del 90% la densidad de eosinófilos totales (Fig. 10c, Tablas VII, VIII). Esta disminución fue similar en el miometrio y endometrio, no alterándose la distribución relativa de células observada en los animales tratados sólo con E (79% endometrio vs. 21% miometrio).

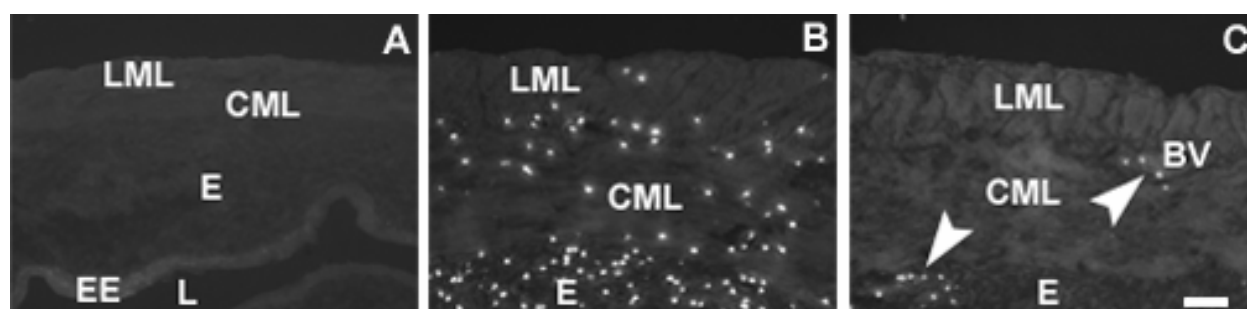


Figura 10. Infiltración de leucocitos eosinófilos al tejido uterino. Cortes a congelación transversales de la porción cefálica del cuerno uterino mostrando (a) cuerno uterino proveniente de un control prepúber desprovisto de leucocitos eosinófilos, (b) infiltración eosinofílica en respuesta al tratamiento a largo plazo con estrógeno, (c) efecto de la co-administración de DEX. LML: capa muscular longitudinal; CML: capa muscular circular; E: endometrio; EE: epitelio endometrial; L: luz del cuerno uterino; BV: vasos sanguíneos. Las puntas de flecha en (c) indican grupos de eosinófilos. Barra de calibración: 50 μm.

El inhibidor de LOX redujo la densidad total de eosinófilos en un 32% (Tablas VII, VIII). Se observó un cambio en la distribución de estas células respecto del tratamiento aislado con estrógeno, aumentando en el miometrio y disminuyendo en el endometrio (34% y 66%, respectivamente).

La combinación de E con inhibidores de COX-1 y COX-2 provocó una redistribución de los leucocitos eosinófilos en el cuerno uterino, sin afectar su densidad total (Tablas VII, VIII). En ambos casos se observó un aumento en la proporción relativa de eosinófilos en el miometrio respecto al observado luego de la administración de E aisladamente (COX-1: 63%, COX-2: 79%). Solamente en el caso del inhibidor de COX-2 este aumento se vio acompañado por una disminución significativa de la densidad total de eosinófilos en el endometrio.

Tabla VII. Efecto del estrógeno y los antiinflamatorios sobre el reclutamiento de leucocitos eosinófilos al útero.

Tratamiento	EOS/mm TOTALES	EOS/mm MIOM	EOS/mm ENDO
E	1586 ± 229	649 ± 100	2761 ± 481
E+DEX	137 ± 53 ^a	53 ± 18 ^a	238 ± 100 ^a
E+IND	1373 ± 113	702 ± 74	2334 ± 211
E+SC560	1724 ± 88	1230 ± 81 ^a	2415 ± 144
E+SC236	1177 ± 97	1661 ± 171 ^a	569 ± 70 ^a
E+CJ	1080 ± 130 ^a	1335 ± 127 ^a	835 ± 109 ^a

Se muestra el número de eosinófilos por mm² de tejido. Los valores se expresan como media ± SEM. Los datos fueron analizados utilizando un ANOVA de una vía seguido del test de Dunnett. a: diferencia significativa con el estrógeno.

Tabla VIII. Resumen del efecto de los tratamientos sobre el reclutamiento de leucocitos eosinófilos al tejido uterino.

Comparación	EOS/mm TOTALES	EOS/mm MIOMETRIO	EOS/mm ENDOMETRIO
E vs. E+DEX	↓	↓	↓
E vs. E+IND	-	-	-
E vs. E+SC560	-	↑	-
E vs. E+SC236	-	↑	↓
E vs. E+CJ	↓	↑	↓

Se esquematiza el cambio vs. E. Solamente se representan las diferencias estadísticamente significativas.

IV.1.3 Efectos sobre los nervios simpáticos

Estrógeno En los controles prepúberes, los nervios se hallaban principalmente distribuidos alrededor de los vasos sanguíneos y asociados a la capa muscular longitudinal. Muy escasas fibras se observaron en el endometrio y la capa circular del miometrio (Fig. 11a,b).

El tratamiento crónico con E provocó un marcado descenso en la densidad de fibras simpáticas miometriales (Fig. 11e). El análisis cuantitativo (Tabla IX) mostró una disminución del 94% en el porcentaje de área nerviosa, y un aumento de casi 8 veces el área de la capa miometrial longitudinal. Se observó además una disminución del 54% en el área nerviosa total, lo que refleja una pérdida de fibras nerviosas (Tabla IX). En algunos campos microscópicos, se observaron eosinófilos en clara asociación espacial con las fibras nerviosas simpáticas (Fig. 12).

Dexametasona El tratamiento a largo plazo con DEX aislada provocó un aumento generalizado de la inervación simpática del cuerno uterino, incluyendo el triángulo mesometrial y la capa muscular circular (Fig. 11c,d). El análisis cuantitativo mostró un aumento del 46% en el área nerviosa total en la LML, lo que refleja un aumento real en el número de fibras nerviosas (Tabla IX). Al co-administrarla con estradiol, DEX impidió completamente la disminución provocada por E en el área nerviosa total (Fig 11f, Tabla IX).

Tabla IX. Efecto del tratamiento a largo plazo con E y dexametasona sobre los nervios simpáticos uterinos.

Tratamiento	%AN	ANT	Area LML
Control	3.10 ± 0.26	0.0013 ± 0.0001	0.04 ± 0.001
E	0.18 ± 0.02 ^a	0.0006 ± 0.0001 ^a	0.32 ± 0.016 ^a
DEX	3.69 ± 0.32 ^b	0.0019 ± 0.0001 ^{a,b}	0.05 ± 0.002 ^b
E+DEX	0.45 ± 0.04 ^{a,c}	0.0013 ± 0.0001 ^{b,c}	0.28 ± 0.012 ^{a,c}

Se muestra el porcentaje de área ocupada por nervios (%AN), el área nerviosa total (ANT, en mm²) y el área transversal de la capa muscular longitudinal (LML, en mm²), en la región cefálica del cuerno uterino de ratas prepúberes. Los resultados se expresan como media±SEM. Los datos fueron comparados utilizando el test de Tukey-Kramer para comparaciones múltiples. Los valores de p≤0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. E: 25µg; DEX: 0.5mg/Kg. a: diferencia significativa con el control, b: diferencia significativa con E, c: diferencia significativa con DEX.

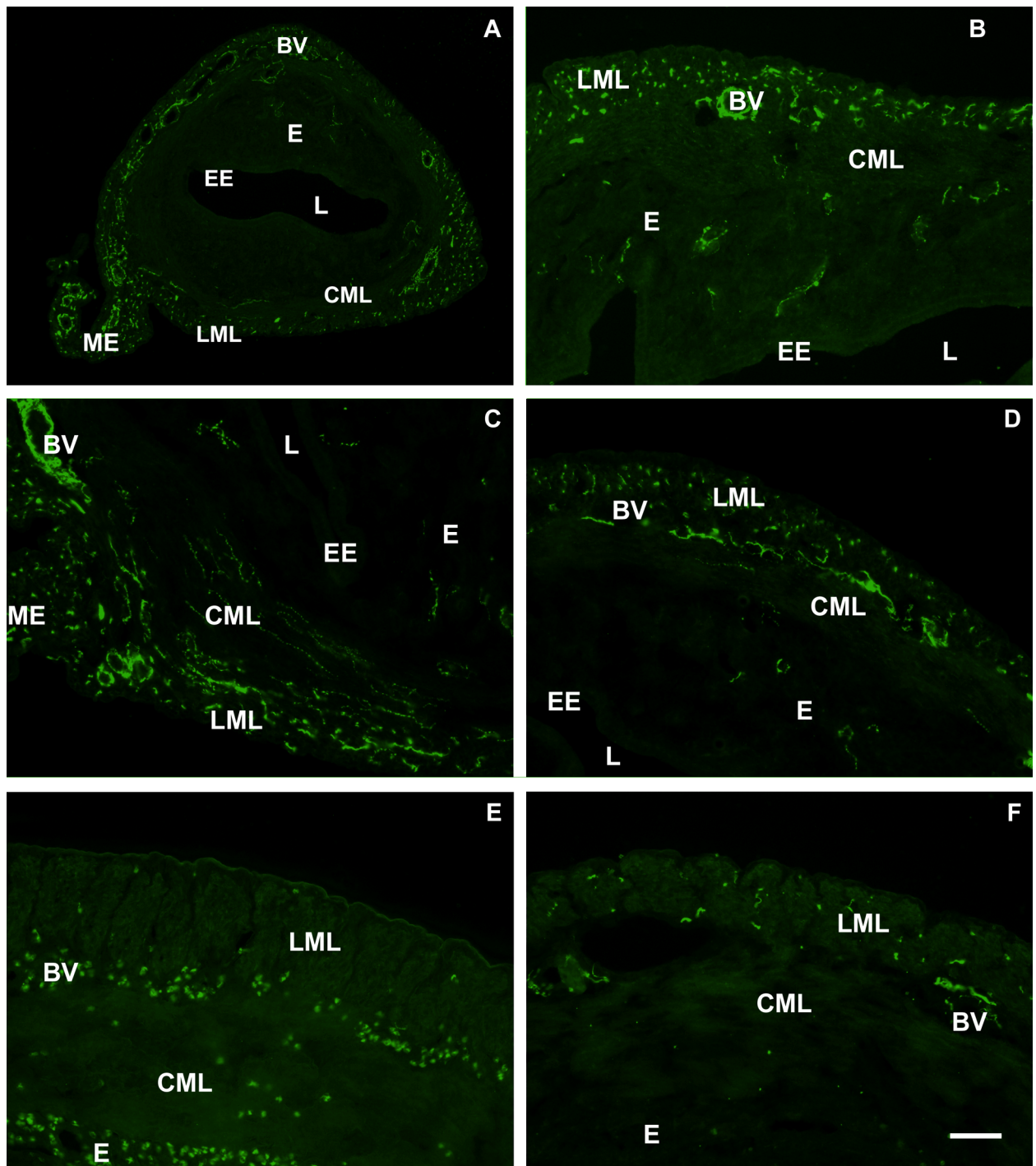


Figura 11. Efecto de los tratamientos a largo plazo con E y DEX sobre la innervación simpática uterina. Cortes a congelación transversales de la porción cefálica del cuerno uterino inmunomarcados para tirosina hidroxilasa (TH). a,b: control (4X y 20X, respectivamente) c,d: DEX 0.5mg/Kg (mesometrio y lateral, respectivamente); e: E25µg; f: E+DEX. LML: capa muscular longitudinal; CML: capa muscular circular; E: endometrio; EE: epitelio endometrial; L: luz del cuerno uterino; ME: mesometrio; BV: vasos sanguíneos. Barra de calibración para a: 100µm; para b, c, d, e, f: 50µm.

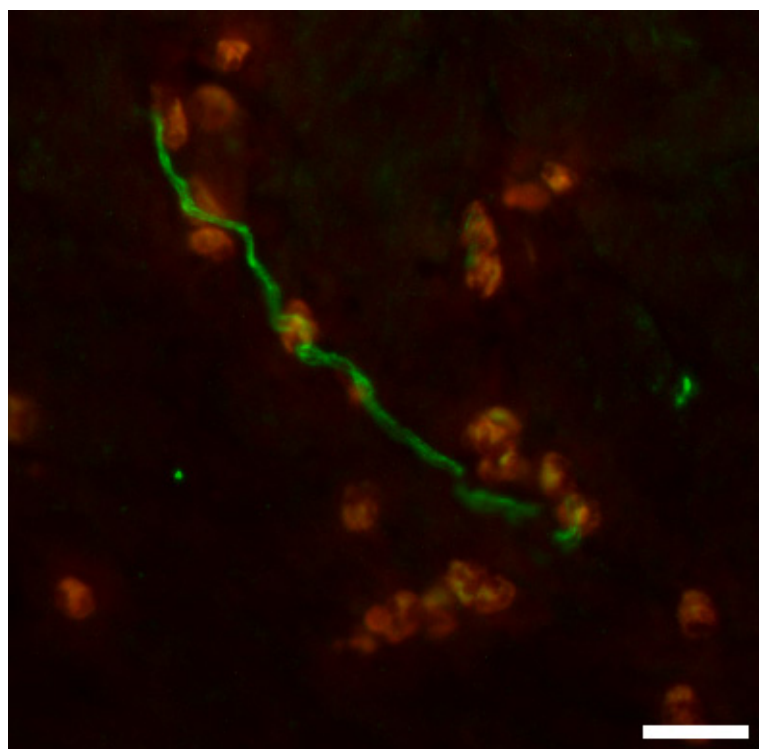


Figura 12. Asociación de leucocitos eosinófilos con nervios simpáticos. Falso color de un corte a congelación inmunomarcado para tirosina hidroxilasa (TH) mostrando en verde las fibras simpáticas y en rojo la fluorescencia intrínseca de los eosinófilos capturada en una longitud de onda diferente a la del anticuerpo secundario de la inmunofluorescencia (Filtro Nikon 2A). Numerosos leucocitos eosinófilos fueron observados muy próximos a las fibras simpáticas intrauterinas. Barra de calibración 20 μ m.

Inhibición de la vía COX Ni el inhibidor general de la vía COX, ni los inhibidores selectivos de las vías COX-1 y COX-2 lograron prevenir la pérdida de terminales nerviosas observada en respuesta al tratamiento con estrógeno, no observándose diferencias significativas en los valores de área nerviosa total entre el tratamiento con E y los tratamientos combinados (Tabla X). Tanto la inhibición de COX-1 como la inhibición de COX-2 contrarrestaron parcialmente el efecto trófico del E sobre la LML. IND, en cambio, potenció el efecto de la hormona sobre el crecimiento del miometrio uterino. A pesar de estas variaciones en los valores de área transversal de la capa muscular longitudinal, ninguno de los tratamientos modificó el porcentaje de área nerviosa respecto de los valores observados en respuesta al tratamiento con E (Tabla X).

Tabla X. Efecto del E y la inhibición de la vía de las ciclooxygenasas sobre los nervios simpáticos uterinos.

Tratamiento	%AN	ANT	Area LML
Control	3.10 $\pm$ 0.26	0.0013 $\pm$ 0.0001	0.04 $\pm$ 0.001
E	0.18 $\pm$ 0.02 ^a	0.0006 $\pm$ 0.0001 ^a	0.32 $\pm$ 0.016 ^a
E+IND	0.11 $\pm$ 0.01 ^a	0.0004 $\pm$ 0.0001 ^a	0.40 $\pm$ 0.024 ^{a,b}
E+SC560	0.15 $\pm$ 0.03 ^a	0.0003 $\pm$ 0.0001 ^a	0.20 $\pm$ 0.024 ^{a,b}
E+SC236	0.31 $\pm$ 0.03 ^a	0.0007 $\pm$ 0.0001 ^a	0.23 $\pm$ 0.020 ^{a,b}

Se muestra el porcentaje de área ocupada por nervios (%AN), el área nerviosa total (ANT, en mm²) y el área transversal de la capa muscular longitudinal (LML, en mm²), en la región cefálica del cuerno uterino de ratas prepúberes. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. Los datos fueron comparados utilizando el test de Dunnett. Los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. a: diferencia significativa con el control, b: diferencia significativa con E.

Inhibición de la vía LOX La co-administración de E y CJ previno parcialmente el efecto trófico del E sobre el área de la capa miometrial longitudinal, sin afectar el porcentaje de área nerviosa. El valor de área nerviosa total no mostró variaciones significativas respecto del valor alcanzado luego del tratamiento con estrógeno (Tabla XI).

Tabla XI. Efecto del E y la inhibición de la vía de la lipooxigenasa sobre los nervios simpáticos uterinos.

Tratamiento	%AN	ANT	area LML
Control	3.10 $\pm$ 0.26	0.0013 $\pm$ 0.0001	0.04 $\pm$ 0.001
E25	0.18 $\pm$ 0.02 ^a	0.0006 $\pm$ 0.0001 ^a	0.32 $\pm$ 0.016 ^a
E+CJ	0.33 $\pm$ 0.04 ^a	0.0007 $\pm$ 0.0001	0.24 $\pm$ 0.024 ^{a,b}

Se muestra el porcentaje de área ocupada por nervios (%AN), el área nerviosa total (ANT, en mm²) y el área transversal de la capa muscular longitudinal (LML, en mm²), en la región cefálica del cuerno uterino de ratas prepúberes. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. Los datos fueron comparados utilizando el test de Dunnett. Los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. a: diferencia significativa con el control, b: diferencia significativa con E.

IV.2 Tratamientos a corto plazo

IV.2.1 Efectos generales

La administración aguda de E provocó un aumento significativo en el peso corporal de los animales. El mismo fue revertido totalmente por DEX, y de forma parcial por la co-administración del inhibidor de COX-2 (Tabla XII, XIII).

El peso húmedo del timo aumentó de forma significativa en respuesta al estradiol. Este aumento fue revertido de forma total o parcial por la co-administración tanto de DEX como de los distintos antiinflamatorios. El efecto más notorio sobre este parámetro se observó en respuesta al tratamiento de E+DEX, que redujo el peso corregido del timo incluso por debajo de los valores control.

El peso húmedo de las glándulas suprarrenales aumentó en respuesta a la administración de E, y este aumento sólo fue revertido de forma completa por la inhibición de la vía COX-1.

Al igual que en los tratamientos a largo plazo, los ovarios no mostraron señales de ovulación en respuesta a la administración aguda de estrógeno, dexametasona, e inhibidores de la síntesis de eicosanoides. El E provocó un descenso en el peso húmedo de los ovarios que no fue alterado por ninguno de los antiinflamatorios utilizados.

Tabla XII. Efecto de los tratamientos a corto plazo sobre el peso corporal, y los pesos húmedos de timo, glándulas suprarrenales y ovarios

Tratamiento	PESO	PESO TIMO	PESO SR	PESO OVARIOS
Control	39.5 ± 2.5	131.6 ± 6.5	8.3 ± 0.2	10.9 ± 0.5
E	57.4 ± 2.2 ^a	242.7 ± 6.8 ^a	10.2 ± 0.4 ^a	7.9 ± 0.4 ^a
E+DEX	38.2 ± 2.1 ^b	79.8 ± 3.0 ^{a,b}	11.0 ± 0.4 ^a	8.5 ± 0.7 ^a
E+IND	60.3 ± 3.7 ^a	127.9 ± 6.1 ^b	11.9 ± 0.7 ^a	7.5 ± 0.3 ^a
E+SC560	54.6 ± 0.5 ^a	131.5 ± 2.7 ^b	7.4 ± 0.7 ^b	7.7 ± 0.4 ^a
E+SC236	49.1 ± 1.2 ^{a,b}	171.3 ± 4.3 ^{a,b}	9.4 ± 0.3	7.0 ± 0.5 ^a
E+CJ	51.1 ± 1.4 ^a	125.0 ± 9.7 ^b	10.8 ± 0.5 ^a	7.7 ± 0.3 ^a

Se expresa el peso de los animales (g), y los pesos de los distintos tejidos (mg) normalizados a 50 gramos de peso corporal. Los valores se expresan como media ± SEM. Los datos fueron analizados utilizando un ANOVA de una vía seguido del test de Dunnett. a: diferencia significativa con el control, b: diferencia significativa con el estrógeno.

Tabla XIII. Resumen del efecto de los tratamientos a corto plazo sobre el peso corporal, y los pesos húmedos normalizados de timo, glándulas suprarrenales y ovarios.

Comparación	PESO	PESO TIMO	PESO SR	PESO OVARIOS
C vs. E	↑	↑	↑	↓
E vs. E+DEX	↓	↓	-	-
E vs. IND+E	-	↓	-	-
E vs. E+SC560	-	↓	↓	-
E vs. E+SC236	↓	↓	-	-
E vs. E+CJ	-	↓	-	-

Se esquematiza el cambio del E vs. el control; y el cambio de los tratamientos combinados vs. el E solo (E+AI vs. E). Se representan solamente las diferencias estadísticamente significativas.

IV.2.2 Efectos sobre el útero

Crecimiento uterino El estradiol provocó un aumento en los pesos húmedo y seco del cuerno uterino, sin alterar la relación entre estos parámetros. La co-administración de DEX o CJ, contrarrestó parcialmente el efecto trófico del E; mientras que IND previno completamente el incremento de pesos húmedo y seco, manteniéndose los valores similares a los del control. Ninguno de estos tratamientos alteró la razón PS/PH (Tablas XIV, XVI). Al evaluar el crecimiento uterino por compartimentos, se observó que el tratamiento con E provocó un aumento en las áreas transversales total, miometrial y endometrial. La dexametasona, así como los inhibidores de COX, COX-2 y LOX; previnieron de forma parcial el efecto del estrógeno (Tablas XV, XVI).

Tabla XIV. Efecto de los tratamientos a corto plazo sobre el útero.

Tratamiento	PESO HUMEDO	PESO SECO	RATIO PS/PH
Control	10.8 ± 0.7	2.0 ± 0.1	0.19 ± 0.02
E	38.0 ± 2.5 ^a	7.1 ± 0.5 ^a	0.19 ± 0.01
E+DEX	19.7 ± 2.6 ^{a,b}	3.2 ± 0.4 ^b	0.17 ± 0.03
E+IND	16.7 ± 1.3 ^b	3.8 ± 0.2 ^b	0.23 ± 0.01
E+SC560	37.0 ± 2.8 ^a	8.5 ± 1.0 ^a	0.23 ± 0.02
E+SC236	35.3 ± 1.5 ^a	6.1 ± 0.5 ^a	0.17 ± 0.01
E+CJ	24.9 ± 2.2 ^{a,b}	5.1 ± 0.4 ^{a,b}	0.21 ± 0.01

Se muestran los pesos del cuerno uterino entero (mg), normalizados a 50 gramos de peso corporal. Los valores se expresan como media ± SEM. Los datos fueron analizados utilizando un ANOVA de una vía seguido del test de Dunnett. a: diferencia significativa con el control, b: diferencia significativa con el estrógeno.

Tabla XV. Efecto de los tratamientos a corto plazo sobre las áreas transversales del cuerno uterino.

Tratamiento	AREA TOTAL	AREA ENDOMETRIO	AREA MIOMETRIO
Control	0.28 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.03
E	1.30 ± 0.09 ^a	0.82 ± 0.04 ^a	0.47 ± 0.06 ^a
E+DEX	0.68 ± 0.12 ^{a,b}	0.46 ± 0.10 ^{a,b}	0.22 ± 0.02 ^b
E+IND	0.57 ± 0.08 ^{a,b}	0.29 ± 0.04 ^b	0.27 ± 0.04 ^{a,b}
E+SC560	1.21 ± 0.07 ^a	0.75 ± 0.05 ^a	0.46 ± 0.03 ^a
E+SC236	0.84 ± 0.09 ^{a,b}	0.50 ± 0.06 ^{a,b}	0.34 ± 0.04 ^{a,b}
E+CJ	0.71 ± 0.07 ^{a,b}	0.42 ± 0.05 ^{a,b}	0.29 ± 0.02 ^{a,b}

Se muestran las áreas transversales (mm²) total, endometrial y miometrial. Los valores se expresan como media ± SEM. Los datos fueron analizados utilizando un ANOVA de una vía seguido del test de Dunnett. a: diferencia significativa con el control, b: diferencia significativa con el estrógeno.

Tabla XVI. Resumen del efecto de los tratamientos a corto plazo sobre el cuerno uterino.

Comparación	PESO HUMEDO	PESO SECO	Ratio PS/PH	AREA TOTAL	AREA ENDOMETRIO	AREA MIOMETRIO
C vs. E	↑	↑	-	↑	↑	↑
E vs. E+DEX	↓	↓	-	↓	↓	↓
E vs. E+IND	↓	↓	-	↓	↓	↓
E vs. E+SC560	-	-	-	-	-	-
E vs. E+SC236	-	-	-	↓	↓	↓
E vs. E+CJ	↓	↓	-	↓	↓	↓

Se esquematiza el cambio del E vs. el control; y el cambio de los tratamientos combinados vs. el E solo (E+AI vs. E).

Infiltración de leucocitos eosinófilos No se observó infiltración eosinofílica al tejido uterino en respuesta al tratamiento con 1µg de E. Por tal motivo, se analizó el efecto de una dosis de 2.5µg. Esta dosis tampoco provocó la infiltración de leucocitos eosinófilos al tejido a las 24 horas de su administración.

IV.2.3 Efectos sobre los nervios simpáticos

Estrógeno El patrón general de distribución de la inervación simpática no se vio alterado por el tratamiento con E. Se observaron cambios en la densidad de inervación miometrial, mientras que la inervación perivascular no se vio afectada en respuesta a ninguno de los tratamientos (Fig. 13c,e).

La administración de 1µg de E no afectó el área nerviosa total, en cambio provocó un aumento en el área de la capa muscular longitudinal de casi 3 veces respecto al valor control. Este

cambio resultó en una disminución del 52% en el porcentaje de área nerviosa (Fig. 13c, Tabla XVII). El tratamiento con una dosis de 2.5µg de E provocó un aumento del 46% en el área nerviosa total, y aumentó 2.3 veces el área de la LML; como consecuencia se observó un descenso del 39% en el porcentaje de área nerviosa (Fig. 13e, Tabla XVII). Dado que ninguna de las dosis de E utilizadas provocó una pérdida total de fibras nerviosas, se seleccionó para los tratamientos combinados con antiinflamatorios (excepto DEX) la dosis de 1µg, la cual provoca niveles plasmáticos de E dentro de rangos fisiológicos (Rhen et al., 2003).

Dexametasona La administración aguda de DEX no provocó cambios en el área nerviosa total ni en el porcentaje de área nerviosa ocupada por nervios simpáticos (Fig. 13b, Tabla XVII). La co-administración de DEX contrarrestó el aumento inducido por el tratamiento con 1µg de E en el área de la LML, sin afectar el área nerviosa total. Como resultado, la disminución del porcentaje de área nerviosa fue menor que en el tratamiento con E solo (29% respecto al control; Fig. 13d, Tabla XVII). Si bien esta disminución no mostró una diferencia significativa con el estrógeno, tampoco mostró una diferencia significativa con el control, sugiriendo un cierto efecto antagónico de DEX con el E. La co-administración de DEX inhibió el efecto del E2.5 sobre la inervación, al mismo tiempo que redujo su impacto sobre el área de la LML; como resultado, la disminución en el porcentaje de área nerviosa fue menor en el tratamiento combinado que en el tratamiento con estrógeno solo (29% respecto del control; Fig. 13f, Tabla XVII).

Tabla XVII. Efecto del tratamiento a corto plazo con E y dexametasona sobre los nervios simpáticos uterinos.

Tratamiento	%AN	ANT	área LML
Control	3.1 ± 0.2	0.0013 ± 0.0001	0.04 ± 0.001 (14)
DEX	3.2 ± 0.3	0.0014 ± 0.0001	0.04 ± 0.003 (8)
E	1.5 ± 0.3 ^{a,b}	0.0014 ± 0.0002	0.11 ± 0.012 (6) ^{a,b}
E+DEX	2.2 ± 0.2	0.0013 ± 0.0001	0.06 ± 0.007 (5) ^c
E _{2.5}	1.9 ± 0.2 ^{a,b}	0.0019 ± 0.0001 ^a	0.09 ± 0.005 (14) ^{a,b,d}
E _{2.5} +DEX	2.2 ± 0.2	0.0013 ± 0.0004	0.06 ± 0.004 (12) ^{a,c,e}

Se muestra el porcentaje de área ocupada por nervios (%AN), el área nerviosa total (ANT, en mm²), y el área transversal de la capa muscular longitudinal (LML, en mm²), en la región cefálica del cuerno uterino de ratas prepúberes. Los resultados se expresan como media ± SEM. Los datos fueron comparados utilizando el test de Tukey-Kramer para comparaciones múltiples. Los valores de p ≤ 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. E: 1µg; E_{2.5}: 2.5µg; DEX: 4mg/Kg. a: diferencia significativa con el control, b: diferencia significativa con DEX, c: diferencia significativa con E. d: diferencia significativa con E+DEX, e: diferencia significativa con E_{2.5}.

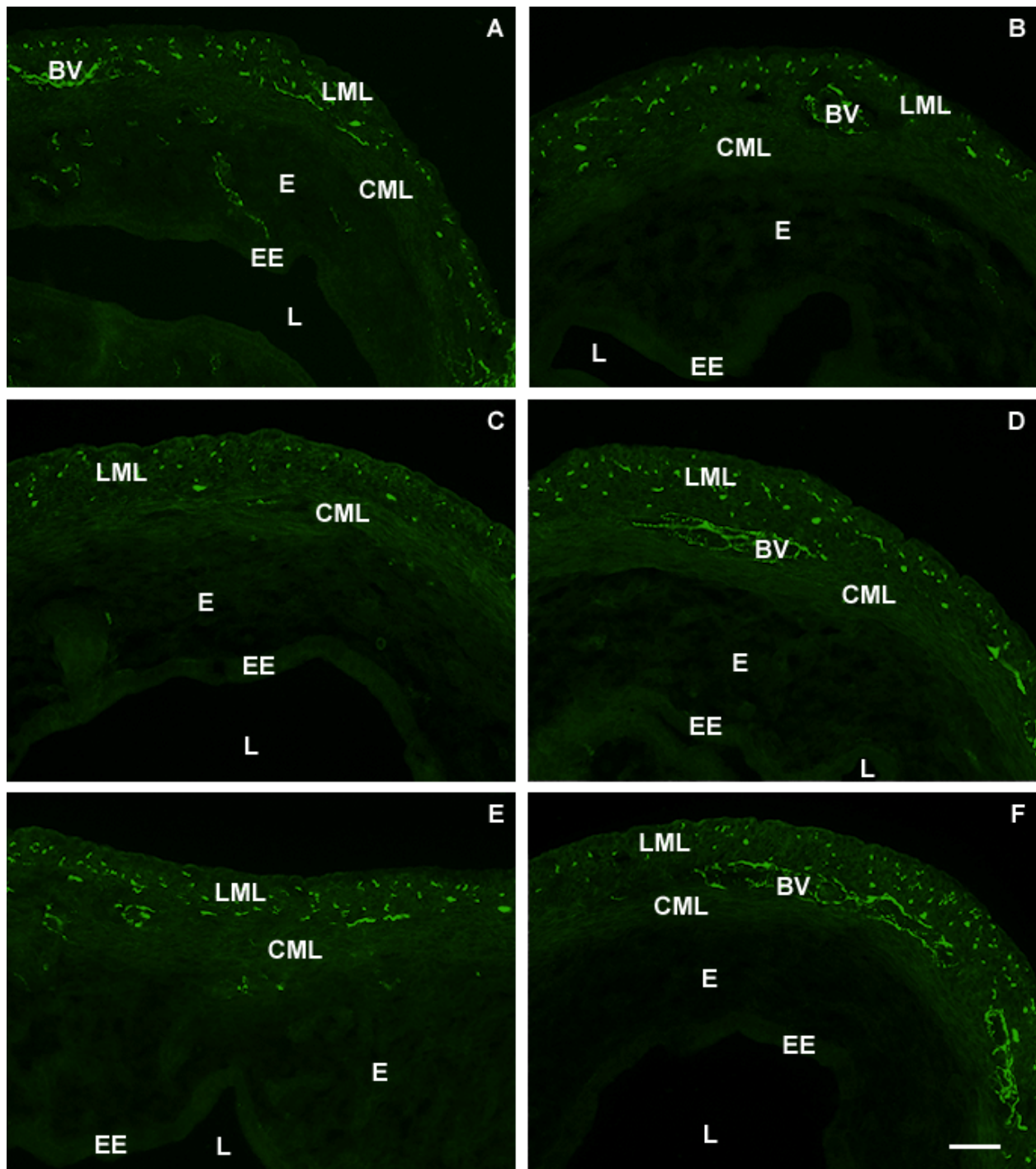


Figura 13. Efecto de los tratamientos a corto plazo con E y DEX sobre la innervación simpática uterina. Cortes a congelación transversales de la porción cefálica del cuerno uterino inmunomarcados para tirosina hidroxilasa. a: Control prepuber; b: DEX 4mg/Kg; c: E1 μ g; e: E2.5 μ g; d,f: combinación de ambos tratamientos con E y DEX. LML: capa muscular longitudinal; CML: capa muscular circular; E: endometrio; EE: epitelio endometrial; L: luz del cuerno uterino; BV: vasos sanguíneos. Barra de calibración 50 μ m.

Inhibición de la vía COX Al ser co-administrados con estrógeno, ninguno de los inhibidores utilizados provocó cambios en el área nerviosa total. Asimismo, ninguno de los fármacos logró prevenir el aumento en el área de la capa muscular longitudinal provocado por E. Contrariamente, la combinación E+SC560 provocó un aumento del 45% en el área de la capa muscular longitudinal por encima del valor del estrógeno, aunque dicho aumento no se vio reflejado en una disminución adicional significativa en el porcentaje de área nerviosa (Tabla XVIII).

Tabla XVIII. Efecto del E y la inhibición de la vía de las ciclooxygenasas sobre los nervios simpáticos uterinos.

Tratamiento	%AN	ANT	área LML
Control	3.10 ± 0.26	0.0013 ± 0.0001	0.04 ± 0.001
E	1.52 ± 0.35 ^a	0.0014 ± 0.0002	0.11 ± 0.012 ^a
E+IND	1.59 ± 0.11 ^a	0.0016 ± 0.0004	0.10 ± 0.019 ^a
E+SC560	1.13 ± 0.27 ^a	0.0017 ± 0.0004	0.16 ± 0.013 ^{a,b}
E+SC236	1.58 ± 0.10 ^a	0.0017 ± 0.0002	0.11 ± 0.013 ^a

Se muestra el porcentaje de área ocupada por nervios (%AN), el área nerviosa total (ANT, en mm²), y el área transversal de la capa muscular longitudinal (LML, en mm²) en la región cefálica del cuerno uterino de ratas prepúberes. Los resultados se expresan como media ± SEM. Los datos fueron comparados utilizando el test de Dunnett. Los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. a: diferencia significativa con el control, b: diferencia significativa con E.

Inhibición de la vía LOX La co-administración de E y CJ no tuvo un efecto sobre el área nerviosa total, ni sobre el área de la capa muscular longitudinal. Como resultado, el porcentaje de área nerviosa no sufrió variaciones respecto al tratamiento con E solo (Tabla XIX).

Tabla XIX. Efecto del E y la inhibición de la vía de la lipooxygenasa sobre los nervios simpáticos uterinos.

Tratamiento	%AN	ANT	area LML
Control	3.10 ± 0.26	0.0013 ± 0.0001	0.04 ± 0.001
E	1.52 ± 0.35 ^a	0.0014 ± 0.0002	0.11 ± 0.012 ^a
E+CJ	1.51 ± 0.21 ^a	0.0016 ± 0.0003	0.10 ± 0.006 ^a

Se muestra el porcentaje de área ocupada por nervios (%AN), el área nerviosa total (ANT, en mm²), y el área transversal de la capa muscular longitudinal (LML, en mm²), en la región cefálica del cuerno uterino de ratas prepúberes. Los resultados se expresan como media ± SEM. Los datos fueron comparados utilizando el test de Dunnett. Los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. a: diferencia significativa con el control, b: diferencia significativa con E.

V DISCUSION

V.1 Acciones generales de los tratamientos

El tratamiento a largo plazo con estrógeno provocó un aumento en el peso corporal de los animales, sin afectar de forma significativa el peso del timo, glándulas suprarrenales y ovarios. A corto plazo, el estradiol mostró un efecto más generalizado, provocando un aumento en el peso de los animales y los pesos de timo y glándulas suprarrenales, y una disminución significativa en el peso de los ovarios. Estas diferencias entre los tratamientos a corto y largo plazo, podrían estar dadas tanto por las dosis utilizadas como por el tiempo de tratamiento.

A largo plazo, la administración de los distintos antiinflamatorios en combinación con E tuvo un efecto heterogéneo, mostrando cambios diferenciales sobre los distintos órganos y parámetros evaluados. Interesantemente, a pesar de no ser modificados por el estradiol, distintos parámetros se vieron afectados en respuesta a algunos de los tratamientos combinados, lo que podría deberse a un efecto individual de la dexametasona y los distintos antiinflamatorios. El tratamiento combinado con DEX fue el que mostró un efecto más generalizado, afectando todos los parámetros analizados. La inhibición de COX-1 afectó el peso de los animales, así como los pesos de timo y glándulas suprarrenales; mientras que la inhibición general de COX y la inhibición de COX-2 solamente disminuyeron el peso de los ovarios. Por su parte, la inhibición de LOX disminuyó el peso de las SR y los ovarios.

En los tratamientos a corto plazo, los distintos antiinflamatorios mostraron diferente capacidad de contrarrestar los efectos generalizados que tuvo este régimen de administración de estradiol. Dex impidió por completo el aumento de peso corporal provocado por el estrógeno, y redujo el valor del peso del timo por debajo de valores control. La inhibición de las distintas vías de procesamiento del ácido araquidónico inhibió total o parcialmente el efecto trófico del estrógeno sobre el timo. La inhibición de COX-1 contrarrestó además el efecto del E sobre las glándulas suprarrenales, mientras que la inhibición de COX-2 inhibió parcialmente el aumento de peso corporal. Ninguno de los antiinflamatorios previno la disminución provocada por el estrógeno en el peso ovárico.

A nivel del timo, es sabido que las hormonas esteroideas tienen propiedades inmunomoduladoras, y se ha descrito que distintos esteroides afectan el proceso de maduración de los linfocitos T y producen la atrofia del timo, aunque el curso temporal de este proceso varía según el tipo de esteroide ([Silverstone et al. 1994](#)). Por otra parte, ha sido descrito que la inhibición de la vía de la lipoxigenasa previene la apoptosis de los timocitos en

respuesta a la radiación, mientras que la inhibición de las vías COX no tiene efecto ([Korystov et al., 1996](#)). Sin embargo, las ciclooxygenasas son expresadas en el timo donde cumplen roles diferentes en la maduración de los timocitos ([Rocca et al., 1999](#)). Es importante recordar que nuestros experimentos son llevados a cabo en el final del período prepuberal, donde una regresión del timo ocurre de forma fisiológica. Más aún, se ha descrito que las hormonas adrenales tienen un efecto atrófico sobre el timo, y que la ablación de las glándulas suprarrenales produce una hiperplasia del órgano ([Jaffe et al., 1924](#)); por lo que podrían existir efectos indirectos en aquellos tratamientos en los que un efecto sobre las glándulas suprarrenales es observado.

A nivel de las glándulas suprarrenales, ha sido descrito que experimentalmente, los estrógenos tienen un efecto dependiente del tipo particular de estrógeno administrado, la dosis utilizada y el contexto hormonal general. Por ejemplo, el estradiol aumenta la producción de corticosterona, mientras que la estrona aumenta el peso de las glándulas ([Itoh & Hirota, 1977](#)). Por otro lado, es importante recordar que los GC inhiben el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal a través de un mecanismo de retroalimentación negativo; y que existe interacción y regulación cruzada entre los ejes HHA y gonadal ([Whirledge & Cidlowski 2010, 2013](#)). Estas interacciones podrían ser responsables de los efectos del estrógeno y la DEX tanto sobre las glándulas suprarrenales y como sobre los ovarios.

Por su parte, las vías de procesamiento del ácido araquidónico han sido implicadas en la secreción de cortisol en respuesta a hormona adrenocorticotrópica ([Wang et al., 2000](#)); y a nivel del ovario se los ha implicado en la ovulación y luteólisis ([Sales & Jabbour 2003](#)). Si bien un análisis de los mecanismos por los cuales una intervención en las vías de síntesis de estos mediadores provoca un efecto sobre los tejidos estudiados excede los objetivos de la presente tesis; los resultados observados son consistentes con la presencia ubicua de los eicosanoides en el organismo y su regulación de múltiples procesos fisiológicos.

V.2 Efectos tróficos sobre el útero

V.2.1 Estrógeno y Dexametasona

En concordancia con lo reportado en la literatura ([Branham & Sheehan, 1995](#); [Rabin et al., 1990](#); [Sahlin, 1995](#)), el estrógeno provocó un consistente efecto trófico sobre el útero. Este efecto fue observado luego de los tratamientos a corto y largo plazo, afectando todos los parámetros analizados (pesos y áreas transversales). El tratamiento a largo plazo tuvo un efecto más pronunciado que el tratamiento a corto plazo, esto es consistente con el hecho de

que el efecto trófico del estrógeno sobre el útero es dependiente de la dosis ([Rabin et al., 1990](#)). Por otra parte, el estrógeno estimula el crecimiento uterino en dos fases denominadas respuestas temprana (2-6 horas) y tardía (24 horas), las cuales se corresponden con distintos perfiles de expresión génica ([Hewitt et al., 2003](#)). Nuestros experimentos fueron llevados a cabo al inicio de la respuesta tardía y luego de 6 días de establecida la misma, por lo que el tiempo de exposición a la hormona también podría explicar las diferencias entre los tratamientos a corto y largo plazo.

En nuestros estudios, la dexametasona tuvo un efecto trófico sobre el endometrio, tanto en el tratamiento a corto como a largo plazo (Datos no mostrados; ver Anexo Publicaciones [Bianchimano et al., 2007](#)). Si bien no observamos efectos sobre el miometrio, un trabajo previo mostró que el tratamiento a largo plazo con el glucocorticoide acetamida de triamcinolona potencia la proliferación de células miometriales inducida por el estrógeno en ratas ovariectomizadas ([Gunin et al., 2000](#)). Esto indica que al menos en algunas condiciones experimentales, los glucocorticoides pueden tener un efecto trófico sobre el tejido uterino.

En el corto plazo, la co-administración de DEX con estradiol, revirtió totalmente el efecto del E sobre el área miometrial; y parcialmente su efecto sobre las áreas endometrial y total, así como sobre los pesos húmedo y seco. Luego del tratamiento a largo plazo, la DEX no logró revertir el efecto trófico del E sobre el tejido uterino, evaluado en términos de pesos y áreas. De estos resultados surge que DEX tiene un mayor impacto sobre el efecto a corto plazo del estradiol, que sobre su efecto a largo plazo. Esta capacidad diferencial de antagonizar el efecto del estrógeno en los distintos tipos de tratamiento también podría estar relacionada tanto con el tiempo como con las dosis utilizadas de ambos esteroides.

Los glucocorticoides son capaces de antagonizar el efecto del estrógeno sobre la reproducción actuando directamente sobre el tejido uterino ([Gunin et al., 2000](#); [Rhen et al., 2003](#); [Whirledge & Cidlowski, 2013a](#)); donde la expresión de receptores ha sido reportada en todos los tipos celulares incluyendo los epitelios luminal y glandular, el estroma endometrial y el miometrio ([Rhen et al., 2003](#)). En particular, la capacidad de los glucocorticoides de inhibir el efecto trófico del estrógeno sobre útero ha sido ampliamente documentada ([Rabin et al., 1990](#); [Rhen et al., 2003](#); [Sahlin, 1995](#)). Por ejemplo, DEX atenúa la síntesis de IGF-I inducida por estrógeno en el útero de ratas ovariectomizadas sin afectar la inducción del receptor de estrógeno (ER) ([Sahlin, 1995](#)).

Existe una aparente discrepancia entre el efecto trófico de DEX cuando es administrada sola y su acción inhibitoria sobre los efectos tróficos del estrógeno. En este sentido, es importante

recordar que existen múltiples mecanismos de acción reportados tanto para los glucocorticoides como para el estrógeno, y que los efectos de ambas hormonas son altamente contexto-dependientes. Más aún, existen ejemplos de regulación directa y cruzada de estas hormonas sobre sus receptores. Por ejemplo, la administración de DEX es capaz de inhibir el aumento en la expresión de ER inducido por E en el útero de ratas castradas (Rabin et al., 1990). Finalmente, un estudio de microarreglos realizado en una línea celular de carcinoma endometrial humano (ECC1), mostró que existe un grupo de secuencias (más de 2500) que no son regulados por el tratamiento con estrógeno o dexametasona solos, pero que sin embargo, son regulados cuando ambas hormonas son administradas en conjunto (Whirlledge et al., 2013). Esto indica que el efecto combinado puede diferir ampliamente de lo esperado a partir de los efectos individuales, lo que añade un nivel más de complejidad a los mecanismos regulatorios conocidos. En este sentido, es importante recordar que si bien los niveles elevados de corticoides asociados con el estrés tienen un efecto negativo sobre la reproducción, los niveles fisiológicos de corticoides endógenos son esenciales en la regulación de la fisiología reproductiva (Whirlledge & Cidlowski 2010).

V.2.2 Inhibición de las vías de procesamiento del ácido araquidónico.

La capacidad de los inhibidores de COX y LOX de modificar las acciones tróficas del estrógeno sobre el útero fue muy variable. Al igual que en los tratamientos combinados con DEX, los distintos inhibidores fueron más eficientes en contrarrestar el efecto trófico del estrógeno en los tratamientos a corto plazo que en los tratamientos a largo plazo; esta observación resulta consistente con el hecho de que el efecto trófico del estradiol a largo plazo es más marcado que el efecto agudo.

El tratamiento a corto plazo con indometacina inhibió parcialmente el efecto trófico del estrógeno sobre el miometrio y endometrio uterinos. Este resultado contrasta con el efecto trófico reportado para la indometacina al ser administrada sola o en combinación con estrógeno en ratas ovariectomizadas (Puri et al., 1984). Sin embargo, el mismo trabajo muestra que la administración de IND no estimula el crecimiento uterino en ratas adultas cíclicas, sugiriendo que su efecto es dependiente del contexto hormonal general (Puri et al., 1984).

Si bien IND es un inhibidor general de COX con mayor afinidad por COX-1, es posible que el efecto observado en nuestro modelo se deba exclusivamente a la inhibición de COX-2, dado que el inhibidor selectivo de COX-1, no mostró efecto. En cambio, la inhibición de COX-2 contrarrestó el efecto trófico del estradiol sobre el endometrio en el tratamiento a corto plazo. En línea con este resultado, efectos tanto mitogénicos como anti-apoptóticos han sido descritos

para COX-2 en distintos modelos *in vitro* (Sales & Jabbour, 2003). Contrariamente, en el largo plazo, la inhibición de COX-2 no interfirió con el efecto del E.

Los resultados obtenidos para la inhibición de la vía de la lipooxigenasa son asimismo heterogéneos; mientras el tratamiento a corto plazo previene parcialmente el crecimiento uterino producido en respuesta al estrógeno, provocando un descenso en los pesos y áreas transversales, el tratamiento a largo plazo solo provoca un descenso significativo del peso húmedo y concomitante aumento de la relación PS/PH sin afectar las áreas transversales.

La presencia de ciclooxigenasas y lipooxigenasas ha sido descrita en el útero, y es sabido que su expresión se encuentra bajo regulación hormonal (Corriveau et al., 2010; Dong et al., 1996; Lee et al., 2005; Slater et al., 1999). Estas enzimas son responsables de la producción de varios metabolitos del ácido araquidónico, los cuales participan en la regulación de distintos aspectos de la fisiología reproductiva (Ricciotti & Fitzgerald, 2015; Sales & Jabbour 2003). Adicionalmente, efectos compensatorios entre distintas vías han sido descritos en células endometriales en cultivo (Pakrasi et al., 1985). En este contexto, factores como el tipo y selectividad del inhibidor utilizado, la dosis administrada y el tiempo en que se evalúa el efecto podrían contribuir a explicar el complejo perfil de respuesta observado luego de la inhibición de las distintas vías.

V.3 Efectos sobre la infiltración de leucocitos eosinófilos.

Distintos estudios han demostrado que la infiltración de eosinófilos en el útero se produce en condiciones fisiológicas, aumentando su conteo en respuesta al estrógeno y luego del apareamiento, descendiendo durante el período de implantación y a lo largo de la gestación, para volver a aumentar en etapas previas al parto. También en animales inmaduros o castrados, los niveles de eosinófilos se ven aumentados en respuesta al tratamiento con estrógeno (Robertson et al., 2000, Gouon-Evans & Pollard, 2001).

En nuestros experimentos, a las 24 horas de tratamiento, ninguna de las dosis de estrógeno utilizadas provocó la infiltración de leucocitos eosinófilos en el tejido uterino; contrastando con estudios previos en los que se ha reportado la presencia de eosinófilos a las 4 horas del tratamiento con la hormona (Rhen et al., 2003). En cambio, luego del tratamiento a largo plazo se observó una marcada infiltración eosinofílica en el tejido uterino, resaltando la importancia de la dosis así como del tiempo en las respuestas del útero a la hormona.

Los eosinófilos son reclutados hacia los tejidos por una variedad de factores quimiotácticos, de los cuales las quimioquinas de la familia de las eotaxinas y la IL-5 son selectivos para este tipo

celular. IL-5 es necesaria para la diferenciación, migración, activación y regulación de la supervivencia de los eosinófilos; y se ha reportado que el tratamiento con anticuerpos dirigidos contra dicha interleucina disminuye selectivamente el conteo de eosinófilos en la circulación sanguínea y su reclutamiento hacia distintos tejidos (Phipps et al., 2004), incluyendo el útero (Perez et al., 1996). También los ratones *knockout* para IL-5 presentan un conteo de leucocitos eosinófilos reducido en la circulación sanguínea y el tejido uterino (Robertson et al., 2000). Sin embargo, la actividad quimiotáctica del útero medida *in vitro* no se ve comprometida en ausencia de IL-5 (Perez et al., 1996), y aun se observan fluctuaciones de menor amplitud en el conteo de eosinófilos uterinos durante el ciclo sexual (Robertson et al., 2000), sugiriendo que IL-5 no es imprescindible para la infiltración eosinofílica uterina. La eotaxina, en cambio, parece ser clave en este proceso. Los niveles de ARN mensajero para la proteína aumentan durante el proestro y en respuesta al tratamiento con estrógenos en el útero de ratones salvajes, coincidiendo con la infiltración de leucocitos eosinófilos al tejido. Mientras que en ratones mutantes para eotaxina la depleción de eosinófilos en el tejido uterino es total, y ni el ciclo estral ni el tratamiento con estrógeno aumentan el conteo (Gouon-Evans & Pollard, 2001).

La función de los eosinófilos en la fisiología reproductiva no ha sido completamente elucidada. Ha sido ampliamente reportado que el tratamiento con estrógeno provoca cambios en la morfología uterina, aumento del peso húmedo y de la síntesis proteica; estos efectos de la hormona no se ven afectados en animales tratados con anticuerpos contra IL-5 o *knockout* para eotaxina (Gouon-Evans & Pollard, 2001; Perez et al., 1996). Asimismo, en los estudios llevados a cabo en ratones *knockout* para IL-5, ni el proceso de decidualización, ni el parto y la reparación uterina posterior al mismo se ven afectados en ausencia de la interleucina; por lo que los autores sugieren que los eosinófilos no serían imprescindibles para la remodelación tisular asociada a la gestación. Contrariamente, la duración del ciclo estral aumenta en estos ratones, sugiriendo un papel de estas células en los cambios asociados al ciclo sexual (Robertson et al., 2000). Sin embargo, en ratones *knockout* para eotaxina el establecimiento del ciclo estral así como la fecha del primer parto se retrasan respecto de los controles, aunque posteriormente los mutantes exhiben una fisiología reproductiva normal (Gouon-Evans & Pollard, 2001).

La capacidad de DEX de impedir la infiltración eosinofílica al tejido uterino luego del tratamiento con estrógeno había sido reportada previamente por Rhen y colaboradores (2003). Es sabido que los glucocorticoides son capaces de inhibir la transcripción tanto de IL-5 (Jee et al., 2005) como de eotaxina (Nie et al., 2005), pudiendo ser este el mecanismo por el cual el número de eosinófilos reclutados disminuye marcadamente luego del tratamiento con dexametasona. Además de las eotaxinas e IL-5, los eosinófilos son reclutados hacia los tejidos en respuesta a

otros factores quimiotácticos como la quimioquina RANTES, la proteína C5a (sistema del complemento), GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), y mediadores lipídicos como PAF (platelete activator factor) y algunos eicosanoides. En particular, se ha descrito la participación de PGD₂, LTB₄ y los CysLT LTC₄, LTD₄ y LTE₄ en la maduración, reclutamiento y activación de leucocitos eosinófilos, la cual puede ser directa o a través de la modulación de otras señales ([Luna-Gomes et al., 2013](#)).

Teniendo esta información en consideración, y sabiendo que tanto la expresión de COX y LOX como su regulación por el estrógeno varía entre los distintos compartimentos uterinos, es posible hipotetizar que la inhibición de las distintas vías de procesamiento del ácido araquidónico podría alterar de forma diferencial el perfil de eicosanoides producido en el miometrio y endometrio, alterando a su vez la distribución de los leucocitos eosinófilos.

V.4 Efectos del estrógeno y la dexametasona sobre la innervación simpática uterina

La administración de una única dosis de 1 µg de estradiol, provocó a las 24 horas una disminución en la densidad de nervios simpáticos en la capa miometrial longitudinal. Sin embargo, esta disminución no fue provocada por una pérdida “real” de fibras nerviosas sino por un aumento en el área miometrial que provocó una disminución en la densidad de fibras, resultado de la distribución de un número constante de fibras en un área mayor de tejido. Contrariamente, el tratamiento a largo plazo provocó una pérdida “real” de terminales nerviosas, la que fue demostrada por una disminución significativa en el área nerviosa total. Estos resultados confirman y extienden observaciones previas de nuestro y otros grupos ([Brauer et al. 1995](#); [Zoubina & Smith 2001](#))

La dexametasona administrada aisladamente también mostró efectos diferenciales dependiendo del tiempo de tratamiento analizado. Así, mientras que la administración aguda no tuvo efecto sobre la densidad ni cantidad total de fibras nerviosas; el tratamiento a largo plazo provocó un marcado aumento en el área nerviosa total, sugiriendo un efecto promotor del crecimiento de los axones simpáticos intrauterinos.

También al co-administrar E con DEX se observaron diferentes resultados dependiendo del protocolo utilizado. Así en el corto plazo, DEX no modificó los efectos del estrógeno sobre los nervios uterinos. Contrariamente, en el largo plazo, DEX previno completamente la pérdida de fibras nerviosas inducida por el estrógeno, lo cual se reflejó en un número total de fibras (área nerviosa total) similar al cuantificado en los animales control.

En su conjunto, los resultados presentados constituyen la primera evidencia de una acción proneuritgénica de la dexametasona sobre las fibras nerviosas simpáticas uterinas, así como la existencia de un efecto neuroprotector de este glucocorticoide frente a la degeneración de terminales nerviosas inducida por el estrógeno.

No es claro aún cuáles son los mecanismos a través de los cuales DEX ejerce estos efectos, particularmente considerando la expresión ubicua de los receptores para glucocorticoides. Por este motivo, la discusión se centrará en un posible efecto directo de DEX sobre las neuronas simpáticas de proyección al útero y un posible efecto indirecto a través de cambios en la capacidad neuritogénica del tejido uterino.

Efectos sobre las neuronas Si bien no existen trabajos que reporten la presencia de receptores para glucocorticoides o mineralocorticoides en la subpoblación de neuronas simpáticas que proyectan al útero, se ha descrito la expresión de GRs en neuronas de ganglio cervical superior (Bohn et al., 1998). Por otra parte, se ha descrito que el estrés afecta la expresión y actividad de las enzimas de síntesis de noradrenalina, así como la expresión de neuropéptido Y y proencefalina en el ganglio cervical superior e inferior y la médula adrenal (Micutkova et al., 2003; Nankova et al., 1996). Este efecto es mimetizado por la administración de glucocorticoides exógenos y estudios *in vitro* señalan que sería resultado de una acción directa de los GCs sobre las neuronas (Nankova et al., 1996). Más aún, se ha demostrado la presencia de un elemento de respuesta a GCs en el promotor del gen de la tirosina hidroxilasa del ratón (Hagerty et al., 2001).

En el SNC, se han descrito propiedades neuroprotectoras de los glucocorticoides a través de la activación de GR en algunos tipos neuronales. Un estudio mostró que la administración de DEX es capaz de aumentar la sobrevivencia en cultivos de neuronas corticales e hipocampales privadas de factores neurotróficos, a través de la activación del receptor TrkB; y que esta activación también es observada *in vivo* (Jeanneteau et al., 2008). Además, los niveles basales de glucocorticoides promueven la sobrevivencia de neuronas hipocampales a través de la activación del receptor de mineralocorticoides (Almeida et al., 2000). Cabe destacar, sin embargo, que DEX no tiene efecto mineralocorticoide (Stahn & Buttgereit, 2008; Zoorob & Cender, 1998), por lo que esta vía de acción no estaría involucrada en nuestro modelo.

Otra posibilidad, no excluyente con la anterior, es la existencia de un efecto antagónico entre el estrógeno y DEX a nivel de las neuronas o terminales nerviosas simpáticas. Se ha reportado que el estrógeno modula la expresión de enzimas de síntesis de catecolaminas inducida en respuesta al estrés en la médula adrenal y el locus coeruleus (Serova et al., 2005). Más aún, se

han demostrado diferencias de género en la respuesta al estrés, y las mismas se vinculan con la acción del estrógeno (McEwen 1999). En este sentido, es importante mencionar que las neuronas simpáticas de proyección uterina expresan receptores a estrógeno (Zoubina & Smith 2002), y se ha demostrado que esta hormona altera la expresión y balance relativo de los receptores TrkA y p75, potencialmente afectando la sensibilidad de estas neuronas al NGF y otras neurotrofinas y pro-neurotrofinas (Hasan et al., 2005; Richeri et al., 2005).

Efectos mediados a través del tejido efector Como se mencionara anteriormente, la dexametasona podría antagonizar el efecto neurodegenerativo del estrógeno actuando a nivel del tejido uterino. Esta posibilidad encuentra un fuerte sustento en estudios previos de nuestro y otros grupos que señalan el papel clave jugado por el efector uterino en la regulación de la plasticidad de su inervación simpática (Brauer y Smith, 2015; Brauer, 2016).

Dado que la capacidad de regular la expresión génica es un mecanismo de acción central de los esteroides, algunos trabajos se han enfocado en la búsqueda de genes diferencialmente regulados por el estrógeno y la dexametasona, que puedan explicar sus efectos antagónicos sobre el tejido uterino. Un estudio reciente analizó el efecto de los tratamientos con estas hormonas sobre la expresión génica en una línea celular endometrial utilizando la técnica de *microarrays* (Whirlledge et al., 2013). Este estudio mostró que la expresión de NFκB1A es reprimida por E, e inducida por el tratamiento combinado de E más DEX o en respuesta al tratamiento aislado con DEX. NFκB1A funciona inhibiendo NFκB, un factor de transcripción que regula la expresión de múltiples genes pro-inflamatorios, propagando así la respuesta inflamatoria. Esta vía ha sido asociada tanto a la acción de estrógenos (Cerillo et al., 1998) como a los mecanismos anti-inflamatorios de los corticoides (Auphan et al., 1995).

Otra proteína surgida del *screening* realizado por Whirlledge y colaboradores es RBM24, la cual cumple una función en la regulación de la estabilidad de ciertos ARNm, y es regulada antagónicamente por E y DEX en un mecanismo dependiente de ambos receptores (Whirlledge et al., 2013). En este sentido, cabe recordar que la expresión de algunas proteínas implicadas en la respuesta inflamatoria, tales como COX-2, es regulada a nivel de la estabilidad del ARN mensajero. RBM24, junto con NFκB, constituyen ejemplos en los que la regulación de la expresión de una única proteína puede actuar como nodo o punto de coordinación regulando a su vez la función de múltiples mediadores inflamatorios. En línea con esta idea, un estudio reciente mostró que el estrógeno inhibe la expresión de GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper) inducida por DEX en una línea celular endometrial y úteros de ratón (Whirlledge & Cidlowski 2013b). Dicho factor de transcripción media algunas de las funciones de los

glucocorticoides sobre el sistema inmune. Asimismo, E y DEX regulan de forma antagónica la expresión y actividad de algunas de las proteínas del sistema del complemento en el útero de ratas prepúberes intactas (Rhen & Cidlowski, 2006).

Aunque de forma indirecta, estos datos apoyan la idea de que la inhibición de la respuesta inflamatoria podría ser uno de los mecanismos a través de los cuales la dexametasona previene la degeneración de los nervios uterinos iniciada por el estrógeno.

Como se mencionara, actualmente se reconoce la participación de la inflamación en algunas situaciones patológicas tanto en el sistema nervioso central como en la periferia. En particular, en la artritis reumatoidea, la inflamación articular se correlaciona con una disminución en las fibras simpáticas en las articulaciones afectadas. Es sabido que niveles fisiológicos bajos de NA se asocian con un efecto pro-inflamatorio del sistema nervioso simpático, mediado a través de la activación de receptores α -adrenérgicos (Straub 2007). Esto llevó a postular que la reducción en la densidad de fibras simpáticas exacerbaría la inflamación, iniciando un *loop* que haría crónico el proceso inflamatorio. Interesantemente, en esta patología se detecta un aumento en la densidad de fibras sensoriales inmunorreactivas para sustancia P (Miller et al., 2000), provocando un desbalance simpático/sensorial que favorece la inflamación crónica y la generación de dolor. Además de la pérdida de terminales simpáticas, el tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoidea se caracteriza por una mayor presencia de mediadores inflamatorios como IL-6, IL-8 y TN; elevada producción de NGF (Wu et al., 2000); mayor presencia de células positivas para BDNF (Weidler et al., 2005). Asimismo, se ha descrito la presencia de algunas semaforinas como Sema4D y Sema3C (Miller et al., 2004), de las cuales Sema3C es un repelente conocido de fibras simpáticas.

La respuesta uterina al estrógeno comparte varios de los elementos que caracterizan a la artritis reumatoidea. En el útero, el estrógeno desencadena una marcada respuesta inflamatoria (Rhen et al., 2003; Stewart et al., 1985), provoca un aumento en los niveles de NGF (Bjorling et al., 2002; Chalar et al., 2003; Krizsan-Agbas et al., 2003) y BDNF (Krizsan-Agbas et al., 2003). Como se discute en un capítulo posterior, la presencia de algunos miembros de la familia de las semaforinas - sema3A, sema3F, sema3G, sema4B- ha sido reportada en el útero tanto en humanos como en ratas; donde su expresión aumenta en respuesta al tratamiento con estrógeno (Marzioni et al., 2004; Richeri et al., 2008, 2011). Finalmente, es importante destacar que el tratamiento con estrógeno afecta de forma diferencial las terminales simpáticas (Brauer et al., 1995; Chavez-Genaro et al., 2002), provocando un desbalance simpático/sensorial a favor de las fibras sensoriales, menos sensibles a la acción de la hormona (Chalar et al 2003). Desbalances similares se detectan

asimismo en la endometriosis, una patología inflamatoria crónica regulada por el estrógeno (Bruner-Tran et al., 2014).

V.5 La inhibición de las vías de procesamiento del ácido araquidónico no afecta la degeneración de la innervación uterina inducida por estrógeno

Con el fin de valorar la contribución de la inflamación y adelantar en la identificación de algunas de las posibles vías inflamatorias implicadas, recurrimos a la estrategia de utilizar inhibidores selectivos de la síntesis de eicosanoides.

En contraste con el efecto neuroprotector de la dexametasona, ninguno de los tratamientos con inhibidores de ciclooxigenasas o lipooxigenasas logró prevenir la neurodegeneración provocada por el tratamiento a largo plazo con estrógeno. Esto podría indicar que el efecto neuroprotector de la dexametasona no está relacionado con su capacidad de inhibir la respuesta inflamatoria en el tejido uterino. Es importante recordar que en su calidad de factores de transcripción, los GR unidos a ligando tienen el potencial de regular la expresión de múltiples genes blanco tanto en el tejido uterino como en sus neuronas de proyección; lo cual se suma a una variedad de efectos no-genómicos descritos para los GC (Stahn & Buttgereit, 2008). Todos estos mecanismos, que no han sido exhaustivamente estudiados en el tejido uterino, podrían subyacer al efecto neuroprotector de DEX en nuestro modelo de trabajo.

Una interpretación alternativa de nuestros resultados, es que ninguno de los anti-inflamatorios utilizados resulta tan eficiente como la DEX en la inhibición de la respuesta inflamatoria; posibilidad consistente con el hecho de que los glucocorticoides son los antiinflamatorios más potentes conocidos. Los mismos inhiben de la actividad de PLA₂ activando la lipocortina a través de mecanismos genómicos y no genómicos; y antagonizan el efecto que tienen los estímulos inflamatorios sobre la estabilización del mensajero de ciclooxigenasa-2 (Croxtall et al., 2000; Kassel et al., 2001; Saklatvala, 2001). Sin embargo, estos efectos asociados con la síntesis de eicosanoides son sólo algunos de los múltiples mecanismos anti-inflamatorios de los glucocorticoides. Además de inhibir la síntesis de una variedad de mediadores inflamatorios al interferir con vías inflamatorias centrales como las vías AP-1 y NFκB, DEX promueve la síntesis de moléculas con efecto anti-inflamatorio que son componentes fundamentales de su mecanismo de acción (Adcock, 2001; Saklatvala, 2001).

Otro punto a considerar, es que dado que el ácido araquidónico es el sustrato común para las distintas COX y LOX, la inhibición de una vía de procesamiento aumenta los niveles de sustrato

disponible para ser procesado por otra vía. Esto fue demostrado en ratones *knockout* para la enzima activadora de LOX (FLAP), los cuales presentan mayores niveles de prostanoïdes en la orina que los ratones salvajes utilizados como control (Yu et al., 2012). Este efecto ha sido descrito también en células endometriales de conejo en cultivo, en las que la inhibición farmacológica de COX con indometacina provoca un aumento en la producción de 5-HETE; mientras que la inhibición de LOX con NDGA provoca un aumento en los niveles de PGE y PGF (Pakrasi et al., 1985). Si bien el cambio en el balance de mediadores producidos podría cambiar las características de la respuesta inflamatoria, también se ha demostrado que existe redundancia o solapamiento de funciones entre los productos de distintas vías, e incluso activación cruzada de receptores (Ricciotti & FitzGerald, 2011; Wang et al. 2004). Por último, el ácido araquidónico libre puede sufrir reacciones de peroxidación catalizadas por radicales libres, produciendo isoprostanos, los cuales son dañinos para el tejido nervioso (Nam 2011), además de funcionar como agonistas de receptores de tromboxanos (Ricciotti & FitzGerald, 2011).

Es importante recordar además, que aunque la inhibición de distintas vías de procesamiento del ácido araquidónico tiene un efecto antiinflamatorio y neuroprotector en algunos casos, el resultado de la inhibición de COX y LOX es altamente dependiente de contexto. La evidencia disponible sugiere que los efectos de los eicosanoides son dependientes de múltiples factores, como el perfil de mediadores producido, la enzima que los produce, el receptor o receptores activados, el modelo o situación fisiológica o patológica, el estímulo que desencadena la respuesta, y los distintos tipos de células inmunes presentes en la región inflamada (Chen et al., 2008; Gilroy et al., 1999; Ochi et al., 2003; Serhan et al., 2010). A su vez, estos parámetros pueden influenciarse entre ellos, y variar durante el transcurso de la respuesta inflamatoria aumentando la complejidad del perfil de respuesta (Ricciotti & FitzGerald, 2011).

A modo de ejemplo, mientras clásicamente se aceptaba que COX-1 era la isoforma de expresión constitutiva y COX-2 la isoforma inducible, actualmente se reconoce que ambas COX pueden producir prostanoïdes con funciones de mantenimiento así como contribuir a la producción de mediadores en respuesta a un estímulo inflamatorio. En particular, el útero constituye un ejemplo de la participación de los metabolitos de COX-2 en la fisiología normal, dado que en ratones, la delección de esta isoforma pero no de COX-1 provoca fallas en la fertilización, implantación y decidualización (Lim et al., 1997).

Finalmente, es importante tener en cuenta que la estrategia experimental utilizada consiste en una inhibición farmacológica sistémica, por lo que el efecto de los tratamientos es resultado de la inhibición de las enzimas en las células inmunes residentes y reclutadas, así como en el

tejido uterino y sus neuronas de proyección. En este sentido, se hipotetiza que los resultados contradictorios obtenidos en respuesta a la utilización de antiinflamatorios no esteroideos en ensayos clínicos con pacientes y modelos animales de Parkinson y Alzheimer, podrían estar relacionados con los efectos contradictorios de inhibir las enzimas en distintos tipos celulares ([McGeer & McGeer, 2001](#); [Heneka et al., 2015](#)).

En el útero, la presencia de ciclooxigenasas ha sido reportada en varias especies de mamífero, y existe evidencia que señala que la expresión de ambas isoformas es regulada por las hormonas sexuales ([Corriveau et al., 2010](#); [Dong et al., 1996](#); [Lee et al., 2005](#); [Slater et al., 1999](#)). Las características de esta regulación varían de acuerdo a la región uterina y entre especies. Aunque no existen reportes sobre la expresión de COX y LOX en neuronas de proyección al útero, la expresión de COX-2 ha sido reportada en algunos tipos neuronales en el CNS ([Kaufmann et al., 1996](#); [Yamagata et al., 1993](#)).

Al mismo tiempo, la inhibición de la actividad de ciclooxigenasas y lipooxigenasas tendrá como resultado cambios en el perfil de mediadores lipídicos en el micro-ambiente uterino, los cuales actúan de forma autócrina y parácrina, pudiendo ejercer sus efectos sobre el tejido uterino y las terminales nerviosas, así como sobre las células inmunes presentes. Se ha descrito la presencia de receptores de prostanoideos en miometrio uterino ([Cao et al., 2006](#)), donde participan en la regulación de la contractilidad miometrial. Asimismo, se ha descrito la presencia de receptores de PGE (EP₃) y TX (TP) en las terminales simpáticas que inervan la capa muscular longitudinal del útero en el cerdo, y la activación de los mismos se asocia con una disminución en la liberación de noradrenalina y de la contractilidad miometrial ([Cao et al., 2008](#)).

En su conjunto, los ejemplos de la literatura presentados dan una idea de la complejidad de las funciones de los eicosanoides y muestra la dificultad en predecir el resultado que tendrá la inhibición de una vía en un determinado contexto fisiológico o experimental. Sin embargo, creemos que la aproximación utilizada en nuestros estudios fue apropiada para avanzar en la comprensión del papel de la inflamación en nuestro modelo. Los resultados obtenidos en nuestros ensayos sugieren que las vías analizadas de forma individual no serían el único o principal contribuyente al proceso neurodegenerativo iniciado por el estrógeno en el útero. Sin embargo, no descartan una posible participación de la respuesta inflamatoria, ni la participación de las vías estudiadas en el contexto de un proceso inflamatorio global.

V.6 Eosinófilos y la neurodegeneración simpática del útero

A pesar de que tanto la infiltración de leucocitos eosinófilos como la remodelación de la inervación simpática uterina en respuesta al estrógeno son fenómenos descritos décadas atrás, no existen hasta el momento reportes vinculando ambos eventos.

Nuestros experimentos mostraron que a corto plazo, el tratamiento con 1 μg de E no provocó la infiltración de eosinófilos ni provocó la degeneración de terminales nerviosas simpáticas. Más aún, paradójicamente, la administración de una única dosis de 2.5 μg de E, la cual tampoco indujo la entrada de eosinófilos al útero, promovió el crecimiento de los axones simpáticos uterinos. Contrariamente, la exposición a largo plazo al E provocó una masiva infiltración de leucocitos eosinófilos y una concomitante degeneración nerviosa simpática.

En el tratamiento a largo plazo, la co-administración de E y DEX redujo marcadamente la infiltración eosinofílica y previno la degeneración de las terminales nerviosas intrauterinas. Contrariamente, ninguno de los tratamientos con inhibidores de la vía de procesamiento del ácido araquidónico disminuyó significativamente la densidad de eosinófilos en el útero ni previno la neurodegeneración iniciada por la exposición a largo plazo al estrógeno. Estos resultados, aunque de naturaleza correlativa, sustentan la posibilidad de que alguna molécula secretada por los leucocitos eosinófilos participe en la degeneración de la inervación simpática uterina en respuesta al estrógeno.

La naturaleza de las señales producidas por los eosinófilos que podrían mediar este efecto neurodegenerativo aún no son claras. Sin embargo, es sabido que los eosinófilos liberan una variedad de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento. Contienen también gránulos ricos en proteínas catiónicas como la peroxidasa eosinofílica, proteína mayor básica, neurotoxina derivada de eosinófilos y proteína catiónica eosinofílica; que son responsables del daño tisular observado en los tejidos con respuestas inflamatorias activas infiltrados por estas células ([Davoine & Lacy, 2014](#)). Relevante para nuestra propuesta es que algunos de estos mediadores pueden afectar a las neuronas. Se ha observado que en co-cultivos de eosinófilos humanos con células de neuroblastoma humano IMR32 diferenciadas en un fenotipo parasimpático; el contacto y degranulación de los eosinófilos induce la liberación de acetilcolina ([Durcan et al., 2005](#)), al tiempo que modula la expresión y actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo del neurotransmisor ([Sawaksty et al., 2003](#)).

Más aún, en células IMR32 en proceso de diferenciación, los eosinófilos inhiben la extensión neurítica e incluso son capaces de inducir la retracción de neuritas tanto en estas células como

en neuronas parasimpáticas en cultivo (Kingham et al., 2003). Estos leucocitos también son capaces de modular la actividad de neuronas sensoriales en cultivo, aumentando la liberación de sustancia P de neuronas de ganglio de la raíz dorsal, efecto que es mimetizado por el agregado de proteína mayor básica al medio de cultivo (Garland et al., 1997).

V.6.1 Eosinófilos y semaforinas

Estudios recientes de nuestro grupo mostraron mediante ensayos de hibridización *in situ*, que los leucocitos eosinófilos que ingresan al útero en respuesta al estrógeno, expresan ARNm para dos semaforinas secretadas del grupo 3, Sema3F y Sema3A (Richeri et al., 2008, 2011).

Sema3F causa la repulsión y el colapso de los axones simpáticos (Chen et al., 1998, 2000; Damon, 2006; Fassold et al., 2009; Fassold & Straub, 2010; Giger et al., 1998; Ieda & Fukuda, Miller et al., 2004); mientras que Sema 3A, ejerce efectos similares sobre los nervios simpáticos y sensoriales. Más aún, las fibras nerviosas y somas de las neuronas simpáticas que proyectan al útero expresan los receptores neuropilina 1 y 2 los cuales median los efectos de estas semaforinas. Cabe mencionar que en las neuronas simpáticas, Sema3F puede antagonizar la señalización del NGF mediada por el receptor TrkA (Atwal et al., 2003). Esta interacción puede ser relevante en nuestro modelo, dado que en el útero la neurodegeneración de los nervios simpáticos ocurre en presencia de niveles elevados de NGF (Bjorling et al., 2002; Chalar et al., 2003; Krizsan-Agbas et al., 2003). Más aún, un estudio ha demostrado que el receptor para las neurotrofinas p75 es necesario para las repuestas de colapso provocadas por Sema 3A y Sema 3F en las neuritas simpáticas *in vitro* (Naska et al., 2010). Esto es relevante, dado que el estrógeno aumenta la expresión del receptor p75 en las neuronas simpáticas de proyección uterina (Richeri et al., 2005).

La presencia de Sema3C fue demostrada en los macrófagos presentes en el tejido sinovial de los pacientes afectados de artritis reumatoidea. Más aun se postula que la misma podría estar directamente implicada en la pérdida inicial de terminales noradrenérgicas (Miller et al., 2004), implicando a la inflamación en la pérdida de terminales simpáticas en las articulaciones a través de la liberación de señales neurorepulsivas por parte de células inflamatorias.

Finalmente, es importante considerar que además de su rol central en el guiado axonal y el desarrollo del sistema nervioso; las semaforinas participan de la regulación de otros procesos como la organogénesis, angiogénesis, y en particular se las ha asociado a funciones inmunes (Pasterkamp & Kolodkin, 2003). Varias semaforinas han sido implicadas en la regulación procesos esenciales como migración de células inmunes, interacciones célula-célula

responsables de la diferenciación y activación celular, y secreción de citoquinas. Semaforinas y receptores son expresados por distintos tipos de células inmunes así como por otros tipos celulares como fibroblastos y células epiteliales; funcionando como inmunomoduladores o como activadores del sistema inmunitario en distintos contextos ([Roney et al., 2013](#)).

Por ejemplo, se atribuye un rol inmunomodulador a Sema3A, el cual se ve afectado en algunas patologías. En pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales, el número de linfocitos T reguladores positivos para Sema3A es menor que en los controles, y correlaciona negativamente con la severidad de la enfermedad ([Vadasz et al., 2015](#)). Asimismo, los niveles bajos de Sema3A detectados en pacientes con lupus y artritis reumatoidea, se asocian a fallas en la capacidad de linfocitos T reguladores de controlar linfocitos T efectores ([Catalano, 2010](#); [Takagawa et al., 2013](#)). Contrariamente, los niveles de sema4D se encuentran elevados en el plasma sanguíneo y líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoidea; y muestran una correlación positiva con la severidad de la patología ([Yoshida et al., 2015](#)).

In vitro, el tratamiento de células mononucleares derivadas de sangre periférica o monocitos CD14+ de estos pacientes con Sema4D, induce la síntesis de IL-6 y TNF α en un mecanismo mediado por el receptor CD72. Completando el ciclo, IL-6 y TNF α inducen la síntesis de ADAMTS-4, la cual provoca el clivaje de sema4D de membrana, aumentando los niveles de proteína soluble. Finalmente, el tratamiento con un anticuerpo de bloqueo contra sema4D produce mejoras en parámetros funcionales e histológicos en el modelo murino de artritis inducida por inyección intra-articular de colágeno ([Yoshida et al., 2015](#)).

Estos resultados apoyan la idea de que las semaforinas pueden funcionar como verdaderos mediadores inflamatorios, promoviendo la síntesis de citoquinas y participando del *loop* de amplificación de la respuesta. Esta es una posibilidad interesante en el contexto de nuestro modelo, al constituir un posible vínculo entre distintos mediadores que estarían implicados en el proceso neurodegenerativo iniciado por el estrógeno.

Tomados en su conjunto, los resultados obtenidos de esta parte de la Tesis apoyan la idea de que la respuesta inflamatoria que el estrógeno provoca en el útero podría aportar mediadores moleculares con efectos inhibitorios y neurodegenerativos para los nervios simpáticos. Los leucocitos eosinófilos que infiltran el útero en respuesta al estrógeno surgen como candidatos interesantes como células inflamatorias productoras de estos mediadores. En este marco, el proceso inflamatorio y sus mediadores asociados emergen como un nuevo componente del complejo sistema multifactorial de mecanismos que regulan la plasticidad de los nervios simpáticos del útero en respuesta al estrógeno.

CAPITULO II

Matriz Extracelular

I ANTECEDENTES PARTICULARES

I.1 La matriz extracelular en el guiado axonal

La matriz extracelular es el componente acelular de los tejidos y órganos, y tiene como función proporcionar un entorno físico y químico apropiado, fundamental para el desarrollo y homeostasis tisular. La misma está compuesta por una mezcla de proteínas fibrosas como laminina, fibronectina, distintos tipos de colágeno (COL), tenascina y elastina; y distintas clases de proteoglicanos ([Frantz et al., 2010](#)).

En el sistema nervioso en desarrollo, además de constituir un soporte físico, la matriz extracelular aporta señales moleculares capaces de influenciar la neurogénesis, gliogénesis, sinaptogénesis, migración celular, crecimiento y guía axonal, y la formación de ramificaciones ([Soleman et al 2013](#)). Existen componentes de la MEC que son típicamente promotores del crecimiento axonal, tales como laminina, fibronectina y colágeno; mientras que otros como los condroitín-sulfato proteoglicanos (CSPGs) son generalmente inhibitorios; sin embargo, algunas moléculas como la tenascina, netrina y relina tienen efectos atractivos o repulsivos dependiendo de contexto ([Anton et al., 1994](#); [Becker & Becker, 2002](#); [de Curtis, 1991](#); [Landolt et al., 1995](#); [Lentz et al., 1997](#); [Margolis & Margolis, 1997](#); [Porcinatto, 2006](#); [Raper & Tessier-Lavigne, 1999](#); [Schmalfeldt et al., 2000](#); [Snow et al., 2001](#)).

Existen distintos tipos de colágenos (28 en vertebrados), algunos de los cuales forman redes o fibrillas; los mismos constituyen elementos estructurales y confieren fuerza tensil a los tejidos ([Kadler et al., 2007](#)). *In vitro*, el colágeno es un sustrato permisivo para el crecimiento de distintos tipos de neuritas, incluyendo neuritas simpáticas ([Dubey et al., 1999](#); [Gupta et al, 2012](#); [Lein et al., 1991](#)). Mutaciones en los genes que codifican distintas clases de colágeno se asocian con errores de navegación en motoneuronas en varias especies, incluyendo *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* y pez cebra ([Ackley et al., 2001](#); [Guillon et al., 2016](#); [Schneider & Granato, 2006](#)).

Las lamininas son glicoproteínas heterotriméricas, compuestas por subunidades α , β y γ . Diferentes isoformas son generadas a partir de distintas combinaciones de subunidades y se distribuyen en forma tejida específica. La laminina es un componente abundante en el sistema nervioso central y periférico, tanto durante el desarrollo como en la vida adulta. Las mismas regulan aspectos como la adhesión, migración y diferenciación celular, y participan también en la regulación del crecimiento y guiado axonal ([Aumailley 2013](#); [Letourneau et al., 1994](#); [Gupta et al., 2012](#)). La laminina es un sustrato permisivo para el crecimiento de distintos subtipos de

axones *in vitro* (Snow et al, 1996, 2002); se ha descrito además, un rol instructivo o de guiado axonal (Adams et al. 2005; Bonner & O'conor. 2001; Paulus & Halloran, 2006; Wolman et al., 2008); y cumple un papel fundamental en el desarrollo de la unión neuromuscular (Noakes et al., 1995).

Los proteoglicanos constituyen una familia diversa de moléculas constituídas por un núcleo proteico, al que se unen covalentemente una o varias cadenas de glicosaminoglicanos. Son componentes multifuncionales en la matriz extracelular de distintos tejidos y láminas basales, y pueden además existir como moléculas transmembranas o ancladas a membrana (Margolis & Margolis, 1997; Schaefer & Schaefer, 2010). En particular, los CSPGs poseen cadenas del disacárido N-acetilgalactosamina/N-ácido glucurónico con distintos grados de sulfatación, y se destacan entre los componentes de la MEC con un efecto inhibitorio o repulsivo sobre el crecimiento axonal. Son inhibitorios para el crecimiento neurítico *in vitro* (Schmalfeldt et al., 2000; Snow et al. 1996, 2002, 2003); y su expresión es finamente regulada temporal y espacialmente en el sistema nervioso en desarrollo, donde se encuentran particularmente en territorios de exclusión para distintos tipos de axones en crecimiento (Oohira et al, 2000; Landolt et al., 1995; Maeda et al 2010; Margolis & Margolis 1997).

El estudio de los efectos de los componentes de la matriz extracelular sobre el crecimiento y direccionamiento neurítico se ha valido en gran medida del uso de ensayos *in vitro*, utilizando componentes aislados de la MEC como sustrato en distintos tipos de cultivos neuronales. Esto se debe a las dificultades que ofrece analizar *in vivo* el efecto de moléculas con funciones estructurales, y discriminar sus funciones instructivas o de guiado de sus funciones de soporte. Sin embargo, *in vivo*, la respuesta axonal a la matriz extracelular depende en gran medida del tipo y balance relativo de señales moleculares presentes en la misma (Cowen et al., 1997; Gavazzi et al., 1995, 1996; Hynds & Snow, 2001; Snow et al., 2003). Asimismo, la expresión y actividad de los receptores neuronales para estas moléculas juega un rol clave en la respuesta axonal a la matriz (Condic et al., 1999; Condic, 2001; Ivins et al., 2000; Myers et al., 2011).

Las integrinas son los principales receptores celulares para los componentes de la matriz extracelular, y son heterodímeros compuestos por una subunidad α y una β . En humanos, existen 18 subtipos diferentes de subunidades α y 8 subtipos de subunidades β , lo que permite una gran diversidad de heterodímeros, específicos para los distintos componentes de la matriz. Por ejemplo, las subunidades α_5 y α_6 tienen mayor afinidad por la fibronectina y la laminina respectivamente; mientras que el dímero $\alpha_1\beta_1$ es el principal receptor para el colágeno (Harburger & Calderwood, 2009; Myers et al., 2011). Estos receptores constituyen el vínculo entre el exterior y el interior celular, y existe una variedad de moléculas que funcionan como

adaptadores intracelulares, sirviendo de anclaje entre las integrinas al citoesqueleto axonal. Por otra parte las integrinas contienen dominios intracelulares capaces de desencadenar cascadas de transducción de señales tras su activación, mediando de esta forma la respuesta de los axones en crecimiento a la matriz (Condic, 2001; Condic et al., 1999; Ivins et al 2000). Por otra parte, miembros de la familia LAR (leukocyte-related antigen receptor) de receptores tirosina-proteína fosfatasa (RPTPs), funcionan como receptores de CSPGs y HSPGs (heparán-sulfato proteoglicanos) (Shen 2014). En particular, el receptor $PTP\sigma$ es el principal receptor mediando las acciones inhibitorias de los CSPGs (Ohtake et al., 2016; Shen 2009, 2014)

De forma más reciente, se ha comenzado a analizar el efecto de propiedades físicas de las matrices extracelulares, tales como su rigidez y la disposición espacial de sus componentes; y actualmente sabemos que no solo la composición química de la matriz, sino también sus propiedades mecánicas ejercen una influencia sobre procesos como la migración celular y el crecimiento axonal (East et al., 2010; Koch et al. 2012; Li et al., 2005; Moore & Sheetz 2011).

Finalmente, es importante considerar que la MEC puede influenciar el crecimiento axonal modulando la acción de distintos tipos de moléculas difusibles tales como citoquinas, factores de crecimiento y señales de guiado axonal (Hildebrand et al., 1994). De esta forma, la MEC funciona como reservorio de estas moléculas, pudiendo secuestrarlas o exponerlas, y regular de esta forma su disponibilidad y actividad.

El conjunto de componentes intrínsecos de la matriz extracelular y sus moléculas asociadas es denominado colectivamente sustrato; y es este sustrato altamente complejo quien de forma conjunta regula los diversos procesos celulares a los que sirve de soporte.

1.2 Algunos componentes de la MEC se encuentran alterados en diferentes condiciones patológicas en el sistema nervioso central y periférico.

Además de constituir señales de guiado axonal fundamentales para el correcto cableado del sistema nervioso durante el desarrollo, distintos componentes de la matriz extracelular están implicados en fenómenos de plasticidad en la vida adulta, el envejecimiento (Antoniou et al., 1996; Watanabe et al., 1997), las lesiones y algunas enfermedades neurodegenerativas.

Los componentes inhibitorios por excelencia son los CSPGs; y su rol como reguladores de la plasticidad neuronal fue descrito originalmente y ha sido estudiado en más detalle en el sistema nervioso central.

Por ejemplo, luego de una lesión de medula espinal, una cicatriz glial rica en MEC es formada en la etapa crónica de daño tisular. Esta matriz contiene altas cantidades de proteoglicanos inhibitorios para el crecimiento axonal ([Jones et al., 2003](#)), y es al menos en parte responsable de la falta de regeneración observada luego de la lesión. Algunas intervenciones terapéuticas experimentales tienen como objetivo la degradación de esta cicatriz glial, y se ha descrito que el tratamiento con la enzima Condroitinasa ABC (ChABC), que degrada las cadenas de condroitín sulfato de los CSPGs responsables de su efecto biológico, mejora significativamente el proceso de regeneración ([Bradbury et al., 2002](#), [Fawcett 2015](#)). En línea con estas observaciones, y apoyando la idea de que los CSPGs serían al menos uno de los factores contribuyendo a la ausencia de regeneración observada luego de una lesión espinal; ha sido descrito que la modulación del receptor $PTP\sigma$, también es capaz de promover la recuperación de lesiones de médula espinal ([Lang et al., 2015](#)).

Asimismo, se han identificado algunos proteoglicanos que aumentan su expresión en lesiones traumáticas de cerebro ([Asher et al., 2000, 2002](#)), y también en esta situación el tratamiento con ChABC mejora la recuperación ([Moon et al., 2001](#)). Sin embargo, la cicatriz glial es una estructura formada en respuesta a un insulto primario que provoca un daño tisular.

En otras condiciones patológicas como el alzheimer y el parkinson, también se han detectado alteraciones en la estructura y composición de la matriz extracelular ([Végh et al., 2014](#)). E incluso, se han descrito que mutaciones en algunos componentes de la matriz extracelular se asocian con algunas formas de epilepsia ([McRae & Porter, 2012](#)) y que la matriz extracelular está alterada en trastornos como la esquizofrenia ([Berretta 2012](#)).

Por ejemplo, en un modelo transgénico de enfermedad de Alzheimer en ratón (APP/PS1), la digestión enzimática de los proteoglicanos presentes en la MEC provoca mejoras sobre el déficit de memoria de aparición temprana, evaluado a nivel celular (potenciación a largo plazo) y comportamental (modelo de *fear conditioning*). Interesantemente, en este modelo la expresión de algunos componentes de la MEC aumenta en etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad, previo a la aparición de las placas amiloides, indicando que alteraciones en la MEC se encontrarían en las bases moleculares de la patología ([Végh et al., 2014](#)).

Los componentes sobreexpresados son los proteoglicanos neurocan y brevican, tenascina-R y HAPLP (hyaluronan and proteoglican link protein). Un aumento en la expresión de estos componentes de ECM también ocurre durante el proceso de envejecimiento normal, y se asocia con el declive cognitivo asociado con el envejecimiento ([Végh et al., 2014](#)). Este aumento se produce tanto en la matriz perisináptica como en las redes perineuronales (PNN).

Las PNN son estructuras de matriz extracelular altamente especializadas que rodean el soma y dendritas de determinados tipos de neuronas en el sistema nervioso central. Las mismas se forman al final de períodos críticos de plasticidad, y restringen procesos de plasticidad sináptica, asociados con la formación de memorias y el aprendizaje entre otros ([Wang & Fawcett 2012](#)). Las PNN se componen principalmente de ácido hialurónico, condroitín sulfato proteoglicanos CSPGs, tenascina y proteínas de entrecruzamiento; y se ha descrito que el tratamiento con ChABC es suficiente para retrasar el final de los períodos críticos o incluso restaurar la plasticidad sináptica posteriormente al cierre de los mismos ([Pizzorusso et al., 2002](#); [Romberg et al., 2013](#)). Las PNN constituyen un ejemplo remarcable de que regulación de la plasticidad neuronal por la matriz extracelular en un contexto no patológico.

Interesantemente, ha sido recientemente demostrada la presencia de Semaforina 3A en las redes perineuronales en el cerebro del ratón ([Vo et al. 2013](#)). La inmunorreactividad para Sema3A desaparece luego del tratamiento con ChABC, posicionando a Sema 3A como un componente constitutivo de las PNN, y se postula que Sema3A sería uno de los mecanismos a través de los cuales las redes PNN restringen la plasticidad en los circuitos neuronales. La interacción de Sema 3A con las PNN constituye un ejemplo ilustrando la modulación de la actividad de señales difusibles por la matriz extracelular.

También en el sistema nervioso periférico existen ejemplos de regulación de la plasticidad neuronal por componentes de la matriz extracelular. Transplantando fragmentos acelulares de vasos sanguíneos a la cámara anterior del ojo, Gavazzi y colaboradores lograron establecer que los tejidos provenientes de animales envejecidos eran reinervados por neuronas del ganglio cervical superior con una menor densidad de innervación que los tejidos provenientes de animales adultos ([Gavazzi et al., 1996](#)). Un estudio posterior del mismo grupo, identificó a la laminina como el componente de la MEC responsable del efecto observado ([Cowen et al., 1997](#)).

Asimismo, el tratamiento con ChABC mejora la regeneración de lesiones experimentales de nervio periférico. Esto sucede tanto cuando la enzima es aplicada directamente en nervios dañados ([Graham et al., 2007](#)), como cuando se utiliza para tratar fragmentos de nervio periférico utilizados como injerto ([Krekoski et al., 2001](#)). Estos resultados indican que los CSPGs son al menos uno de los elementos limitando la regeneración también en el sistema nervioso periférico.

I.3 La matriz extracelular uterina se remodela en respuesta a las hormonas sexuales

El útero está compuesto por dos compartimentos principales: miometrio y endometrio, los cuales difieren en su estructura y función, así como en las características de su matriz extracelular. El miometrio, que conforma las capas más exteriores del útero, es el tejido que confiere contractilidad al órgano. Si bien se encuentra compuesto mayoritariamente por células musculares lisas, el miometrio contiene cerca de un 30% de matriz extracelular ([Schwalm & Dubrauszky, 1966](#)). Esta MEC miometrial está compuesta por proteínas estructurales como colágenos fibrilares y elastina; moléculas de adhesión como fibronectina, laminina y colágeno IV; y proteoglicanos ([Shynlova et al., 2004](#)). Asimismo, las células musculares lisas miometriales se encuentran rodeadas individualmente por una lámina basal, que representa una forma especializada de MEC. Las propias células musculares lisas sintetizan componentes de esta lámina basal, como colágeno y elastina. El endometrio está compuesto por un estroma rico en tejido conjuntivo, se encuentra altamente vascularizado y contiene glándulas formadas a partir de la invaginación del epitelio endometrial que recubre la luz del órgano. Conforman las capas más internas del órgano y es el tejido responsable de recibir los blastocistos, y a partir del cual se forma el componente materno de la placenta. El estroma endometrial y las láminas basales de los epitelios endometrial y glandular son ricos en colágenos tipo I y IV, laminina y fibronectina ([Fazleabas et al., 1997](#); [Spiess & Zorn, 2007](#)).

Durante la vida reproductiva el tejido uterino sufre profundos cambios en respuesta a necesidades cambiantes del órgano, y la MEC remodela su estructura y composición acompañando los mismos. El más notable de estos cambios ocurre durante la gestación, cuando ocurre un proceso de crecimiento y remodelación masivos, que son necesarios para adaptar el tejido al feto en crecimiento. Sin embargo, cambios en la MEC uterina ocurren durante toda la vida reproductiva, variando en su magnitud y características entre los distintos compartimentos uterinos, entre especies, y en distintas condiciones fisiológicas.

De gran relevancia en el contexto de la presente Tesis, existe una vasta cantidad de literatura documentando la regulación de la expresión de la gran mayoría de los componentes constitutivos de la matriz extracelular uterina por las hormonas sexuales, tanto en condiciones fisiológicas como experimentales ([Cidado et al., 1990](#); [Fazleabas et al., 1997](#); [Hjelm et al., 2002](#); [Kokenyesi & Woessner, 1991](#); [Munakata et al., 1984](#); [Pastore et al., 1992](#); [Russo et al., 2009](#); [Salgado et al., 2009a,b](#); [Shynlova et al., 2004](#); [Stewart et al., 1995](#); [Taguchi et al., 1999](#)).

Por ejemplo, ha sido descrito que la expresión de las principales proteínas constitutivas de la MEC miometrial y láminas basales musculares es regulada durante la gestación en la rata. Así, la expresión de elastina aumenta su expresión a la mitad de la gestación y se mantiene elevada hasta el final. En cambio, la expresión de fibronectina, laminina, y colágeno IV es baja al comienzo de la gestación y aumenta cerca del parto. Finalmente, los colágenos fibrilares I y III alcanzan su máxima expresión hacia el final de la gestación, para luego descender bruscamente previo al parto, y este cambio sería clave para disminuir la fuerza tensil y aumentar la elasticidad del tejido en preparación de las contracciones asociadas al parto ([Shynlova et al. 2004](#)).

También en el endometrio la expresión y distribución del colágeno cambian durante el proceso de decidualización. El endometrio no gestante contiene elevadas cantidades de colágenos I y III. Durante el proceso de decidualización se observa un aumento en el calibre de las fibrillas de colágeno, producido como resultado de la asociación lateral de fibrillas finas. La formación de estos haces se asocia con una inducción en la expresión de colágeno V, el cuál no se encuentra presente en el endometrio no gestante ([Spiess & Zorn, 2007](#)).

Los cambios observados durante la gestación, son resultado de los efectos combinados de las fluctuaciones en los niveles plasmáticos de progesterona y las fuerzas mecánicas desarrolladas por el feto en crecimiento ([Shynlova et al. 2004](#)).

Sin embargo, también el estrógeno ha demostrado participar en la regulación de la síntesis de algunas de estas proteínas. Por ejemplo, en ratones, niveles altos de estrógeno endógeno se correlacionan con aumentos en los niveles de colágeno I; mientras que una pérdida de colágeno IV es observada en las etapas del ciclo caracterizadas por bajos niveles de la hormona ([Wood et al., 2007](#)). En ratas inmaduras, la administración de estrógeno provoca una disminución inicial en la densidad de colágeno en el estroma endometrial, que es restablecida a las 24 horas de la administración de la hormona, y se hipotetiza que este perfil de respuesta se relaciona con la respuesta bifásica de crecimiento uterino inducido por estrógeno ([Pastore et al., 1992](#)).

El grupo de Zorn, ha caracterizado los cambios que ocurren en los proteoglicanos uterinos en distintos contextos hormonales fisiológicos y experimentales. Por ejemplo, describieron la presencia de distintas isoformas del condroitín sulfato proteoglicano versican en el útero en el ratón, y que su distribución varía en los distintos estadios del ciclo estral. En las fases de diestro y proestro, el versican se encuentra presente solamente en el estroma endometrial; mientras que durante el estro y el metaestro también se observa inmunoreactividad en el

miometrio. La inmunorreactividad desaparece luego de la ovariectomía; y es restablecida luego del tratamiento con estrógeno, progesterona o la combinación de ambas hormonas ([Salgado et al., 2009a](#)).

Otro grupo importante de proteoglicanos está formado por los SLRPs (proteoglicanos pequeños ricos en leucina), compuesto por decorina, biglican, fibromodulina, y lumican, también se encuentra presente en el estroma endometrial y el miometrio en ratonas cíclicas. En los epitelios luminal y glandular, en cambio, solamente son expresados biglican y fibromodulina. Los SLRPs son modulados a lo largo del ciclo estral y de forma diferencial en los distintos compartimentos uterinos, con diferencias regionales dentro de cada compartimento ([Salgado et al., 2009b](#)).

También durante la gestación se observan variaciones regionales en la expresión de SLRPs. Así, previo al proceso de decidualización la decorina y en menor cantidad el lumican están presentes en el estroma endometrial. Luego de la implantación, biglican y lumican son expresados en el endometrio en las zonas de formación de la decidua; mientras que decorina y lumican son los SLRPs mayormente expresados en las zonas de endometrio no diferenciado entre sitios de implantación ([San Martín et al., 2003](#)). Interesantemente, también en el miometrio humano, se han descrito cambios en los heparán sulfato proteoglicanos decorina y biglican durante la gestación tardía ([Hjelm et al., 2002](#)). Los cambios observados en los SLRPs durante la gestación y el ciclo estral son mimetizados por la administración de estrógeno y progesterona en animales ovariectomizados, demostrando que su expresión se encuentra bajo regulación hormonal ([Salgado et al., 2011](#)).

Estos cambios podrían tener un profundo efecto en la remodelación de la matriz endometrial. Por ejemplo, es sabido que la decorina inhibe la asociación lateral de fibrillas de colágeno, y se hipotetiza que una disminución en su expresión es necesaria previo a la formación de fibrillas de colágeno de gran calibre que se observa durante la implantación ([San Martín et al., 2003](#); [Sanches et al., 2010](#)).

Interesantemente, la expresión de algunas proteínas relacionadas con la matriz extracelular, tales como integrinas y determinadas metaloproteinasas de matriz, enzimas clave en el recambio de los componentes de la MEC; también es regulada por hormonas sexuales en condiciones fisiológicas y experimentales ([Fazlebas et al., 1997](#); [Russo et al., 2009](#)). La regulación de la expresión de estas moléculas constituye un mecanismo adicional a través del cual los cambios en el entorno hormonal inducen la remodelación de la matriz extracelular uterina.

Tomados en su conjunto, los datos presentados resaltan la naturaleza altamente dinámica de la matriz extracelular uterina, y su gran capacidad de remodelación en respuesta a cambios en el entorno hormonal. A pesar de la extensa literatura documentando el vínculo entre las hormonas sexuales y la remodelación de la matriz extracelular, una posible relación entre esta remodelación de la MEC y los fenómenos de plasticidad de la innervación simpática uterina no ha sido explorada hasta el momento. Analizar esta posible interacción constituye el núcleo del segundo capítulo de esta Tesis.

II ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

II.1 El Método de Criocultivo

El método de criocultivo consiste en cultivar explantos neuronales, neuronas aisladas u otros tipos de células sobre cortes a congelación de tejido. Este método fue utilizado por primera vez para demostrar la afinidad selectiva de los linfocitos por regiones específicas de los ganglios linfáticos ([Stamper & Woodruff, 1976](#)). Métodos similares se usaron posteriormente por varios grupos para estudiar el crecimiento sobre diferentes tejidos, incluyendo músculo, riñón, nervios periféricos y distintas regiones del sistema nervioso central ([Carbonetto et al., 1987](#); [Covault et al., 1987](#); [Crutcher 1993](#); [Pettigrew & Crutcher 1999, 2001](#); [Pettigrew et al., 2001](#); [Sandrock & Matthew 1987](#); [Tuttle & Matthew 1991](#)). Esta técnica tiene como ventaja que permite evaluar la contribución de las señales asociadas al sustrato al crecimiento neurítico y la migración celular de forma aislada e independientemente de la síntesis *de novo* de señales en el tejido. Por otra parte, permite correlacionar el crecimiento neurítico y la migración celular con las características histológicas particulares del tejido subyacente. El sistema permite además, realizar manipulaciones en las condiciones de cultivo, las cuales afectarán exclusivamente a las neuronas o los explantos neurales, que constituyen los únicos elementos vivos del sistema.

II.2 Sustrato uterino

Se utilizaron como donantes de útero ratas adultas ovariectomizadas. El uso de animales ovariectomizados permite estudiar de forma aislada los efectos del estrógeno, independientemente de la contribución de hormonas endógenas. Los animales fueron tratados con estradiol, utilizando un protocolo puesto a punto en el laboratorio que logra un marcado efecto sobre la inervación simpática endógena ([Chávez-Genaro et al., 2002](#)).

Se analizó el crecimiento neurítico sobre cortes de endometrio y miometrio. Dado que la inervación miometrial presenta importantes variaciones regionales dentro del cuerno uterino, para los ensayos sobre miometrio se utilizaron cortes a congelación obtenidos de la capa muscular longitudinal del tercio cefálico del cuerno uterino, ya que la misma presenta la mayor concentración de nervios simpáticos ([Chávez-Genaro et al., 2002](#)).

II.3 Neuronas simpáticas

Como fuente de neuronas simpáticas, se utilizarán explantos de ganglio cervical superior provenientes de ratas neonatales (3-5 días de edad) y de ratas adultas ovariectomizadas. Aunque el SCG no representa la fuente natural de neuronas simpáticas que inervan al útero

(Vera et al., 1997; Houdeau et al., 1998), distintos ensayos de cultivo han mostrado que las mismas responden a las señales aportadas por el tejido uterino de manera similar a las neuronas simpáticas intrínsecas (Krizsan-Agbas et al., 2002, 2003, 2008). Asimismo, los ensayos de trasplante a la cámara anterior del ojo mostraron que *in vivo*, las neuronas del SCG que reinervan los trasplantes uterinos responden a las señales producidas por el mismo de la misma forma que la inervación nativa (Brauer et al., 1998, 2000, 2002). Finalmente, existe evidencia de que las neuronas del SCG de la rata adulta expresan receptores para estrógeno (Zoubina & Smith, 2002).

II.4 Análisis del crecimiento neurítico

El crecimiento neurítico sobre distintos sustratos fue evaluado en imágenes microscópicas de los criocultivos. Para ello, los cultivos fueron teñidos con un colorante vital que marca selectivamente las neuronas y otras células presentes en el explanto ganglionar, por tratarse de los únicos elementos vivos del sistema. Se realizó una evaluación cualitativa y cuantitativa de los cultivos, analizando densidad y extensión del crecimiento neurítico. Con el objetivo de observar los cortes subyacentes se capturaron imágenes de luz transmitida de los mismos campos fotografiados para epifluorescencia. Para determinar las estructuras tisulares con las que se asociaban las neuritas en crecimiento algunos cultivos fueron teñidos con azul de toluidina y posteriormente observados al microscopio de luz y fotografiados.

III MATERIALES Y METODOS

III.1 Animales

Se utilizaron ratas adultas (10 semanas) de la cepa Wistar de la colonia del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Los animales fueron sexados entre los 0 y 2 días de vida, criados en camadas de 8-9 hembras y destetadas a los 21 días de edad. Posteriormente, las hembras fueron alojadas en cajas conteniendo 4-6 animales, y mantenidas bajo condiciones constantes de temperatura (21°C) e iluminación (ciclo de 12hs luz/oscuridad), con libre acceso a agua y alimento. El tratamiento y eutanasia de los animales se llevó a cabo siguiendo las normas internacionales aprobadas por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del IIBCE.

III.2 Ovariectomía y tratamientos

Los animales fueron anestesiados con una combinación de 90mg/Kg de ketamina (Unimedical, Uruguay) y 10mg/Kg de xilazina (Unimedical). Se realizaron dos pequeñas incisiones laterales en la región lumbar, a través de cada una de las cuales se expuso el ovario y el extremo tubárico del cuerno uterino. Se realizó una ligadura en el extremo tubárico utilizando hilo de sutura, y se resecó el ovario. Tras confirmar la ausencia de sangrado, los cuernos uterinos fueron devueltos a la cavidad peritoneal, y se suturaron los planos musculares y la piel. Luego de la cirugía los animales fueron mantenidos en el laboratorio durante las primeras horas de recuperación, y posteriormente devueltas al bioterio y mantenidas en cajas individuales hasta el día de la eutanasia.

Las donantes de tejido uterino fueron inyectadas con 3 dosis de 50µg de β - estradiol 17-cypionate (Laboratorios König, Argentina), en los días 5, 7 y 9 luego de la cirugía. 24 horas luego de completado el tratamiento (día 10 post-cirugía), los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital sódico. Debido a los cambios atróficos iniciados por la privación hormonal post-ovariectomía, se estableció para la obtención de tejidos de los animales control, un tiempo de 3 días luego de la operación. En este tiempo se logró observar el efecto de la privación hormonal, sin una reducción excesiva en el tamaño del útero, la cual compromete la obtención de un número de cortes suficiente con la orientación apropiada del tejido. Los animales fueron inyectados con una única dosis de vehículo (Aceite de maní, Sigma, USA) en el día 2 luego de la cirugía y sacrificados 24 horas más tarde.

III.3 Criocultivo

III.3.1 Obtención de cortes

Utero Los cuernos uterinos fueron removidos en condiciones asépticas, liberados de tejido adiposo y conjuntivo, abiertos longitudinalmente por el borde mesometrial y colocados sobre soportes de crióstato pre-enfriados. Se realizaron cortes longitudinales (plano de corte paralelo al eje mayor del cuerno uterino) obtenidos a diferentes niveles de la pared del útero: capa muscular longitudinal, capa muscular circular y endometrio. En algunos ensayos se utilizaron cortes transversales al eje principal del cuerno uterino. En todos los casos los cortes, de 14 μm de espesor, fueron colocados en placas de cultivo de plástico de 35mm sin pre-tratar. Algunos cortes fueron montados en portaobjetos de vidrio e inmunomarcados para tirosina hidroxilasa (α - TH, dilución 1:400; ABR–Affinity BioReagents, USA) para evaluar la innervación simpática endógena.

Tendón Como se explicará más adelante, con el fin de analizar la posible participación del colágeno Tipo I en la orientación de las neuritas simpáticas en criocultivo, se realizaron ensayos utilizando como sustrato cortes a congelación de tendón de cola de rata proveniente de hembras ovariectomizadas. Para la preparación de este sustrato, luego de disecar la cola en condiciones asépticas y remover la piel, se aislaron los tendones individuales y se cortaron en fragmentos de 1cm de largo. Los mismos fueron colocados en moldes de silicona (Sigma-Aldrich, USA: Cat. N° E4390), conteniendo medio de disección (Dulbecco's modified Eagle's medium/F12, DMEM/F12 HAM, Sigma-Aldrich), paralelos entre sí. Luego de colocar los fragmentos de tendón, el exceso de medio fue removido, y los tejidos congelados a -20°C . Se realizaron cortes de 14 μm , paralelos al eje mayor del tendón, que fueron colocados en placas de cultivo de plástico sin pre-tratar. Con el fin de obtener cortes con diferentes orientaciones del tendón, se realizaron bloques con los fragmentos de tendón colocados en distintas orientaciones. Los cortes obtenidos a partir de los distintos tipos de bloque se esquematizan en la figura 14.

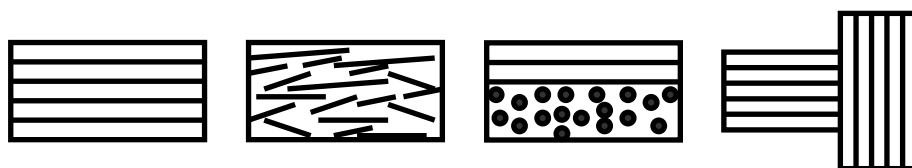


Figura 14. Cortes a congelación de tendón. Se esquematizan los distintos tipos de corte realizados. De izquierda a derecha: (A) cortes longitudinales; (B) cortes con los tendones dispuestos de forma aleatoria, (C) cortes mixtos, con tendones cortados longitudinal (mitad superior del corte) y transversalmente (mitad inferior); (D) se esquematizan dos cortes longitudinales colocados perpendicularmente entre si.

III.3.2 Obtención de explantos

Los ganglios cervicales superiores de ratas neonatales (3-5 días de edad) o adultas ovariectomizadas fueron disecados, liberados de la vaina de tejido conjuntivo que los recubre, y cortados en explantos de 500-600µm de diámetro, y colocados en DMEM/F12HAM.

Se realizaron experimentos en los que se inhibió la proliferación celular. Para ello, los explantos fueron incubados en mitomicina C (30µg/ml, disuelta en DMEM/F12HAM; Sigma-Aldrich). Los explantos fueron incubados durante 1h a 37°C (Damon 2006), y posteriormente lavados en medio fresco previo a la siembra sobre tejido. Los explantos control fueron incubados en DMEM/F12HAM durante 1h a 37°C.

III.3.3 Condiciones de cultivo

Los explantos fueron posicionados sobre los cortes a congelación y mantenidos durante 30 minutos en cámara de flujo laminar previo al agregado de medio de cultivo, para permitir la adhesión de los mismos al tejido. Finalizado dicho período, se agregó medio de cultivo Neurobasal suplementado con B27 2% (Gibco-Invitrogen, USA), antibiótico/antimicótico 1% (Gibco-Invitrogen), L-glutamina 0.5 mM (Sigma, USA) y NGF (0.5 ng/ml para explantos neonatales, 5 ng/ml para explantos adultos; Harlan Bioproducts for Science, USA). Los cultivos fueron mantenidos en incubadora (37°C, 5% CO₂) durante tres días.

Con el fin de evaluar la capacidad del NGF de modular la respuesta de neuronas adultas al sustrato uterino, se realizaron cultivos en los que se utilizaron concentraciones de 10- o 25ng/ml de NGF. Los mismos fueron comparados con cultivos con concentraciones basales de NGF (5ng/ml).

III.4 Visualización del crecimiento neurítico

Finalizada la incubación, los cultivos fueron teñidos con un colorante vital (carboximetilfluoresceína) y observados bajo un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse 800), utilizando un cubo de fluorescencia B-2E con un rango de longitud de onda de excitación de 450-490 nm y un filtro de barrera de emisión de 520-560 nm (EX450-490nm/BA520-560nm). Se capturaron imágenes utilizando una cámara digital CoolSnap-Pro asociada al programa ImagePro-Plus (Media Cybernetics, USA) que fueron utilizadas para analizar la tasa de crecimiento neurítico y migración de células no-neuronales desde el explanto ganglionar. Las placas de cultivo fueron posteriormente fijadas con paraformaldehído al 4% y teñidas con azul

de toluidina al 0.1% para analizar detalles de la estructura del tejido y su vinculación con las neuritas en crecimiento.

III.5 Análisis del crecimiento neurítico

III.5.1 Miometrio

El análisis cualitativo del crecimiento neurítico sobre miometrio, se realizó en cortes longitudinales de la región cefálica de la capa muscular longitudinal, en la que se encuentra la mayor proporción de fibras simpáticas *in vivo*. Utilizando las imágenes histológicas, se delimitó en cada una la región correspondiente a la capa muscular longitudinal. El área delimitada se superpuso sobre las imágenes de colorante vital, y sobre dicha área de interés se midieron los distintos parámetros de crecimiento. Solamente neuritas que crecían completamente sobre la capa muscular longitudinal y no alcanzaban el límite del corte fueron consideradas para el análisis.

Largo neurítico máximo Algunas de las condiciones experimentales mostraron un extenso crecimiento neurítico y migración celular. Esta gran densidad de neuritas y células, particularmente en las proximidades del explanto, imposibilitaban el seguimiento de la trayectoria de neuritas individuales. Por este motivo, para medir el largo neurítico se dibujó una línea tangente al explanto, y perpendicular a la dirección del eje mayor de las células musculares lisas (Fig. 15a). El largo neurítico fue medido dibujando una línea recta desde el extremo distal de cada neurita, hasta la tangente. Se midieron en cada imagen las 5 neuritas más largas, y se promediaron los valores para obtener el valor de largo neurítico máximo (MNL) de cada explanto. Se calculó la tasa de crecimiento neurítico (NGR) dividiendo el valor de MNL entre el diámetro medio del explanto, de forma de normalizar la medida en relación a la variabilidad de tamaño de los explantos.

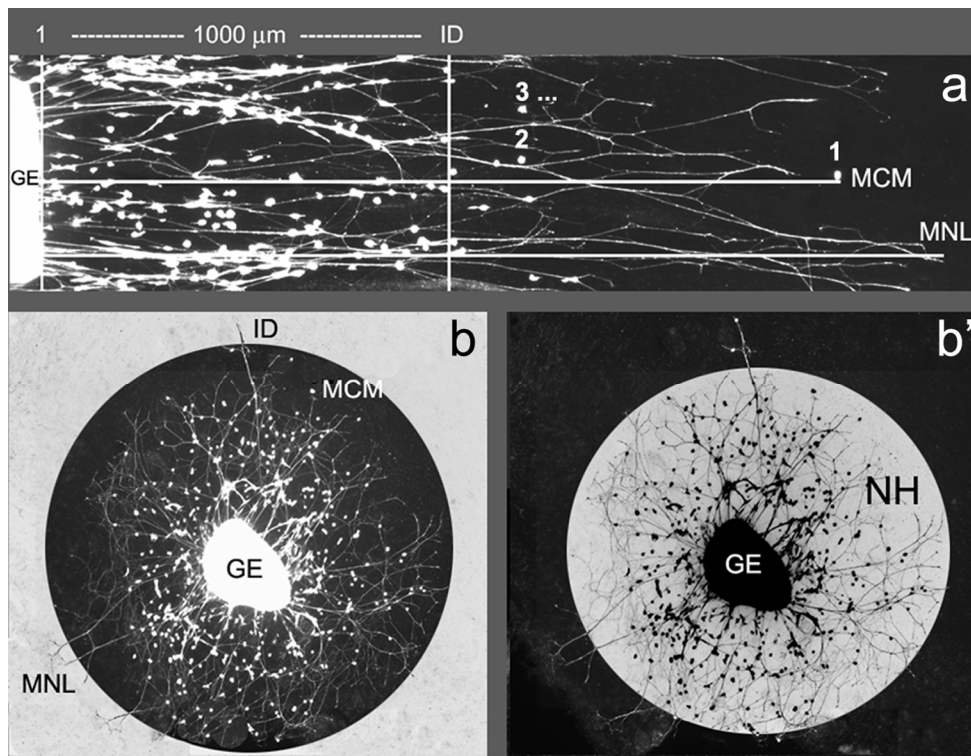


Figura 15. Método cuantitativo. Se esquematiza el método utilizado para la medición de los distintos parámetros del crecimiento neurítico sobre cortes de miometrio (a) y endometrio (b, b'). GE: explanto ganglionar; 1: línea tangente al explanto, perpendicular a la dirección del eje mayor del miometrio; ID en (a): línea paralela a la tangente, a 1mm; ID en (b): círculo de 1mm de radio, MNL: largo neurítico máximo, medido trazando una línea horizontal (paralela al eje mayor del músculo), desde el extremo distal de las neuritas hasta la tangente al explanto; MCM: máxima migración celular; NH: halo neurítico.

Densidad de neuritas en explantos neonatales Se trazó una línea paralela a la tangente al explanto, y a 1 mm de distancia de la misma. Se registró el número de neuritas cruzando esta línea, y se expresó como número de neuritas por mm (ID/mm^2), (Fig. 15a).

Densidad de neuritas en explantos adultos En el caso de los explantos adultos, se midió el porcentaje de área ocupada por neuritas. Se definió una región de interés cuadrada, de $0.25mm^2$ la cual fue superpuesta en la imagen de colorante vital, tangente al explanto (Fig. 16a). Esta región fue recortada, se aumentó el contraste utilizando un filtro (Kernel higauss 9x9) (Fig. 16b), las neuritas fueron seleccionadas utilizando la función *threshold* del programa ImagePro Plus, obteniéndose el área ocupada por neuritas (Fig. 16c), la cual fue expresada como área nerviosa por milímetro de corte de tejido (NA/mm^2).

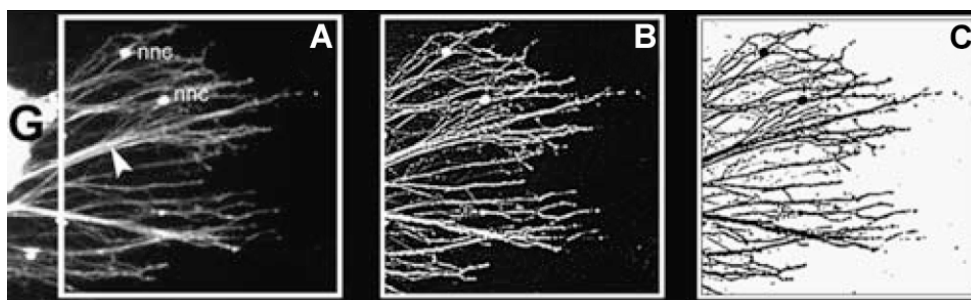


Figura 16. Cuantificación del área nerviosa en explantos adultos. Secuencia de imágenes mostrando el proceso de medición del área ocupada por neuritas en criocultivos de neuronas adultas sobre miometrio, utilizando el programa ImagePro Plus. A: Delimitación de la región de interés de 0.25mm^2 . B: Aplicación del filtro Kernel higauss 9×9 para aumentar el contraste. C: Selección de las neuritas con la función *threshold*. GE: explanto ganglionar; nnc: células no neuronales

III.5.2 Endometrio

Para analizar el crecimiento sobre endometrio, se midió el MNL, NGR, ID/mm (o AN/mm² en explantos adultos), utilizando un procedimiento análogo al utilizado para evaluar el crecimiento neurítico sobre miometrio (Fig. 15b). Adicionalmente, se midió el halo neurítico (NH), (Fig. 15c). Para esto se dibujó manualmente un círculo o elipse comprendiendo la mayor parte de las neuritas, y del diámetro de este halo se sustrajo el valor del diámetro del explanto para obtener el valor de NH. Para corregir eventuales diferencias dadas por diferencias en el tamaño de los explantos, se calculó la tasa de crecimiento del halo (HGR), dividiendo NH entre el diámetro del explanto.

III.6 Evaluación de la migración celular

Se midió la migración máxima de células no neuronales (MCM), procediendo de forma análoga a la utilizada para medir el largo neurítico máximo (Fig. 15a,b). En el miometrio, esta distancia de migración fue medida en dos direcciones: paralela y perpendicular al eje mayor del músculo. Asimismo, se midió la densidad de células. En los explantos neonatales se cuantificó el número de células migrando más allá de una línea colocada a 1mm del borde del explanto (NC/mm), Fig 15a). En los explantos adultos, se midió el número de células por unidad de área (CD/mm²). Para esto se utilizó una grilla de puntos que fue superpuesta en la imagen de colorante vital y se cuantificó el número de células coincidiendo con un elemento de la grilla.

III.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de cortes provenientes de la misma rata fueron promediados, de forma que cada donante de útero fue considerado como una observación independiente (n = 4-5 animales por tratamiento y experimento). Los resultados se expresan como la media con primer y tercer cuartiles. Los datos fueron comparados utilizando tests no-paramétricos. Los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

IV RESULTADOS

IV.1 Influencia del sustrato uterino en el patrón de crecimiento neurítico simpático *in vitro*.

IV.1.1 Puesta a punto de la técnica.

Aunque la técnica de criocultivo fue descrita originalmente en la década de 1960 y utilizada desde entonces para estudiar diversos procesos biológicos, no existía hasta el momento literatura documentando la utilización de cortes de útero como sustrato. Por lo tanto, con el fin de determinar si el tejido uterino era capaz de sustentar el crecimiento neurítico simpático, se realizaron cultivos en los que se sembraron explantos de ganglio cervical superior de ratas neonatales sobre cortes a congelación de cuerno uterino de ratas adultas intactas en diestro. Con fines comparativos se realizaron cultivos de SCG sobre colágeno total extraído de cola de rata (mayoritariamente colágeno tipo I, ampliamente utilizado como sustrato para cultivo de distintos tipos neuronales).

Los explantos cultivados en placas recubiertas de colágeno fueron capaces de extender neuritas en ausencia de NGF en el medio de cultivo (*Nerve Growth Factor*, Factor de Crecimiento Nervioso), (Fig. 17a). Contrariamente, cuando los explantos se cultivaron sobre cortes de tejido uterino, no se observó crecimiento neurítico en ausencia de NGF (Fig. 17c). En ambos casos, la adición de 0.5ng/ml de NGF aumentó sustancialmente el crecimiento neurítico (Fig. 17b,d).

Finalmente, teniendo en cuenta que la regulación de la innervación uterina es un fenómeno de plasticidad de la vida adulta, interesaba saber si las neuronas maduras conservaban la capacidad de responder a las señales aportadas por el sustrato uterino. Para analizar este punto, se puso a punto las condiciones de criocultivo para SCG de ratas adultas ovariectomizadas. Las neuronas adultas requirieron la adición de concentraciones mayores de NGF (5 ng/ml) que las neuronas neonatales, y mostraron en condiciones de cultivo equivalentes un patrón de crecimiento similar al de las neuronas neonatales, pero menor extensión neurítica y un crecimiento más fasciculado (Fig. 18).

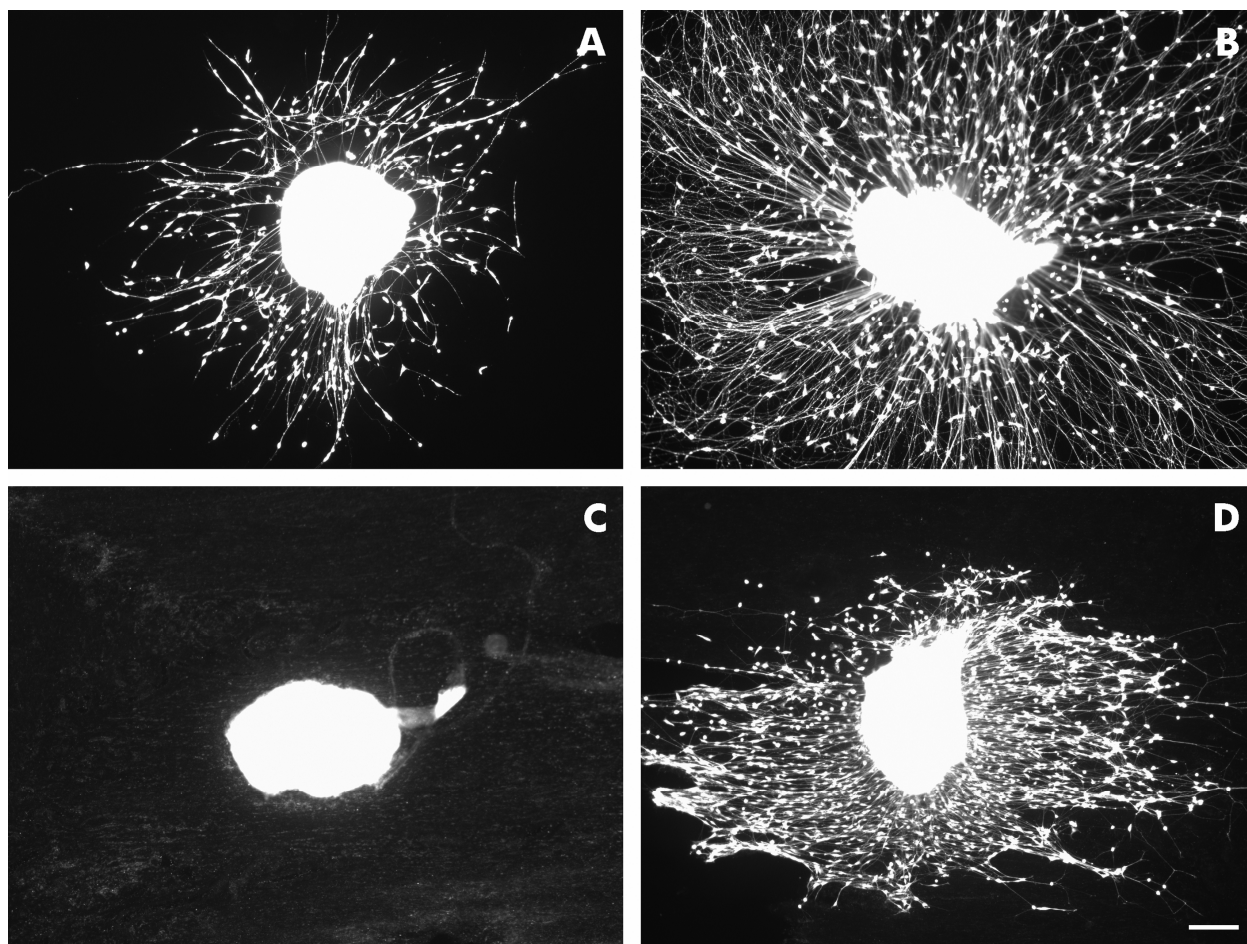


Figura 17. Crecimiento neurítico sobre colágeno y cortes de miometrio uterino. Tinción con colorante vital de explantos de GCS cultivados en placas recubiertas de colágeno (A, B) o cortes de miometrio (C, D). En presencia (B, D) o ausencia (A, C) de NGF exógeno (0.5ng/ml). Barra de calibración 200µm.

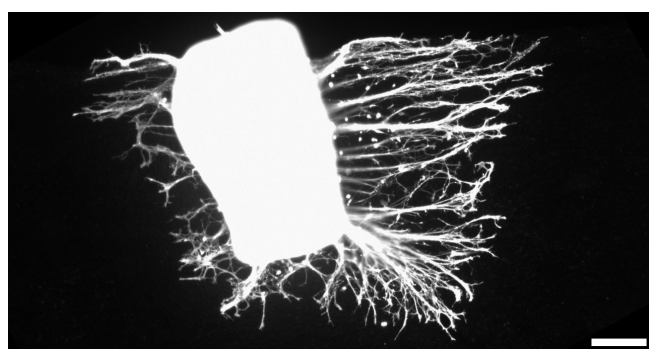


Figura 18. Crecimiento de explantos adultos sobre miometrio uterino. Tinción con colorante vital. Se observa una extensión neurítica limitada, y un crecimiento más fasciculado. Barra de calibración 200µm.

IV.1.2 Análisis del patrón de crecimiento neurítico en criocultivo.

Establecidas las condiciones de cultivo, el primer objetivo fue determinar si las características histológicas del sustrato uterino tenían una influencia en el direccionamiento del crecimiento neurítico simpático *in vitro*. Para ello se utilizaron cortes de cuerno uterino en distintas orientaciones (Fig. 6a-e), incluyendo cortes transversales al eje principal del cuerno uterino, y cortes longitudinales obtenidos a diferentes niveles de la pared del útero (capa muscular longitudinal, LML; capa muscular circular, CML; y endometrio).

El análisis de estos cultivos reveló que el crecimiento neurítico era altamente influenciado por las características histológicas de los cortes subyacentes. En los cortes transversales (Fig. 19a), la mayor parte de las neuritas crecieron en asociación con la capa muscular circular (orientadas longitudinalmente en el corte transversal). Se observaron también escasas neuritas sobre la capa muscular longitudinal (cortadas transversalmente), las que formaban una red irregular (Fig. 19a).

En los cortes longitudinales de las capas musculares longitudinal y circular, las neuritas crecían siguiendo la dirección del eje mayor de las fibras musculares cortadas longitudinalmente (Fig. 19b,c,d), no siendo capaces de crecer de forma perpendicular a este eje. Más aún, las neuritas que en un mismo corte cruzaban el límite entre ambas capas, donde las fibras se orientan de forma aproximadamente perpendicular, doblaban en ángulos de hasta 90° para adaptar su dirección de crecimiento a la nueva orientación del eje principal de las células musculares (Fig. 19d).

Si bien la direccionalidad preferencial de las neuritas con el eje mayor de los haces musculares lisos fue evidente a simple vista, se analizó cuantitativamente la simetría de los halos neuríticos. Utilizando el programa ImagePro Plus, se delineó manualmente dicho halo y se obtuvo la relación entre diámetros máximo y mínimo ($D_{\text{máx}}/D_{\text{mín}}$), y la redondez del área de interés. Mientras ambos parámetros tienen un valor de 1 para un círculo perfecto, se obtuvieron valores superiores a 1 para los halos neuríticos formados sobre los cortes longitudinales de miometrio ($D_{\text{máx}}/D_{\text{mín}}=3.38$ [3.02-3.99]; redondez=3.37 [3.17-3.47]), resultado consistente con halos asimétricos.

Con el fin de determinar las estructuras tisulares a las que se asociaban las fibras nerviosas en los cortes de tejido subyacentes, algunos cultivos fueron teñidos con azul de toluidina. Se observó que las neuritas crecían preferentemente asociadas a los haces musculares (Fig. 20a,b,c); evitando las zonas de tejido conjuntivo que separan dichos haces. Más aún, cuando

las neuritas realizaban el pasaje de un haz muscular al otro, lo hacían en tramos cortos, minimizando el contacto con las áreas de tejido conjuntivo. Se observaron también neuritas creciendo en asociación con los vasos sanguíneos (Fig. 20a,c).

Cabe señalar que el crecimiento neurítico sobre cortes de la capa muscular longitudinal, es consistente con el patrón de inervación observado *in situ*, donde las fibras nerviosas se disponen en dirección del eje mayor de los haces musculares y en asociación con los mismos (Fig. 20d,e), así como también alrededor de los vasos sanguíneos (Fig. 20f).

Finalmente, se analizó el comportamiento de los explantos ganglionares sembrados sobre cortes de endometrio. Se observó que en este sustrato las neuritas formaban halos radiales simétricos compuestos de una red compleja de neuritas (Fig. 19e). Este patrón de crecimiento fue similar al observado en explantos cultivados sobre placas recubiertas de colágeno de cola de rata (Fig. 17a,b). Al igual que en el caso del miometrio, se analizó la relación topográfica entre las neuritas y las estructuras tisulares presentes en el corte subyacente. Se observó que las neuritas crecían sobre el estroma endometrial, y asociadas a la lámina basal de las glándulas y el epitelio luminal del endometrio (Fig. 21).

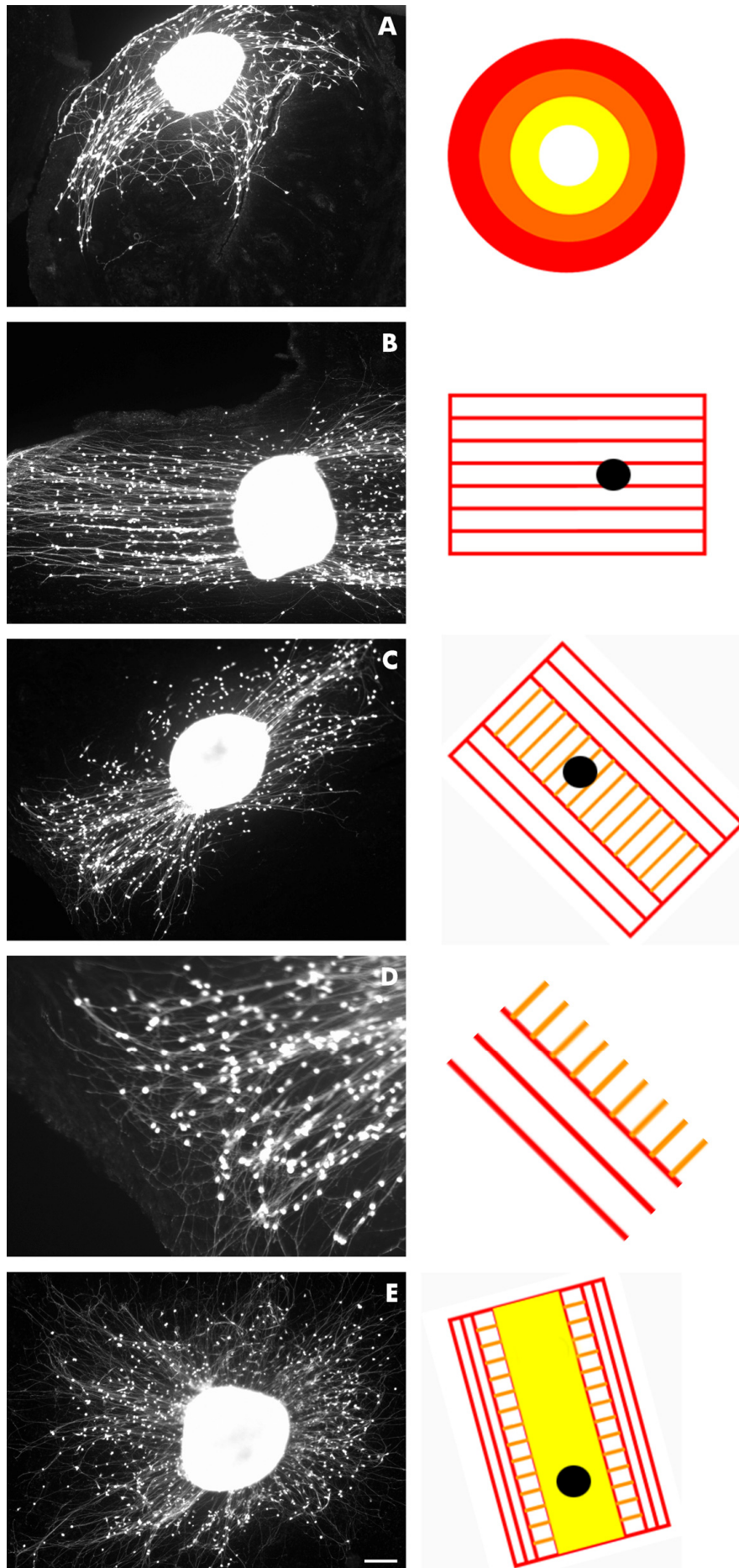


Figura 19. Patrón de crecimiento sobre cortes de útero. Tinción con colorante vital de explantos de GCS creciendo sobre cortes transversales (A) o longitudinales (B, C, D, E) de cuerno uterino. B capa muscular longitudinal, C, D capa muscular circular. Barra de calibration para A, B, C, 200µm, para D 80µm. En el panel derecho se muestra una representación esquemática de los cortes de tejido utilizados como sustrato. Rojo: capa muscular longitudinal; naranja: capa muscular circular; amarillo: endometrio. Las líneas representan la dirección del eje principal de las células musculares cortadas longitudinalmente.

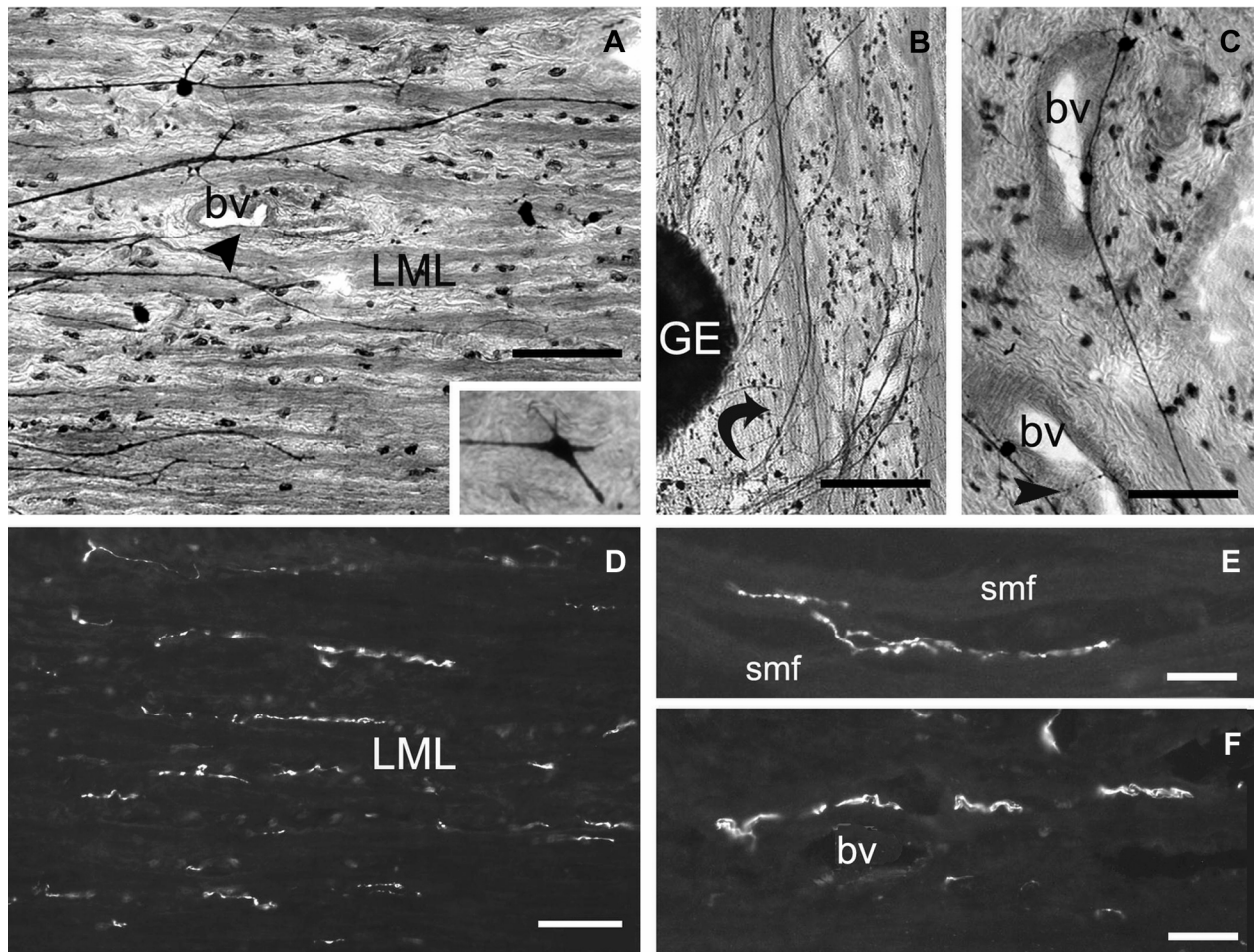


Figura 20. Histología de los criocultivos sobre miometrio y análisis de la innervación endógena. **A, B, C.** Tinción con azul de toluidina de criocultivos sobre musculo liso cortado longitudinalmente. Se observan neuritas creciendo en asociación con las fibras musculares lisas. Las puntas de flecha en A, C indican neuritas asociadas con los vasos sanguíneos. La flecha en B señala una neurita cambiando su dirección de crecimiento para adaptarse a la dirección de las células musculares lisas subyacentes. **D, E, F.** Cortes longitudinales de la capa muscular longitudinal inmunomarcados para Tirosina Hidroxilasa (TH) mostrando fibras nerviosas simpáticas endógenas. LML: capa muscular longitudinal; bv: vaso sanguíneo; smf: fibra muscular lisa. GE: explanto ganglionar. Barra de calibración para A, B, C, D: 200 μ m; para E, F: 25 μ m.

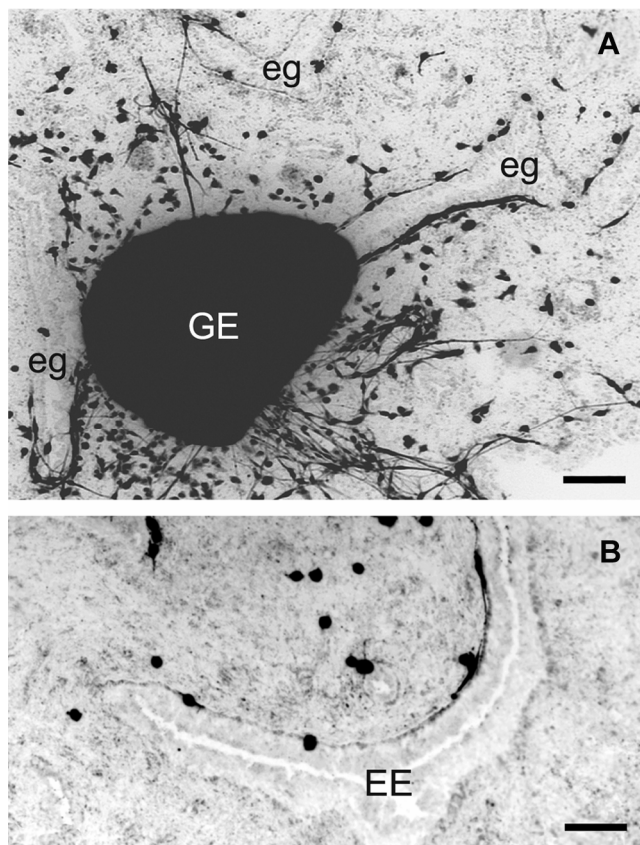


Figura 21. Histología de los criocultivos sobre endometrio. Tinción con azul de toluidina de criocultivos mostrando la asociación de las neuritas simpáticas con: (A) el epitelio glandular (eg), y (B) el epitelio endometrial (EE). Barra de calibración para A: 150 μ m; para B: 120 μ m

IV.1.3 Células no-neuronales.

Junto con las neuritas, se observó un gran número de células no neuronales migrando desde el explanto (Fig. 17,19). Al igual que las neuritas, en los explantos sembrados sobre miometrio, estas células se distribuían preferentemente siguiendo la dirección del eje mayor del músculo liso cortado longitudinalmente, mientras que muy pocas células migraban de forma perpendicular (Fig. 17b,c,d).

Para confirmar esta observación, se midió la distancia máxima de migración de las células no neuronales sobre cortes de LML en dos direcciones, paralela y perpendicular al eje mayor del músculo utilizado como sustrato. La cuantificación mostró que las células migraban una distancia máxima de 1268 μ m [1144-1364] en dirección del eje mayor de las células musculares, mientras que la distancia máxima de migración en dirección perpendicular a dicho eje era de 279 μ m [213-342].

La observación de que en criocultivo, tanto neuritas como células no-neuronales compartían una misma dirección de crecimiento/migración, planteó la posibilidad de que el crecimiento neurítico fuera influenciado por las células no neuronales presentes en el ganglio. En esta hipótesis, la histoarquitectura del sustrato determinaría la dirección de migración de las células no neuronales y éstas a su vez serían las responsables de dirigir el crecimiento neurítico. Para

analizar esta posibilidad se realizaron criocultivos en los que los explantos fueron tratados con el inhibidor de proliferación celular mitomicina C (Fig. 22b) o vehículo (Fig. 22a), previo a la siembra sobre el sustrato uterino. El tratamiento con mitomicina C provocó una reducción del 62% en la densidad de células migratorias y redujo su distancia de migración (Fig. 22b; 23a,b,c), sin afectar la dirección (Fig. 22b) ni la extensión (Fig. 23d,e,f) del crecimiento neurítico. Este resultado indicaría que el direccionamiento y grado de crecimiento de las neuritas no resulta de su interacción con las células no neuronales.

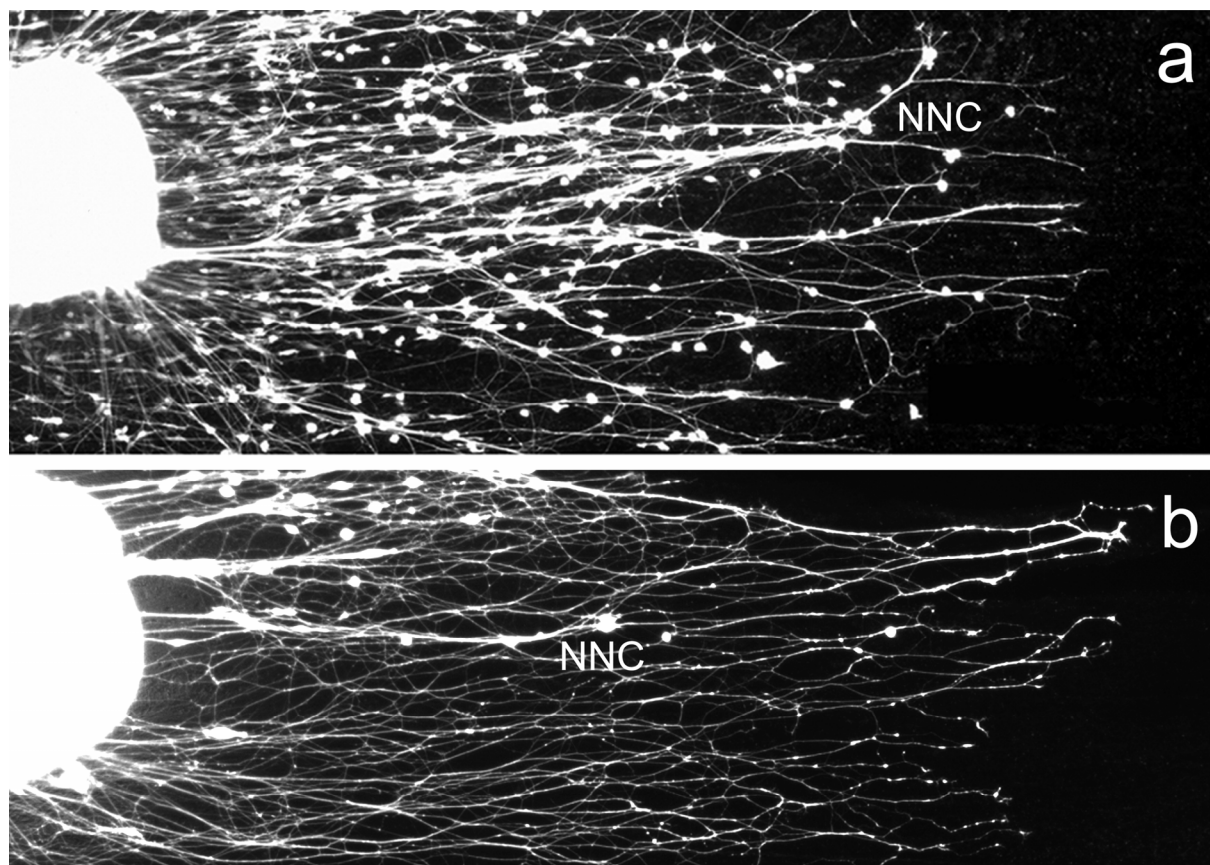


Figura 22. Efecto del tratamiento con MitomicinaC sobre la migración celular y el crecimiento neurítico. Tinción con colorante vital de criocultivos sobre cortes longitudinales de la capa muscular longitudinal, sobre los que se sembraron de explantos de ganglio cervical superior neonatal tratados con (A) vehículo (medio DMEM:F12HAM) o (B) MitomicinaC 30mg/ml. NNC: células no neuronales.

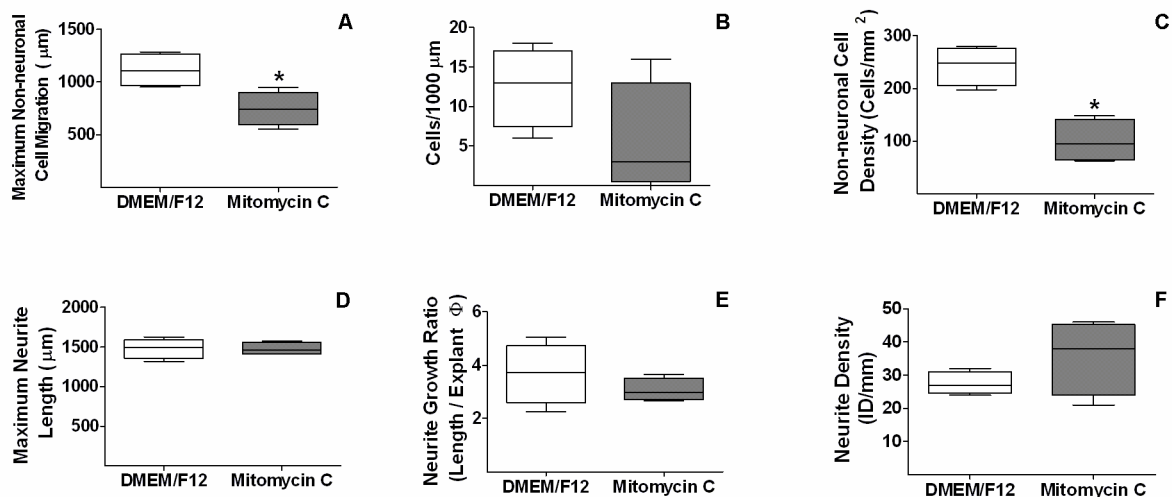


Figura 23. Análisis cuantitativo del efecto del tratamiento con Mitomicina C sobre la migración celular y el crecimiento neurítico. (A) Migración celular máxima. (B) Número de células migrando una distancia mayor a 1mm. (C) Densidad de células no neuronales. (D) Largo neurítico máximo. (E) Tasa de crecimiento neurítico. (F) Densidad de neuritas a 1mm del explanto. Se representa la mediana con primer y tercer cuartiles, con valores máximo y mínimo. Los datos fueron analizados utilizando el test de Mann–Whitney. Los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

IV.2 Crecimiento neurítico sobre cortes de tejido uterino provenientes de ratas tratadas con estrógeno.

Con el fin de analizar el efecto del estrógeno sobre las propiedades neuritogénicas del sustrato uterino; se realizaron criocultivos en los que se utilizó como sustrato cortes a congelación de miometrio y endometrio proveniente de animales ovariectomizados, tratados con estrógeno o vehículo.

IV.2.1 Miometrio

En concordancia con lo observado en los experimentos previos, el crecimiento neurítico sobre cortes longitudinales de la capa muscular longitudinal siguió una orientación paralela al eje de las células musculares lisas, tanto en sustratos control (Fig. 24a,c) como estrogenizados (Fig. 24b,d). Aunque el tratamiento con estrógeno a las donantes de útero no provocó cambios en el patrón de crecimiento, la extensión del crecimiento neurítico se vio disminuida tanto en la densidad de neuritas como en su longitud (Fig. 25).

El análisis cuantitativo mostró que el crecimiento neurítico máximo (MNL) se redujo en un 37% (Fig. 25a) mientras que la tasa de crecimiento neurítico (NGR) se redujo en un 55% (Fig. 25b). Asimismo, la densidad de neuritas a 1 mm del explanto (ID/mm) se redujo en un 85% (Fig. 25c). Esta disminución en el crecimiento se vio reflejada en una reducción estadísticamente significativa de la relación entre diámetros, que alcanzó el 49% del valor del control (Fig. 25e); mientras que la redondez no se vio afectada (Fig. 25d).

El tratamiento con estrógeno a las donantes de útero no afectó la densidad de células migratorias, ni la distancia de migración (Fig. 25f,g). Al igual que en los controles, en sustratos estrogenizados las células migraron más en dirección paralela al eje mayor de las células musculares lisas que en dirección perpendicular al mismo; pero la distancia de migración no se vio afectada en ninguna de las dos direcciones (Fig. 25f).

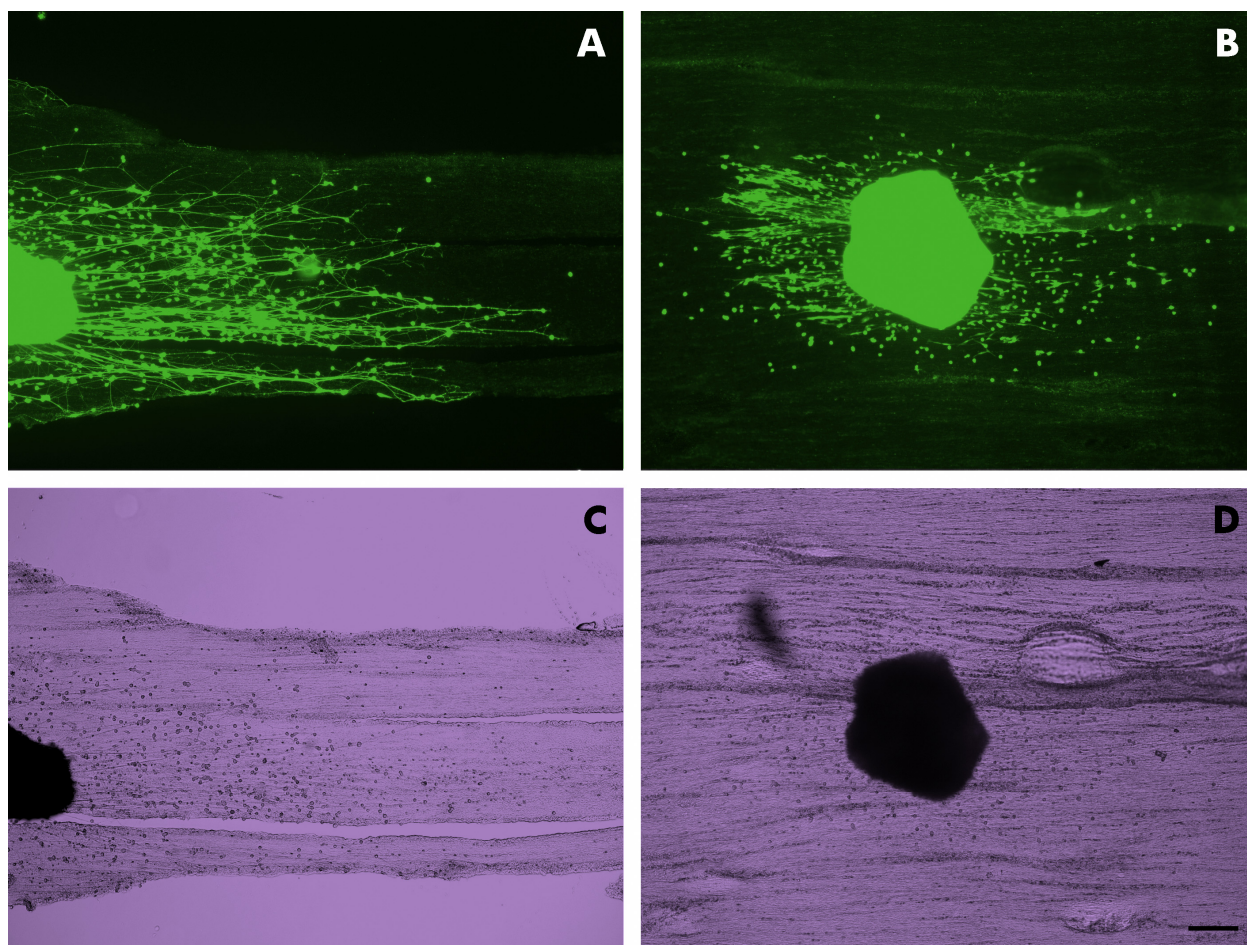


Figura 24. Criocultivo de explantos de ganglio cervical superior neonatal sobre miometrio. Tinción con colorante vital (a, b). Luz transmitida (c, d). Control (a, c) Estrógeno (b, d). Barra de calibración 200 μ m

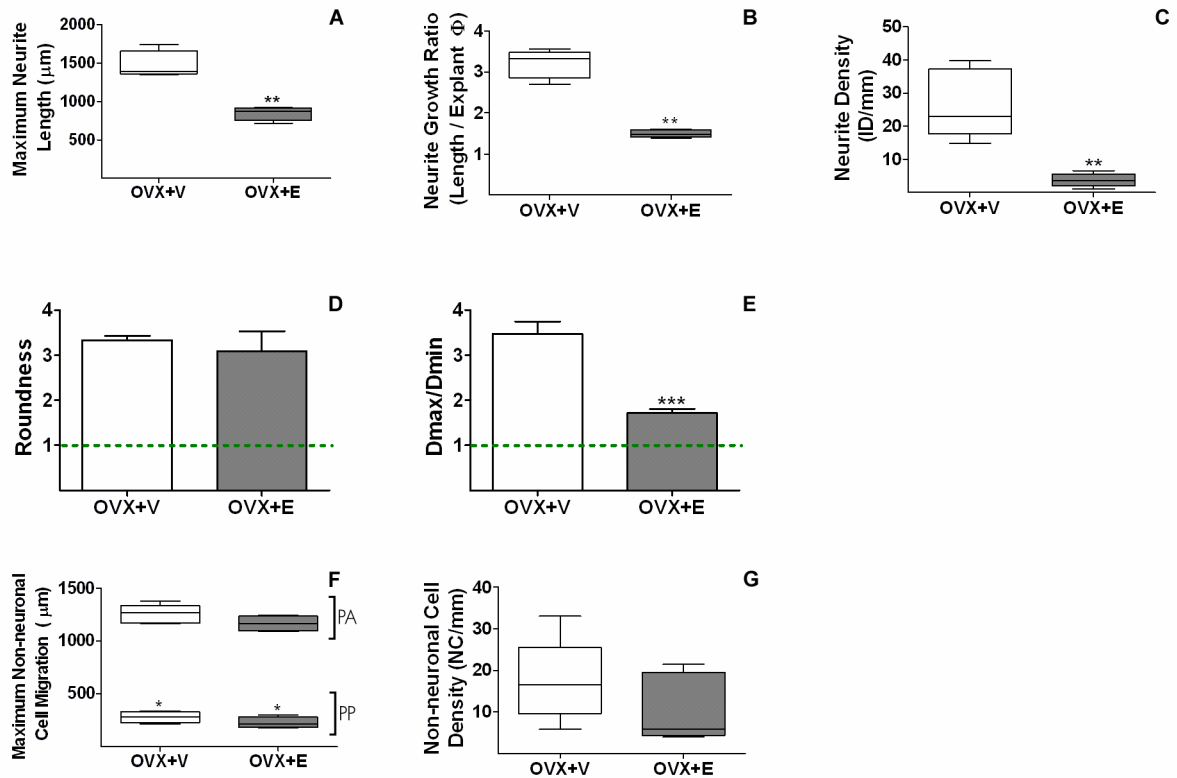


Figura 25. Análisis cuantitativo del crecimiento neurítico y migración celular en criocultivo de explantos neonatales sobre miometrio. (A) Largo neurítico máximo. (B) Tasa de crecimiento neurítico. (C) Densidad neurítica. (D) Redondez. (E) Diámetro máximo/ Diámetro mínimo del halo. (F) Máxima migración celular en dirección paralela (PA) y perpendicular (PP) al eje mayor del miometrio. Los datos fueron comparados utilizando el test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las distancias de migración PA y PP en cada condición experimental. La distancia de migración no mostró diferencias significativas entre OVX+V y OVX+E en ninguna de las dos direcciones. (G): Densidad de células no neuronales. Se representa la mediana con primer y tercer cuartiles; y valores máximo y mínimo. Los datos fueron analizados utilizando el test de Mann-Whitney (excepto en F). En todos los casos, los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

IV.2.2 Endometrio

El crecimiento neurítico sobre cortes de endometrio proveniente de animales control se produjo en forma de halos radiales simétricos (Fig. 26a,c), coincidiendo con lo observado en los ensayos preliminares. Luego del tratamiento con estrógeno a las donantes de tejido uterino, el crecimiento neurítico se redujo notoriamente, quedando restringido casi exclusivamente a las láminas basales del epitelio endometrial y glandular (Fig. 26b,d). El MNL se redujo en un 44% (Fig. 27a), mientras que el diámetro medio del halo lo hizo en un 54% de los valores control (Fig. 27d). La densidad de neuritas medida a 1 mm del borde del explanto no mostró diferencias significativas con el control (Fig. 27c). Al igual que en los cultivos sobre miometrio, el tratamiento con estrógeno no tuvo efecto sobre la migración celular (Fig 26a,b; 27f,g).

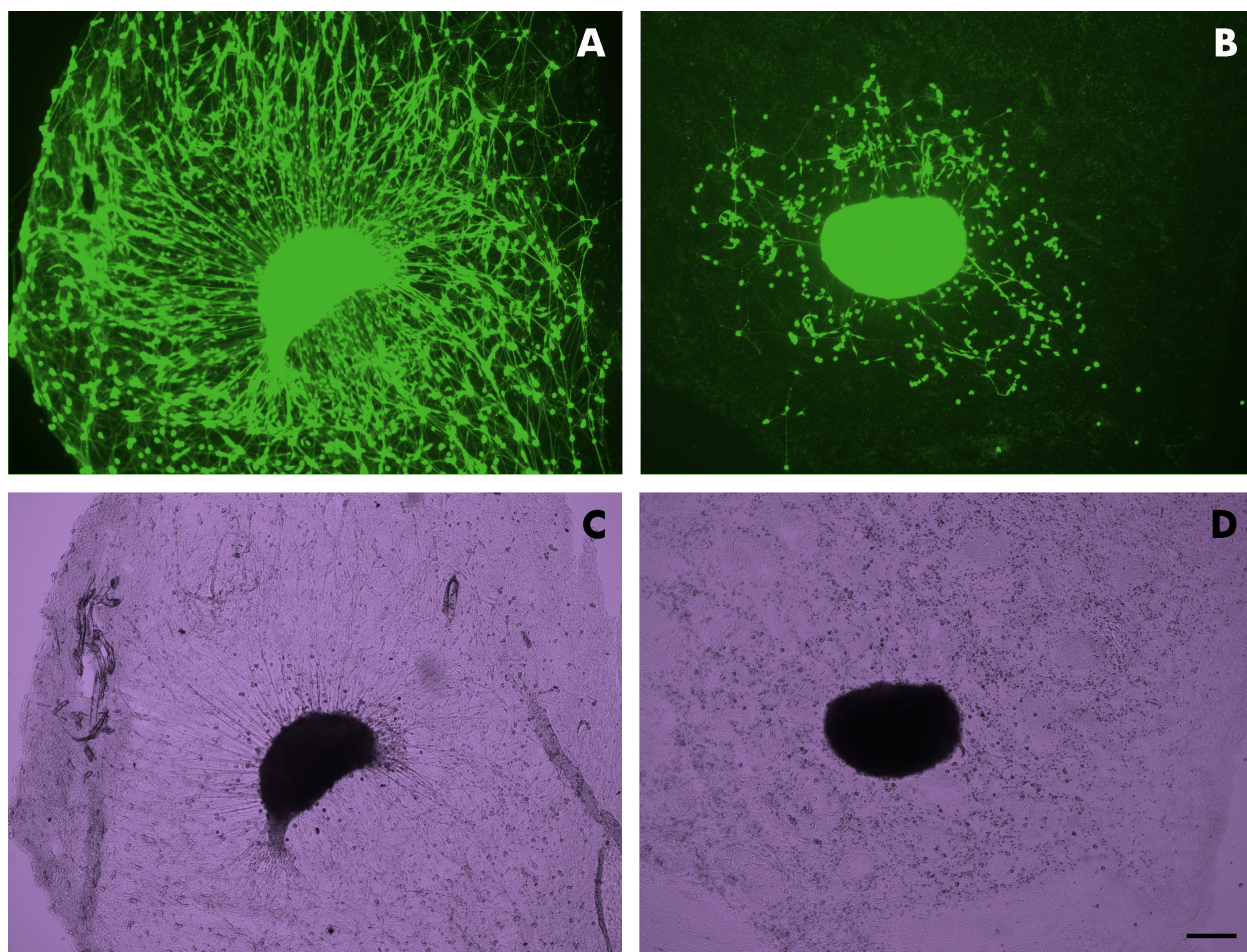


Figura 26. Criocultivo de explantos de ganglio cervical superior neonatal sobre endometrio. Tinción con colorante vital (a, b). Luz transmitida (c, d). Control (a, c) Estrógeno (b, d). Barra de calibración 200 μ m.

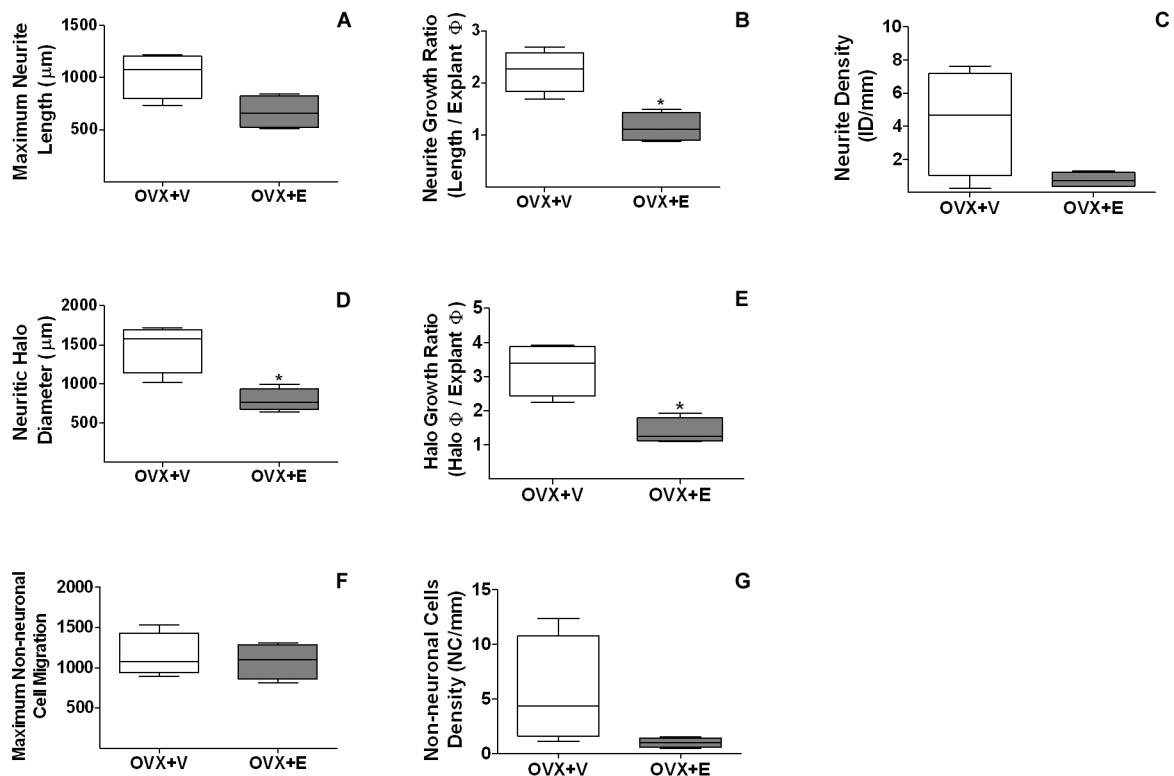


Figura 27. Análisis cuantitativo del crecimiento neurítico y migración celular de explantos neonatales sobre endometrio. (A) Largo neurítico máximo. (B) Tasa de crecimiento neurítico. (C) Densidad neurítica a 1mm del explanto. (D) Halo neurítico. (E) Tasa de crecimiento del halo. (F) Máxima migración celular. (G) Densidad de células no neuronales. Se representa la mediana con primer y tercer cuartiles, y valores máximo y mínimo. Los datos fueron analizados utilizando el test de Mann–Whitney. Los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

IV.3 Respuesta de las neuronas adultas al sustrato uterino

IV.3.1 Miometrio

Al igual que en los cultivos de explantos neonatales, los explantos provenientes de hembras adultas ovariectomizadas extendieron neuritas en dirección al eje mayor de las células musculares lisas al ser cultivadas sobre cortes longitudinales de la capa muscular longitudinal (Fig. 28).

Cuando se utilizó miometrio proveniente de animales estrogenizados el crecimiento neurítico máximo se vio reducido en un 29% (Fig. 29a), y el NGR en un 40% (Fig. 29b) respecto de los valores del control. Asimismo, se observó una tendencia hacia la disminución de la densidad de fibras, aunque la misma no fue estadísticamente significativa (Fig. 29c). Como sucedió con los explantos neonatales, la migración celular no se vio alterada por el tratamiento con estrógeno (Fig 29d,e).

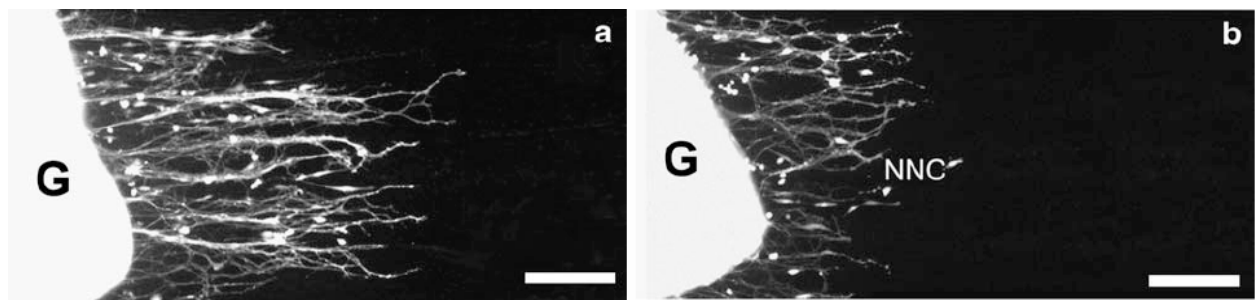


Figura 28. Criocultivo de explantos de ganglio cervical superior adulto sobre miometrio. Tinción con colorante vital: control (a), estrógeno (b). G: explanto ganglionar. Barra de calibración 200μm.

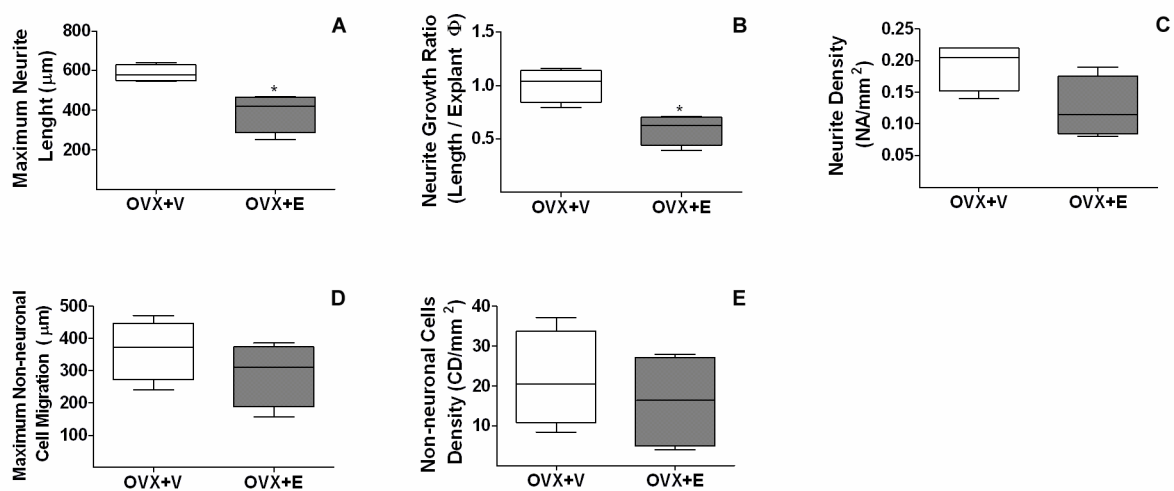


Figura 29. Análisis cuantitativo del crecimiento neurítico y migración celular de explantos adultos sobre miometrio. (A) Crecimiento neurítico máximo. (B) Tasa de crecimiento neurítico. (C) Densidad de neuritas. (D) Máxima migración celular. (E) Densidad de células no neuronales. Se representa la mediana con primer y tercer cuartiles, y valores máximo y mínimo. Los datos fueron analizados utilizando el test de Mann–Whitney. Los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

IV.3.2 Endometrio

Los explantos de SCG formaron halos radiales simétricos al ser cultivados sobre endometrio proveniente de animales castrados tratados con vehículo. Coincidiendo con lo observado sobre miometrio, el patrón de crecimiento sobre endometrio control fue cualitativamente similar al observado para los explantos neonatales, pero los explantos adultos mostraron una menor extensión neurítica y un crecimiento más fasciculado (Fig 30a). La utilización de endometrio estrogenizado no afectó el patrón de crecimiento (Fig 30b), pero provocó una disminución del 16% en tamaño del halo neurítico. Si bien los demás parámetros cuantificados no mostraron una reducción estadísticamente significativa, se observó una tendencia hacia valores de mediana más bajos y un corrimiento en los rangos (máx-mín) de dichos parámetros (Fig 31). La disminución en el crecimiento sobre sustratos estrogenizados comparados con sustratos

control coincide con lo observado en el endometrio para explantos neonatales; y en el miometrio, tanto para ganglios adultos como neonatales.

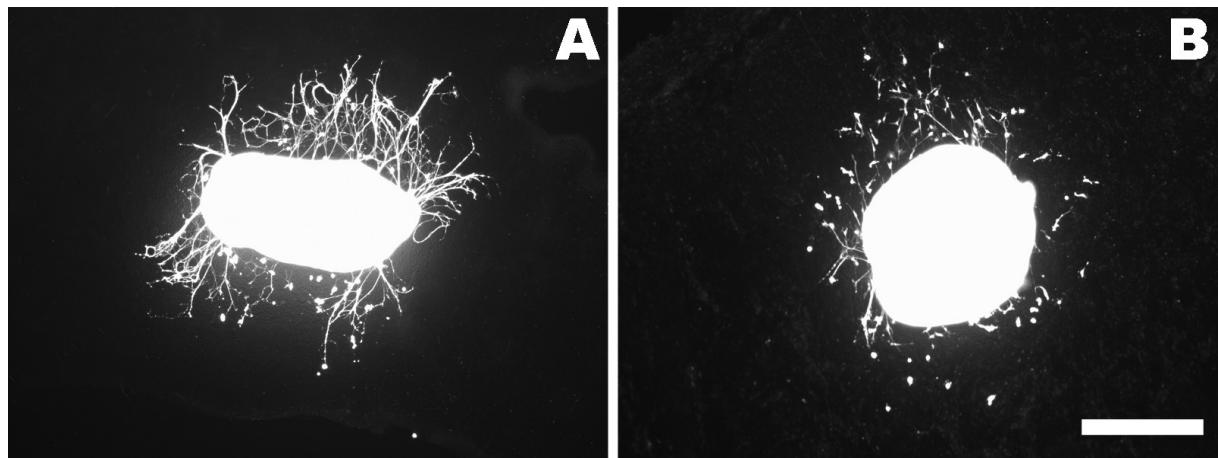


Figura 30. Criocultivo de explantos de ganglio cervical superior adulto sobre endometrio. Tinción con colorante vital mostrando el crecimiento neurítico y migración celular sobre miometrio control (A) y estrogenizado (B). Barra de calibración 500 μ m.

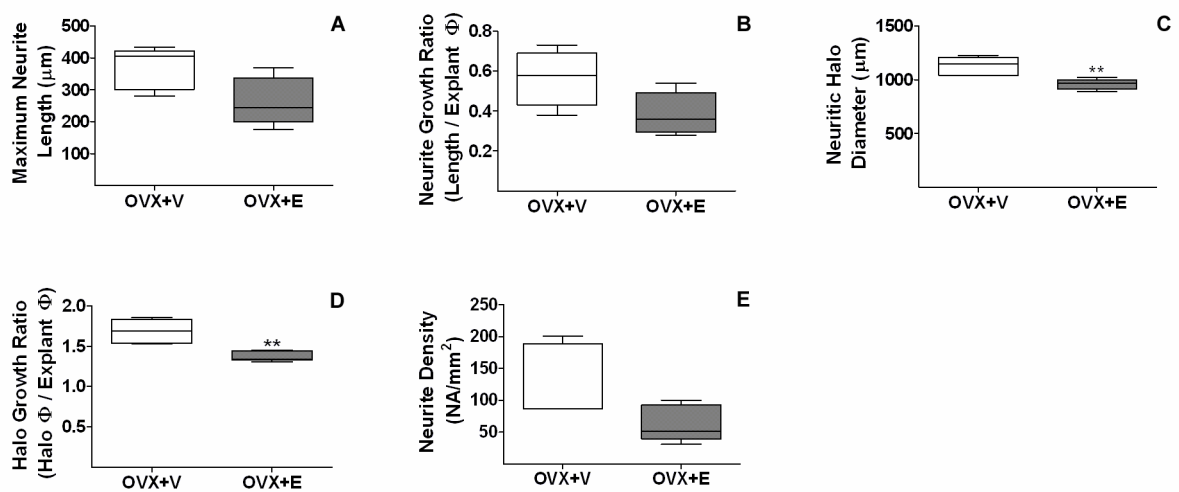


Figura 31. Análisis cuantitativo del crecimiento neurítico y migración celular de explantos de ganglio cervical superior adulto sobre endometrio. (A) Largo neurítico máximo. (B) Tasa de crecimiento neurítico. (C) Halo neurítico. (D) Tasa de crecimiento del halo. (E) Densidad neurítica. (F) Se representa la mediana con primer y tercer cuartiles, y valores máximo y mínimo. Los datos fueron analizados utilizando el test de Mann–Whitney. Los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

IV.4 Efecto del NGF en el crecimiento neurítico simpático de explantos adultos sobre sustratos estrogenizados

Dado que el crecimiento neurítico depende del balance entre señales con efectos positivos y negativos presentes en el ambiente, se analizó si un aumento en los niveles de NGF en el cultivo podría modificar el crecimiento neurítico simpático sobre sustratos estrogenizados.

En el miometrio, la utilización de concentraciones crecientes de NGF en el medio de cultivo no provocó cambios en el patrón de crecimiento, ni variaciones significativas en los parámetros de crecimiento neurítico analizados (Tabla XX) .

Tabla XX. Análisis del efecto del aumento de NGF sobre miometrio

	NGF5 vs NGF10		NGF5 vs NGF25	
	NGF5 ng/ml	NGF10 ng/ml	NGF5 ng/ml	NGF25 ng/ml
MNL μm	597 [514-657]	530 ^{ns} [492-605]	504 [400-761]	492 ^{ns} [400-537]
NGR	0.95 [0.69-1.12]	0.81 ^{ns} [0.76-0.82]	0.73 [0.54-1.16]	0.68 ^{ns} [0.56-0.76]
NA/ mm^2	0.11 [0.09-0.16]	0.11 ^{ns} [0.10-0.13]	0.10 [0.07-0.24]	0.11 ^{ns} [0.10-0.13]

Los resultados son expresados como medianas con 1er y 3er cuartiles. MNL: crecimiento neurítico máximo; NGR: tasa de crecimiento neurítico (MNL/diámetro explanto); NA/ mm^2 : área ocupada por neuritas/ mm^2 de tejido, en el borde del explanto. Se comparó la concentración *standard* utilizada en los ensayos de criocultivo previos (5ng/ml), primeramente contra una concentración de 10ng/ml (panel izquierdo) y posteriormente, con una de 25ng/ml (panel derecho). Los datos fueron comparados utilizando el test de Mann-Whitney. Las comparaciones entre distintas concentraciones fueron realizadas en experimentos independientes, por lo cual no es posible realizar una comparación múltiple.

En el endometrio estrogenizado el incremento en la concentración de NGF (10ng/ml) provocó un aumento en el tamaño del halo neurítico del 15% (Fig. 32,33) y un aparente aumento en el número de neuritas emitidas por los explantos. No se detectaron cambios en el largo neurítico máximo o en el grado de fasciculación de las neuritas.

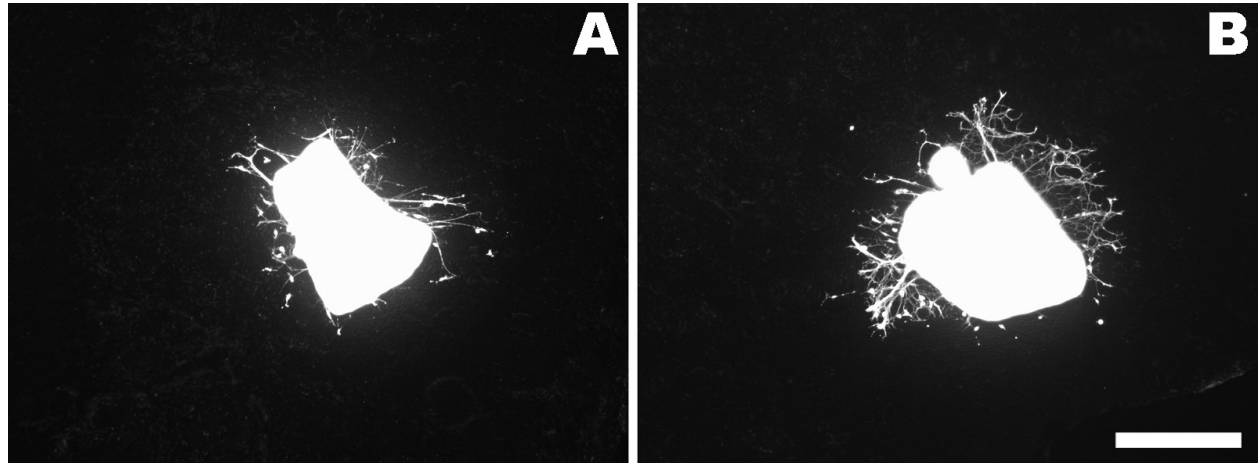


Figura 32. Efecto del aumento de la concentración de NGF en criocultivos de explantos adultos sobre endometrio. Tinción con colorante vital de criocultivos de ganglio cervical superior adulto sobre endometrio estrogenizado, con concentraciones variables de NGF en el medio de cultivo. A: 5ng/ml; B: 10ng/ml. La barra de calibración representa 500 μm .

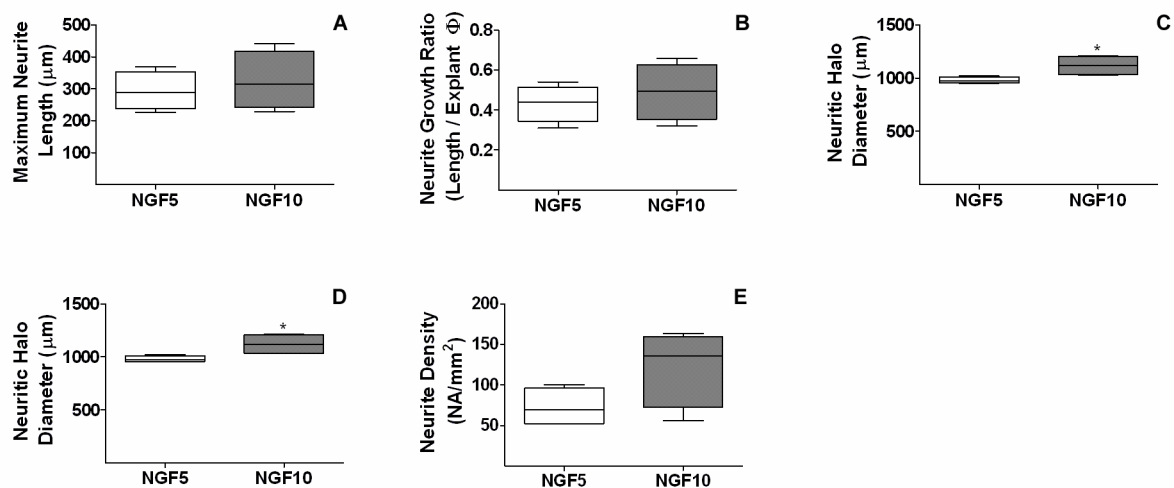


Figura 33. Efecto del aumento de concentración de NGF sobre el crecimiento neurítico de explantos adultos sobre endometrio estrogenizado. (A) Largo neurítico máximo. (B) Tasa de crecimiento neurítico. (C) Halo neurítico. (D) Tasa de crecimiento del halo. (E) Densidad neurítica. (F) Se representa la mediana con primer y tercer cuartiles, y valores máximo y mínimo. Los datos fueron analizados utilizando el test de Mann–Whitney. Los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

IV.5 Participación del colágeno fibrilar

Estudios de microscopía electrónica de transmisión realizados en el marco de la Maestría de la Lic. Gaby Martínez en nuestro Laboratorio, mostraron que en criocultivo, las neuritas simpáticas crecían asociadas a las fibrillas de colágeno presentes en el corte de miometrio utilizado como sustrato.

Utilizando esta misma microscopía, Martínez mostró que el tratamiento con estrógeno provocaba cambios en la orientación de las fibrillas de colágeno que ocupan la matriz extracelular intersticial que rodea las células musculares lisas en el miometrio de la rata. Así, en ratas adultas ovariectomizadas, las fibrillas de colágeno se encontraban altamente alineadas y orientadas predominantemente de forma paralela al eje mayor de las células musculares lisas. Contrariamente, luego del tratamiento con estrógeno, las fibrillas se disponían predominantemente rodeando las células musculares, en una dirección perpendicular a su eje mayor. Estas observaciones llevaron a postular que el realineamiento de las fibrillas de colágeno provocado por el estrógeno podría ser responsable de la inhibición de crecimiento de las neuritas simpáticas observada en miometrio estrogenizado, tanto *in vitro* como *in situ*.

Con el fin de explorar esta hipótesis, en este trabajo de Doctorado, se analizó las propiedades del tendón de cola de rata como sustrato en ensayos de criocultivo. Este sustrato se eligió porque este tejido está constituido por fibrillas de colágeno de tipo I altamente alineado y presenta pocos elementos celulares. Cabe recordar que el colágeno tipo I predomina en el miometrio uterino.

Los criocultivos sobre cortes longitudinales de tendón mostraron un extenso crecimiento neurítico simpático (Fig. 34a). En estos cortes, las neuritas crecían siguiendo la dirección de los haces de colágeno que se disponen alineados a lo largo del eje mayor del tendón, siendo incapaces de crecer perpendicularmente al mismo.

Cuando se utilizaron cortes en los que los tendones se disponían aleatoriamente (Fig. 34b), se observó que las neuritas adaptaban la dirección de su crecimiento para seguir la dirección cambiante de los fragmentos de tendón en el corte. Más aún, cuando se utilizaron como sustrato cortes en los que las fibras de colágeno estaban cortadas transversalmente (Fig. 34c), el crecimiento neurítico se vio disminuido y se observó un patrón de crecimiento desorganizado y poco definido. En algunos casos este crecimiento se vio restringido a la periferia del perfil del tendón.

Finalmente, cuando se utilizaron dos cortes longitudinales colocados perpendicularmente entre sí (Fig. 34d), se observó que cuando las neuritas en crecimiento alcanzaban el límite entre los cortes muy pocas neuritas lograban continuar creciendo. Las pocas neuritas que lograban crecer, lo hacían próximas al borde del segundo corte de tejido, doblando en ángulo recto para adaptar su crecimiento a la dirección del segundo corte longitudinal, manteniendo así su dirección paralela al eje mayor del tendón. En el lado contralateral del corte donde se encontraba sembrado el explanto, se observó un extenso crecimiento de neuritas. Esto indicaría que la inhibición de crecimiento dada por la oposición de cortes no se relaciona con limitaciones en el sustrato o el ganglio.

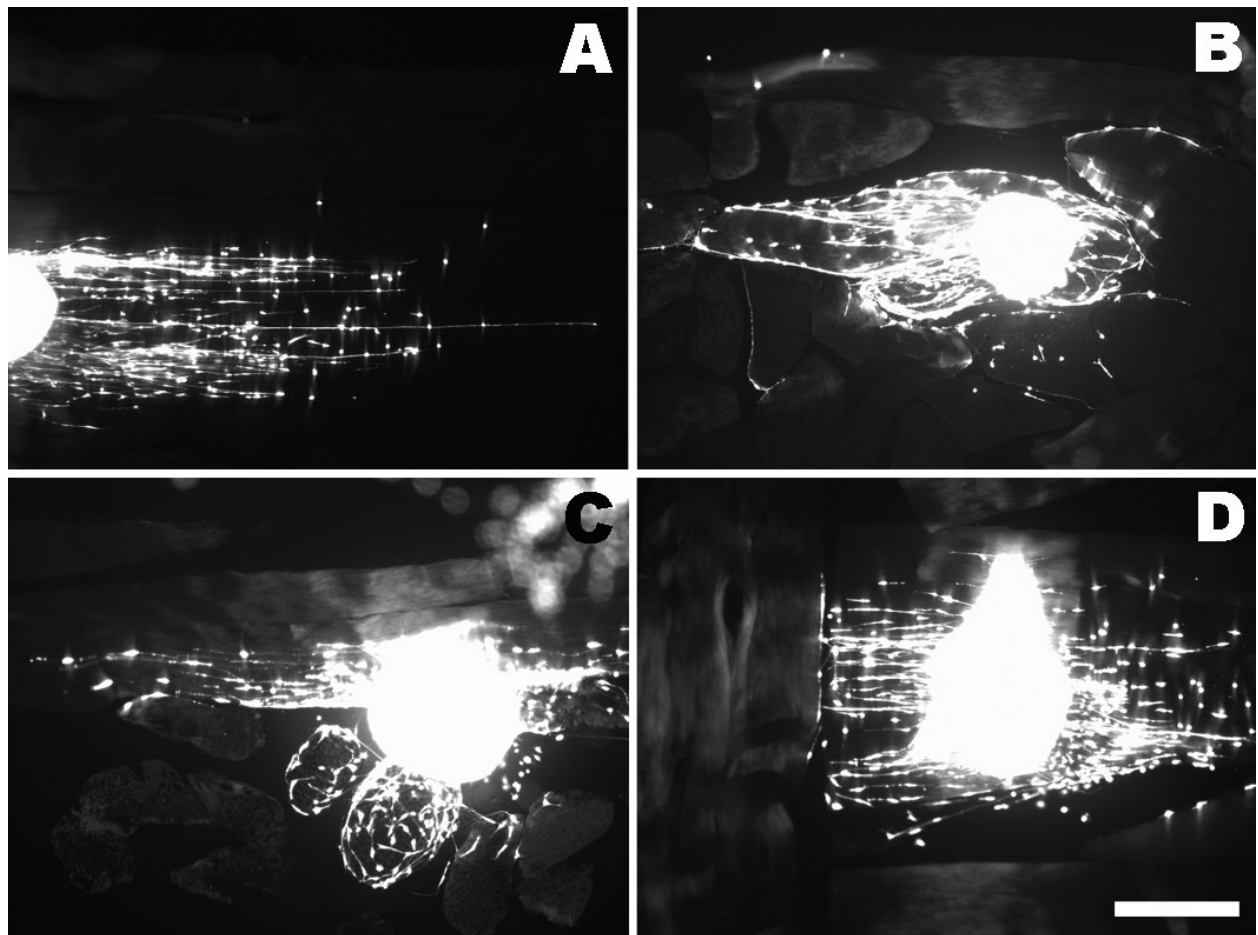


Figura 34. Criocultivo de ganglios simpáticos sobre cortes de tendón. Tinción con colorante vital mostrando el crecimiento de explantos de ganglio cervical superior neonatal sobre cortes de tendón de cola de rata. (A) Cortes longitudinales de tendón. (B) Cortes irregulares de tendón. (C) Cortes combinados de tendón (longitudinales, mitad superior del corte; transversales, mitad inferior). (D) Cortes longitudinales colocados perpendicularmente. La barra de calibración representa 500 μm .

V DISCUSION

V.1 El sustrato uterino sustenta el crecimiento neurítico simpático en cultivo

Los resultados presentados muestran que los cortes de útero sustentan crecimiento neurítico y migración celular desde explantos neuronales neonatales y adultos. Los explantos mostraron diferentes patrones de crecimiento sobre los distintos tipos de tejido y planos de corte, lo que refleja la capacidad de estas neuronas de responder a las señales presentes en el sustrato uterino.

Una observación remarcable, es que el sustrato uterino no sólo es capaz de sustentar el crecimiento neurítico de las neuronas neonatales, sino que también lo sustentó el crecimiento de las neuronas simpáticas adultas. Estos resultados indican que las neuronas adultas conservan su capacidad de “sensar” las señales del sustrato. Esto es de fundamental importancia, dado que la regulación de la plasticidad de la inervación simpática uterina iniciada por el estrógeno es un fenómeno característico de la vida sexual madura.

Cabe señalar, que cuando se comparan explantos neonatales y adultos, se observa que los explantos adultos presentan un crecimiento neurítico y migración celular disminuidos, al mismo tiempo que requieren de un medio de cultivo suplementado con concentraciones más altas de NGF. Estos resultados son consistentes con estudios que muestran que aunque las neuronas simpáticas adultas no requieren de NGF exógeno para su sobrevivencia en cultivo, las mismas son sensibles a la neurotrofina, y responden a incrementos en la concentración de la misma aumentando la extensión y ramificación de neuritas ([Orike & col., 2001](#)).

V.2 El sustrato miometrial contribuye a establecer el patrón organotípico de inervación simpática

Cuando los explantos provenientes de ratas neonatales y adultas son cultivados sobre miometrio, las neuritas simpáticas no crecen de forma homogénea formando halos circulares, sino que muestran una preferencia por crecer en dirección paralela al eje mayor de los haces de músculo liso, imitando así el patrón de inervación endógeno. Más aún, los explantos presentan escaso crecimiento en dirección perpendicular a este eje así como también sobre cortes en los que las fibras musculares se encuentran cortadas de forma transversal. Estos resultados señalan que además de la naturaleza de las señales moleculares presentes en el sustrato, la geometría del tejido subyacente juega un papel clave en el direccionamiento de las neuritas simpáticas en criocultivo.

Otros estudios han abordado el tema de la influencia de la arquitectura del tejido en el crecimiento y guía axonal, tanto *in vivo* como *in vitro*. En un trabajo pionero, Pettigrew y Crutcher (1999) demostraron que en criocultivo, las neuronas simpáticas son capaces de extender neuritas sobre la sustancia blanca en el sistema nervioso central, la cual se caracteriza por sus propiedades inhibitorias. Sin embargo, el crecimiento neurítico sobre este sustrato mostró estar profundamente influenciado por el plano de corte. Sobre la sustancia blanca cortada perpendicularmente, el crecimiento neurítico se encontraba completamente inhibido, o resultaba muy escaso y desordenado. Contrariamente, en las regiones de sustancia blanca cortada longitudinalmente, se observaba un extenso crecimiento neurítico en la dirección del haz nervioso.

Un estudio posterior del mismo grupo mostró que las neuronas simpáticas extienden neuritas sobre cortes longitudinales de médula espinal intacta, pero son incapaces de hacerlo sobre una región de tejido deformada por compresión aplicada *ex vivo* (Pettigrew et al., 2001). Esto sugiere que la alteración de la estructura normal del tejido sería suficiente para impedir la regeneración. Estos resultados cuestionaron por primera vez la naturaleza intrínsecamente inhibitoria de la mielina, y llevaron a desarrollar la “Hipótesis de la geometría”, que postula que los axones en proceso de regeneración tienen mayor probabilidad de encontrar una vía navegable a través de los factores inhibitorios asociados a la mielina creciendo a lo largo del eje longitudinal del haz de fibras (Pettigrew & Crutcher., 1999; Crutcher et al., 2009). En este contexto, la geometría del tejido ha comenzado a ser considerada como un factor relevante a tener en cuenta en el diseño de estrategias para promover la regeneración de lesiones en las que el tejido nervioso se ve comprometido.

De manera similar, actualmente se utilizan conductos artificiales compuestos por fibras de distintos materiales naturales y sintéticos, son estudiados actualmente como alternativa a los autoinjertos para la intervención de lesiones de gran extensión en nervios periféricos y médula espinal. Además de las propiedades físicas y bioquímicas de estos materiales, se ha comenzado a investigar el efecto de la organización estructural de los mismos en el guiado axonal, y algunos estudios señalan que la utilización de conductos formados por fibras alineadas es capaz de direccionar el crecimiento neurítico y promover un mayor crecimiento a través del conducto (Crutcher et al., 2009; Hurtado et al., 2011; Kim et al., 2008).

A pesar de la naturaleza completamente diferente de la mielina del sistema nervioso central y la pared muscular uterina, existe un paralelismo entre la influencia ejercida por la histoarquitectura de estos tejidos, al menos en el modelo de criocultivo. En el caso del sistema nervioso central, estas claves estructurales contribuyen a regular la capacidad de inhibir o

permitir la regeneración nerviosa. En el caso del útero, estas señales instructivas parecen determinar por sí mismas el patrón organotípico de innervación. Sin embargo, la naturaleza de estas señales recién ha comenzado a explorarse.

V.3 Las células no neuronales ganglionares no contribuyen al direccionamiento de las neuritas en cultivo en el miometrio

En los cultivos de explantos neonatales se observó un gran número de células que migraban del explanto ganglionar, acompañando a las neuritas. Más aún, tanto las células como las neuritas se alineaban siguiendo el eje mayor de las fibras musculares lisas cuando los explantos de SCG fueron cultivados sobre cortes longitudinales de miometrio, sugiriendo que células y neuritas responden a algunas señales comunes presentes en el tejido. Aunque la naturaleza de estas células migratorias no fue analizada en el presente trabajo, se ha descrito que distintos tipos celulares migran desde los explantos de GCS neonatales de rata, incluyendo células de Schwann, fibroblastos y macrófagos ([Hill et al. 1974](#)).

Es sabido que *in vitro*, las células de Schwann secretan laminina y NGF ([Anton et al. 1994](#)). Estas moléculas podría influenciar el crecimiento neurítico aún si el frente de avance de las células se encuentra por detrás del de los axones, ya que el NGF secretado por las células podría difundir hacia el medio de cultivo o adsorberse al sustrato ([Sandrock & Matthew 1987b](#)).

Los resultados de nuestros ensayos con Mitomicina C, que inhiben la multiplicación celular y concomitantemente disminuyen el número de células que migran desde el explanto, descartan una posible participación de las células no neuronales en el direccionamiento y extensión de las neuritas en los criocultivos miometriales. Esto constituye una fuerte evidencia de que el sustrato contiene señales capaces de modular de forma directa el crecimiento neurítico simpático. Esta posibilidad se ve también sustentada por los ensayos realizados con ganglios simpáticos de ratas adultas, donde la migración celular es muy limitada. De manera similar, en su trabajo, Pettigrew y Crutcher ([1999](#)), no describen una asociación entre neuronas y células de Schwann en los experimentos de criocultivo de neuronas simpáticas sobre cortes de tejido proveniente de sistema nervioso central; como tampoco asociaciones entre las neuritas y las células inmunomarcadas para GFAP en el corte de tejido.

V.4 El tratamiento con estrógeno restringe el crecimiento neurítico sobre miometrio

La disminución del crecimiento neurítico observada tanto en neuronas neonatales como adultas sobre el sustrato miometrial estrogenizado es consistente con las acciones inhibitorias reportadas de la hormona sobre la innervación uterina. Como se mencionara, el estrógeno altera las propiedades neuritogénicas del tejido uterino promoviendo la síntesis de una variedad de moléculas difusibles inhibitorias para las fibras simpáticas. Hasta la fecha, se han demostrado la influencia del factor de crecimiento nervioso derivado del cerebro (BDNF, [Krizsan-Agbas & col., 2003](#)), el péptido precursor del NGF (proNGF, [Lobos & col., 2005](#)), la neurotrimina ([Krizsan-Agbas & col., 2008](#)), algunas proteínas de la familia de las semaforinas ([Marzioni & col., 2004](#), [Richeri & col., 2008, 2011](#)).

Sumado a esta lista de factores, nuestros resultados demuestran que también señales no difusibles constituyentes del sustrato son reguladas en respuesta al estrógeno y participan de esta inhibición del crecimiento neurítico simpático. El hecho de que el efecto inhibitorio del estrógeno sea selectivo para las neuritas y no afecte la migración celular, sustenta la idea de que el útero podría valerse de modificaciones en la composición y estructura de la matriz extracelular y componentes asociados, como un mecanismo adicional a los ya descritos para lograr la fina regulación de su innervación simpática.

V.5 El estrógeno reduce el crecimiento neurítico sobre sustrato endometrial

Los explantos simpáticos mostraron un extenso crecimiento neurítico en forma de halos radiales simétricos al ser cultivados sobre cortes de endometrio proveniente de animales ovariectomizados tratados con vehículo, contrastando con la muy escasa innervación endógena que presenta el tejido endometrial ([Papka & col. 1985](#); [Tokushige & col., 2006](#)).

La ausencia de un patrón definido de crecimiento podría sugerir que no existen en este tejido señales instructivas para los axones simpáticos, y que en cambio el sustrato endometrial sería un territorio permisivo para estos axones. En esta interpretación, serían señales inhibitorias difusibles las responsables de la exclusión de los nervios simpáticos del compartimento endometrial *in situ*.

Una hipótesis alternativa aunque no excluyente, sería que un factor atractivo presente en el miometrio captara el relativamente limitado número de nervios simpáticos no-vasculares que

inervan al útero, en un fenómeno de “competencia entre efectores”. En este fenómeno conocido como trofomorfismo las fibras nerviosas se dirigen hacia las áreas que disponen de una mayor disponibilidad de factores neurotróficos ([Saffran & Crutcher, 1990](#)). En línea con esta idea, en un estudio previo de nuestro grupo se reportó que en el útero de la rata, el miometrio produce la mayor parte del NGF detectado en el órgano ([Chalar & col., 2003](#)). Es posible entonces hipotetizar que el extenso crecimiento neurítico observado en los criocultivos de endometrio se deba al NGF suplementado en el medio de cultivo.

En concordancia con esta hipótesis, es sabido que pacientes con endometriosis presentan una mayor densidad de inervación en el miometrio y endometrio, e incluso presentan fibras en la capa funcional del endometrio, la cual no se encuentra normalmente inervada ([Tokushige & col., 2006b](#)). Interesante desde el punto de vista de nuestro trabajo, la presencia de fibras nerviosas en el endometrio de estas pacientes se correlaciona con niveles elevados de NGF ([Tokushige & col., 2008](#)).

En nuestros estudios, el tratamiento con estrógeno provocó una disminución en el crecimiento neurítico, tanto en explantos neonatales como adultos. Esto sugiere que al igual que en el miometrio, el estrógeno modifica ciertas propiedades del sustrato, y que tanto las neuronas neonatales como adultas son capaces de reconocer estos cambios. Estas modificaciones, parecen estar restringidas al estroma endometrial, ya que las neuritas no dejaron de crecer sobre los perfiles de lámina basal de los epitelios luminal y glandular.

El efecto inhibitorio del estrógeno sobre el crecimiento neurítico simpático observado en criocultivo contrasta con lo reportado para la endometriosis, donde los tratamientos que reducen los niveles plasmáticos de estrógeno, disminuyen la densidad de inervación en el endometrio eutópico y en menor medida en las lesiones endometrióticas ([Tokushige et al., 2008, 2009](#)). Asimismo, en un modelo de endometriosis experimental en rata, la densidad de inervación simpática aumenta en las etapas del ciclo estral que presentan elevaciones en los niveles de estrógenos ([Zhang & col., 2008](#)).

Un posible explicación para esta diferencia, sería que la disminución de densidad de fibras nerviosas que se produce en la patología como consecuencia del descenso de estrógeno, se correlaciona con un descenso en los niveles de NGF en el endometrio. Contrariamente, en nuestros criocultivos la concentración de NGF se mantuvo constante para ambas condiciones experimentales (cortes de endometrio provenientes de ratas ovariectomizadas tratadas con estrógeno o vehículo).

Apoyando esta posibilidad, se encuentra la observación de que en nuestros ensayos de criocultivo, el aumento de la concentración de NGF adicionado al medio aumentó el crecimiento neurítico. Es relevante destacar, que en los criocultivos de miometrio, el aumento en la concentración de NGF no modificó el crecimiento neurítico en sustratos provenientes de donantes tratadas con estrógeno. Esta observación es muy relevante, dado que *in vivo*, la degeneración selectiva que el estrógeno induce en la inervación miometrial ocurre sin la existencia de una privación de NGF el cual aumenta en respuesta al estrógeno (Chalar et al., 2002).

V.6 Papel del colágeno

Es sabido que el colágeno juega un papel clave en el crecimiento y guiado axonal tanto en el desarrollo embrionario como en la regeneración de la fibras nerviosas luego de las lesiones (de Luca et al., 2014). Además de sus propiedades bioquímicas, la organización tridimensional de las fibrillas de colágeno influencia el patrón y extensión del crecimiento neurítico, tanto *in vitro* como *in vivo*. En particular, el alineamiento de las fibrillas de colágeno incrementa el crecimiento neurítico cuando se lo compara con fibrillas orientadas aleatoriamente (Ceballos et al., 1999; de Luca et al., 2014; Dubey et al. 1999; Lanfer et al., 2010; Liu et al., 2012; Phillips et al., 2005). Esto hace pensar, determinadas formas de organización espacial del colágeno, podrían resultar menos permisivas e incluso inhibitorias para las neuritas en crecimiento.

El colágeno I fue identificado como un candidato de interés en estudios de nuestro laboratorio, debido a que su geometría dentro del miometrio uterino sufre una profunda reorganización en respuesta al tratamiento con estrógeno (Richeri et al., 2010), así como en repuesta a los cambios hormonales que ocurren durante la pubertad natural (Martínez et al., 2016). Estas observaciones adquieren particular relevancia al considerar que los cambios en la orientación del colágeno ocurren en las zonas del miometrio donde se distribuyen las terminales simpáticas y coinciden temporalmente con el proceso de remodelación inducido por el estrógeno durante la pubertad (Brauer et al., 1992), así como en ratas inmaduras (Brauer et al., 1995) y en ratas adultas ovariectomizadas (Zoubina et al., 2001). Otro dato interesante aportado por los estudios de microscopía electrónica antes mencionados, es que en los criocultivos, las neuritas simpáticas se asocian con las fibrillas de colágeno presentes en los cortes de miometrio subyacentes; y la reorganización del colágeno coincide con la disminución en la capacidad neuritogénica que se observa sobre el sustrato miometrial estrogenizado (Richeri et al., 2010; Martínez et al., 2016).

Los resultados obtenidos en criocultivos sobre cortes de tendón presentados en esta Tesis proporcionan sustento adicional a la posible participación de la disposición espacial de las fibrillas de colágeno en la remodelación de la innervación miometrial. De forma similar a lo que ocurre en el miometrio, las neuritas simpáticas crecen sobre los cortes de tendón siguiendo la dirección del eje mayor del tejido cortado longitudinalmente, siendo incapaces de crecer de forma perpendicular a este eje. Asimismo, las neuritas crecen sobre cortes transversales de tendón, aunque en este caso lo hacen sin un patrón definido, también remediando lo que sucede en los cortes transversales de miometrio.

Estas evidencias se encuentran en línea con ensayos de criocultivo en los que se usaron como sustrato cortes a congelación de tendón decelularizados, los cuales también promueven el crecimiento alineado de neuritas desde explantos de ganglio de la raíz dorsal ([Alberti et al., 2014](#)). Estos ensayos sustentan la idea del papel clave del colágeno en este patrón de crecimiento, dado que no existen componentes celulares remanentes en el tejido.

También, y como se discutiera previamente, la comprobación de que en los criocultivos de miometrio, la ausencia de migración de células ganglionares no afecta el crecimiento neurítico, demuestra que el efecto del sustrato sobre las neuritas es directo. En apoyo a esta idea, ensayos en los que se cultivaron neuronas y células gliales derivadas de precursores neurales obtenidos de sustancia blanca humana sobre colágeno alineado mostraron que el alineamiento del colágeno afectaba preferencialmente el crecimiento de las neuritas y no los procesos gliales ([Lanfer et al., 2010](#)).

Tomados en su conjunto, los resultados obtenidos señalan al colágeno fibrilar como un candidato interesante que podría explicar la influencia del sustrato en la remodelación de la innervación simpática miometrial en respuesta al estrógeno. Estos resultados constituyen a nuestro entender, el primer ejemplo en que la reorganización geométrica del colágeno en un contexto fisiológico, podría explicar un fenómeno de inhibición de crecimiento neural o neudegeneración.

Es importante considerar, sin embargo, que la geometría del sustrato y en particular el alineamiento del colágeno tienen la capacidad de afectar el crecimiento de distintos tipos neuronales ([Ceballos et al., 1999](#); [Crutcher et al., 2009](#); [de Luca et al., 2014](#); [Dubey et al. 1999](#); [Lanfer et al., 2010](#); [Liu et al., 2012](#); [Phillips et al., 2005](#)). Como se mencionara en la introducción de esta Tesis, útero recibe también innervación parasimpática y sensorial, y se ha descrito que el tratamiento crónico con estrógeno a ratas prepúberes inhibe el crecimiento de nervios sensoriales ([Chalar et al., 2003](#)) y provoca una reducción en la densidad de fibras

parasimpáticas terminales finas en el miometrio ([Richeri et al., 2002](#)). Estos resultados plantean la posibilidad de que la reorganización del colágeno funcione como un mecanismo común de inhibición en respuesta al estrógeno y que otras señales inhibitorias más específicas, confieran la vulnerabilidad diferencial observada en las fibras simpáticas a las acciones inhibitorias/degenerativas del estrógeno.

Conclusiones & Perspectivas

La innervación simpática uterina representa un modelo excepcional de plasticidad natural en el sistema nervioso maduro, remodelándose en respuesta a las fluctuaciones en los niveles circulantes de hormonas sexuales, tanto en condiciones fisiológicas como experimentales. El estrógeno es la hormona clave en el control de estos procesos al menos en la hembra no gestante, siendo capaz de inhibir el crecimiento e incluso de provocar la degeneración de fibras nerviosas simpáticas maduras. Actualmente sabemos que estos fenómenos de plasticidad son, en buena medida, iniciados por cambios inducidos por el estrógeno en el tejido efector que conducen a un desbalance entre la producción de varias señales moleculares con efectos positivos y negativos sobre los nervios simpáticos.

La comprobación de que el soporte trófico del útero no se ve comprometido luego de la administración de estrógeno refuerza la idea de la relevancia de los mecanismos inhibitorios mediados por señales repulsivas capaces de contrarrestar los efectos positivos de las neurotrofinas. En los últimos años se han comenzado a identificar una variedad de estas moléculas inhibitorias, entre las que se encuentran algunos miembros de la familia de las semaforinas, la molécula de adhesión neurotrimina y el factor de crecimiento BDNF (Revisado en [Brauer & Smith, 2015](#); [Brauer 2016](#)). El presente trabajo aporta evidencia apoyando la participación de dos nuevos actores en la regulación de esta plasticidad: la respuesta inflamatoria y las señales de provenientes sustrato uterino.

El efecto observado luego de la inhibición farmacológica de la respuesta inflamatoria sugiere que los mediadores inflamatorios podrían estar implicadas en el proceso neurodegenerativo. Nuestros resultados, además de mostrar por primera vez una acción proneuritigénica de la dexametasona sobre las fibras nerviosas simpáticas uterinas, mostraron la existencia de un efecto neuroprotector de este glucocorticoide frente a la degeneración de terminales nerviosas inducida por el estrógeno. La correlación espacio-temporal entre los niveles de eosinófilos y la denervación simpática del útero posiciona a estas células como candidatos a ser estudiados en mayor profundidad como potenciales productores de sustancias neurorrepulsivas. Esta posibilidad se ve sustentada por la observación de que la inhibición de la eosinofilia uterina inducida por la dexametasona coincide con la acción neuroprotectora de este glucocorticoide. Los resultados obtenidos a partir de la inhibición de la síntesis de eicosanoides indican que las vías de procesamiento del ácido araquidónico no serían las únicas o principales vías inflamatorias implicadas. Asimismo, la incapacidad de los fármacos antiinflamatorios empleados

en este trabajo de inhibir la denervación simpática y la infiltración de eosinófilos parecen reforzar un posible vínculo causal entre ambos fenómenos.

El sustrato uterino mostró influenciar el crecimiento de las neuritas simpáticas en cultivo. Mientras el miometrio contiene señales instructivas, el endometrio parece comportarse como un soporte permisivo para el crecimiento neurítico. Interesantemente, el estrógeno provocó alteraciones que resultaron en una marcada disminución de la capacidad neuritogénica en ambos tipos de sustrato. Los resultados de criocultivo sobre tendón presentados en esta Tesis apoyan la evidencia surgida a partir de estudios de nuestro laboratorio que postularon al colágeno como una de las señales presentes en el sustrato que estaría implicada en el direccionamiento de las neuritas en cultivo, y potencialmente en la inhibición de crecimiento observada en sustratos estrogenizados. Aunque las distintas líneas de evidencia presentadas posicionan al colágeno como un potencial “responsable” de las modificaciones en la capacidad neuritogénica del sustrato miometrial en respuesta al estrógeno, la participación de otras señales de la matriz extracelular no puede ser descartada.

En el sistema nervioso autónomo maduro se encuentran ejemplos de regulación de la innervación a través de cambios en la matriz extracelular de los órganos efectores. Por ejemplo, se ha descrito que el descenso en la densidad de innervación simpática de la pared de los vasos sanguíneos que se observa durante el envejecimiento, se asocia con una reducción en el contenido de laminina en la pared vascular ([Gavazzi & col., 1995](#)). Asimismo, la laminina es sintetizada y depositada en nervios periféricos lesionados como parte del proceso de formación de Bandas de Büngner iniciado por las células de Schwann, el cual es clave en la regeneración no-intervenida de lesiones de nervios periféricos ([Ide, 1996](#)).

Finalmente, un estudio reciente mostró que el infarto de miocardio provocado por la aplicación de un protocolo de isquemia-reperfusión, no era reinervado por nervios simpáticos, contrastando con lo observado luego de la isquemia cardíaca crónica. El estudio mostró que la isquemia transitoria pero no la permanente, promueve la expresión de condroitín sulfato proteoglicanos en el sitio de la lesión. La misma lesión provocada en ratones *knock-out* para el receptor de proteoglicanos PTP σ es reinervada por fibras simpáticas, mostrando que los CSPGs son responsables de la ausencia de reinervación simpática ([Gardner & Habecker 2013](#)).

Como se mencionara, la matriz extracelular puede influenciar el crecimiento axonal modulando la acción de distintos tipos de moléculas difusibles ([Hildebrand et al., 1994](#)). Interesante desde el punto de vista de esta Tesis, la MEC también es capaz de contribuir a la regulación de la respuesta inflamatoria en algunas condiciones, actuando al menos de tres formas: (1) liberando

señales de daño (DAMPs) que regulan la activación de células inflamatorias a través de receptores de reconocimiento de patrones, (2) regulando la disponibilidad (secuestro/presentación) de moléculas como factores de crecimiento o citoquinas, y (3) regulando la migración de células inflamatorias (Gill et al., 2010).

Por ejemplo, El ácido hialurónico fragmentado que es producido en situaciones inflamatorias, puede a su vez funcionar como DAMPs activando receptores TLR2 y TLR4 en macrófagos, microglia y astrocitos; promoviendo la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y otros mediadores, y perpetuando de esta forma la respuesta inflamatoria (Gaudet & Popovich, 2014). Al mismo tiempo tiene un efecto quimiotáctico en macrófagos y neutrófilos. También los proteoglicanos pueden regular la respuesta inflamatoria, y existen ejemplos documentando la participación de los tres tipos de mecanismo descritos. Los proteoglicanos pueden ocultar sitios de clivaje en citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento. Al mismo tiempo, fragmentos de proteoglicanos clivados, o proteoglicanos sintetizados en respuesta a la injuria pueden actuar como DAMPs. Finalmente, los proteoglicanos pueden unir quimioquinas regulando de esta forma la migración de leucocitos a los sitios de inflamación (Gill et al., 2010; Parks et al., 2004). Como se mencionara, la expresión y regulación hormonal de varios proteoglicanos ha sido descrita en el útero en condiciones fisiológicas y experimentales en las que es sabido que existe una respuesta inflamatoria activa (Hjelm et al., 2001; Salgado et al., 2008, San Martín et al., 2003; Sanches et al., 2010).

Complementariamente, además de un potencial efecto directo sobre las terminales nerviosas, la respuesta inflamatoria también puede ejercer efectos sobre los nervios simpáticos alterando las características del tejido. Por ejemplo, y relevante en el contexto de esta Tesis, es un fenómeno ampliamente documentado que distintas células y mediadores inflamatorios pueden afectar directa o indirectamente la composición y estructura de la matriz extracelular. En particular los eosinófilos pueden expresar proteínas componentes de la matriz extracelular como laminina, tenascina, lumican y procolágeno III (Christie et al., 2004; Flood-Page et al., 2003; Phipps et al., 2004), así como metaloproteinasas de matriz (MMPs) (Dahlen et al., 1999). Este mecanismo es clave en la remodelación tisular observada en la respuesta inflamatoria asociada al asma de origen alérgico (Christie et al., 2004; Dahlen et al., 1999; Flood-Page et al., 2003). El ácido hialurónico (HA), componente clave de la matriz en el CNS, es degradado como resultado de la activación de la respuesta inflamatoria por acción de especies reactivas de oxígeno, y de enzimas como hialuronidasas y MMPs; provocando modificaciones en la arquitectura de la matriz debido a la importante función estructural que cumple el HA (Gaudet & Popovich, 2014).

La matriz extracelular y moléculas asociadas, así como la respuesta inflamatoria, surgen a partir de este trabajo como contribuyentes adicionales a las señales moleculares ya descritas en los fenómenos de plasticidad observados en la innervación autónoma uterina en respuesta al estrógeno. A pesar de la importante cantidad de información acumulada, la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la plasticidad de la innervación uterina es aún fragmentaria.

La redundancia de mecanismos actuando en conjunto en la regulación de la neurodegeneración simpática del tejido uterino en respuesta al estrógeno, sugiere la relevancia de este proceso en la fisiología del órgano. Asimismo, es posible que el complejo arreglo de señales moleculares y mecanismos implicados pueda contribuir a regular de forma diferencial la respuesta de los distintos tipos de neuronas que innervan el tejido uterino, a través de la regulación de la expresión o actividad de los receptores para las distintas señales identificadas. Finalmente, la multiplicidad de señales podría además de conferir selectividad, permitir que distintos aspectos de la regulación de la innervación uterina fueran controlados por distintas moléculas con un curso temporal definido y propio. Elucidar la secuencia temporal en la que ocurren estos procesos, e identificar vínculos e interacciones entre distintos actores celulares y moleculares sería un punto clave en la comprensión de los mecanismos subyacentes al efecto neurodegenerativo del estrógeno en nuestro modelo.

Como ha demostrado ser el caso en otras condiciones fisiopatológicas, actualmente comprendemos la neurodegeneración iniciada en el útero por la acción del estrógeno como un fenómeno multifactorial, involucrando la participación de múltiples mediadores celulares y moleculares, cuyas funciones recién comienzan a ser comprendidas. El avance en la comprensión de nuestro modelo de trabajo se ha valido en gran medida de hallazgos realizados en otras condiciones fisiopatológicas y experimentales, que han permitido identificar potenciales candidatos moleculares y plantear nuevas hipótesis. Creemos que de forma recíproca, los avances realizados en nuestro modelo podrían aportar información relevante para la comprensión de los mecanismos subyacentes en otros procesos, tales como la regeneración de nervios periféricos. Finalmente, consideramos que los resultados surgidos de la presente Tesis pueden aportar a la comprensión de los mecanismos subyacentes a patologías ginecológicas en las que la innervación ha demostrado encontrarse alterada, así como a la búsqueda de herramientas diagnósticas y el diseño de estrategias terapéuticas para estas patologías.

Referencias

- Ackley BD, Crew JR, Elamää H, Pihlajaniemi T, Kuo CJ, Kramer JM (2001) The NC1/endostatin domain of *Caenorhabditis elegans* type XVIII collagen affects cell migration and axon guidance. *J Cell Biol* 152: 1219–1232.
- Adams DN, Kao EY, Hypolite CL, Distefano MD, Hu WS, Letourneau PC. (2005) Growth cones turn and migrate up an immobilized gradient of the laminin IKVAV peptide. *J Neurobiol.* 62: 134–147.
- Adcock IM. (2001) Glucocorticoid-regulated Transcription Factors. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 14: 211–219
- Alberti KA, Hopkins AM, Tang-Schomer MD, Kaplan DL, Qiaobing X. (2014) The behavior of neuronal cells on tendon-derived collagen sheets as potential substrates for nerve regeneration. *Biomaterials* 35: 3551–3557.
- Almeida OF, Condé GL, Crochemore C, Demeneix B, Fischer D, Hassan H, ... Michaelidis TM. (2000) Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14: 779–790.
- Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. (2004) Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol.* 5: 266–271.
- Amor S, Puentes F, Baker D, Van Der Valk P. (2010) Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* 129: 154–169.
- Amor S, Peferoen LAN, Vogel DYS, Breur M, van der Valk P, Baker D, Van Noort JM. (2014) Inflammation in neurodegenerative diseases - an update. *Immunology* 142: 151–166
- Anton ES, Sandrock AW, Matthew WD (1994) Merosin promotes neurite outgrowth and Schwann cell migration in vitro and nerve regeneration in vivo. *Dev. Biol.* 164:133.
- Antoniou J, Goudsouzian N, Heathfield T, Winterbottom N, Steffen T, Poole A, Aebi M, Alini M (1996) The human lumbar endplate. Evidence of changes in biosynthesis and denaturation of extracellular matrix with growth, maturation, aging, and degeneration. *Spine* 21: 1153.
- Arnaud LT, Myeku N, Figueiredo-Pereira ME. (2009) Proteasome-caspase-cathepsin sequence leading to tau pathology induced by prostaglandin J2 in neuronal cells. *Journal of Neurochemistry* 110: 328–342.
- Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS, Adcock KH, Oohira A, Braisted JE, Levine JM, Margolis RU, Rogers JH, Fawcett JW. (2000) Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J Neurosci* 20: 2427–2438.
- Asher RA, Morgenstern DA, Shearer MC, Adcock KH, Pesheva P, Fawcett JW. (2002) Versican is upregulated in CNS injury and is a product of oligodendrocyte lineage cells. *J Neurosci* 22:2225–2236.
- Atwal JK, Singh KK, Tessier-Lavigne M, Millar FD, Kaplan DR. (2003) Semaphorin 3F antagonizes neurotrophin-induced phosphatidylinositol 3-kinase and mitogenactivated protein kinase signaling: a mechanism for growth cone collapse. *J. Neurosci.* 23: 7602–7609.
- Aumailley M. (2013) The laminin family. *Cell Adhes Migr.* 7:48–55.
- Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmborg A, Karin M. (1995) Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science.* 270: 286–290.
- Becker CG, Becker TT (2002) Repellent guidance of regenerating optic axons by chondroitin sulphate glycosaminoglycans in Zebrafish. *J. Neurosci.* 22: 842.

- Bell C, Malcolm SJ (1988) Neurochemistry of the sympathetic innervation to the uterus. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 15: 667-674.
- Berretta S. (2012) Extracellular matrix abnormalities in schizophrenia. *Neuropharmacology* 62: 1584-1597.
- Bianchimano P, Frías AI, Richeri A, Brauer MM (2007) Effects of dexamethasone on estrogen-and pregnancy-induced plasticity in uterine sympathetic nerves. *Cell Tissue Res* 330: 413. (ADJUNTO)
- Bjorling DE, Beckman M., Clayton MK, Wang ZY (2002) Modulation of nerve growth factor in peripheral organs by estrogen and progesterone. *Neuroscience* 110: 155-167.
- Bohn MC, McEwen B, Luine VN, Black IB. (1984) Development and characterization of glucocorticoid receptors in rat superior cervical ganglion. *Brain Res.* 316: 211-208.
- Bonner J, O'Connor TP. (2001) The permissive cue laminin is essential for growth cone turning in vivo. *J Neurosci.* 21: 9782– 9791.
- Bradbury EJ, Moon LDF, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB. (2002) Chondroitinase ABC promotes axon regeneration and functional recovery following spinal cord injury. *Nature* 416: 636–640.
- Branham WS, Sheehan DM. (1995) Ovarian and adrenal contributions to postnatal growth and differentiation of the rat uterus. *Biol Reprod.* 53: 863-72.
- Brauer MM, Lincoln J, Blundell D, Corbacho A (1992) Postnatal development of noradrenaline- containing nerves of the rat uterus. *J Autonom Nerv Syst* 39: 37-50.
- Brauer MM, Corbacho A and Burnstock G (1995) Effects of chronic and acute oestrogen treatment on the development of noradrenaline-containing nerves of the rat uterus. *Int J Devl Neurosci* 13: 791-798.
- Brauer MM, Burnstock G., Thrassivoulou C, Cowen T (1998) In oculo transplants of myometrium from postpartum guinea pigs fail to support sympathetic reinnervation, *J Anat* 593, 509-517.
- Brauer MM, Chávez-Genaro R, Llodrá J, Richeri A, Scorza MC (2000) Effects of chronic oestrogen treatment are not selective for uterine sympathetic nerves: a transplantation study. *J. Anat.* 196: 347.
- Brauer MM, Chávez-Genaro R, Richeri A, Viettro L., Frias AI, Burnstock G, Cowen T (2002) The oestrogenized rat myometrium inhibits organotypic sympathetic reinnervation. *Autonomic Neurosci: Basic and Clinic* 101: 13-22.
- Brauer MM, Smith PG. (2015) Estrogen and female reproductive tract innervation: Cellular and molecular mechanisms of autonomic neuroplasticity. *Auton. Neurosci.* 187: 1-17.
- Brauer MM. (2016) Plasticity in Uterine Innervation: State of the Art. *Curr Protein Pept Sci.* 18: 1-12.
- Breen KM, Davis TL, Doro LC, Nett T M, Oakley AE, Padmanabhan V, ... Karsch FJ. (2008) Insight into the neuroendocrine site and cellular mechanism by which cortisol suppresses pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 149: 767–773.
- Bruner-Tran KL, Herington JL, Duleba AJ, Taylor HS, Osteen KG. (2013) Medical management of endometriosis: emerging evidence linking inflammation to disease pathophysiology. *Minerva Ginecol.* 65:199-213.
- Busillo JM, Cidlowski JA. (2013) The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends Endocrinol Metab* 24:109-119.
- Cao J, Kitazawa T, Takehana K, Taneike T. (2006) Endogenous prostaglandins regulate spontaneous contractile activity of uterine strips isolated from non-pregnant pigs. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 81: 93–105.

- Cao J, Nakamura T, Kitazawa T, Yamashiki N, Yamamoto T, Taneike T. (2008) Characterization of prostanoid receptors present on adrenergic neurons innervating the porcine uterine longitudinal muscle. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 86: 26–34.
- Carbonetto S, Evans D, Cochard P. (1987) Nerve fiber growth in culture on tissue substrata from central and peripheral nervous system. *J Neurosci* 7: 610.
- Catalano A. (2010). The neuroimmune semaphorin-3A reduces inflammation and progression of experimental autoimmune arthritis. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 185: 6373–83.
- Ceballos D, Navarro X, Dubey N, Wendelschafer-Crabb G, William WR, Kennedy R, Tranquillo RT. (1999) Magnetically aligned collagen gel filling a collagen nerve guide improves peripheral nerve regeneration. *Exp. Neurol.* 158: 290-300.
- Celesia G (1991) Alzheimer's disease: the proteoglycan hypothesis. *Semin. Thromb. Hemost.* 17: 158.
- Cerillo G, Rees A, Manchanda N, Reilly C, Brogan I, White A, Needham M. (1998) The oestrogen receptor regulates NF-kappaB and AP-1 activity in a cell-specific manner. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 67: 79–88.
- Chalar C, Richeri A, Crutcher K, Viettro L, Chávez-Genaro R, Burnstock G, Cowen T, Brauer MM (2003) Oestrogen- and sympathectomy-induced plasticity in developing uterine sensory nerves: the role of NGF. *Cell Tissue Res* 314: 191-205.
- Chávez-Genaro R, Crutcher K, Viettro L, Richeri A, Coirolo N, Burnstock, G, Cowen T, Brauer MM (2002) Differential effects of oestrogen on developing and mature uterine sympathetic nerves. *Cell Tissue Res* 308: 61-73.
- Chen H, He Z, Bagri A, Tessier-Lavigne M. (1998) Semaphorin–neuropilin interactions underlying sympathetic axon responses to class III semaphorin. *Neuron* 21: 1283–1290.
- Chen H, Bagri A, Zupicich JA, Zou Y, Stoeckli E, Pleasure SJ, Lowenstein DH, Skarnes WC, Chédotal A, Tessier-Lavigne M, 2000. Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. *Neuron* 25, 43–56.
- Chen M, Boilard E, Nigrovic PA, Clark P, Xu D, Fitzgerald GA, Audoly LP, Lee DM. (2008) Predominance of cyclooxygenase 1 over cyclooxygenase 2 in the generation of proinflammatory prostaglandins in autoantibody-driven K/BxN serum-transfer arthritis. *Arthritis Rheum.* 58: 1354–1365.
- Choi S-H, Aid S, Caracciolo L, Minami SS, Niikura T, Matsuoka Y, Turner RS, Mattson MP, Bosetti F. J. (2013) Cyclooxygenase-1 inhibition reduces amyloid pathology and improves memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurochem.* 124: 59–68.
- Christie PE, Jonas M, Tsai CH, Chi EY, Henderson WR Jr. (2004) Increase in laminin expression in allergic airway remodelling and decrease by dexamethasone. *Eur Respir J.* 24: 107-115.
- Cidadao AJ, Thorsteinsdottir S, David-Ferreira JF (1990) Immunocytochemical study of tissue distribution and hormonal control of chondroitin-, dermatan- and keratan sulfates from rodent uterus. *Eur. J. Cell Biol.* 52: 105.
- Condic ML, Snow DM, Letourneau PC. (1999) Embryonic neurons adapt to the inhibitory proteoglycan aggrecan by increasing integrin expression. *J. Neurosci.* 19: 10036.
- Condic ML (2001) Adult neuronal regeneration induced by transgenic integrin expression. *J. Neurosci.* 21: 4782.
- Corriveau S, Rousseau E, Berthiaume M, Pasquier JC. (2010) Lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors reveal a complementary role of arachidonic acid derivatives in pregnant human myometrium. *Am J Obstet Gynecol.* 203:266
- Covault J, Cunningham JM, Sanes JR (1987) Neurite outgrowth on cryostat tissue sections of innervated and denervated skeletal muscle. *J Cell Biol* 105:2479.

- Cowen T, Jenner C, Xiao Song G, Budi Santoso AW, Gavazzi I (1997) Responses of mature and aged sympathetic neurons to laminin and NGF: an in vitro study. *Neurochem. Res.* 22: 1003-1011.
- Croxtall JD, Choudhury Q, Flower RJ. (2000) Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br J Pharmacol* 130: 289–98.
- Crutcher KA (1993) Tissue sections as culture substrates: overview and critique. *Hippocampus* 3:157.
- Crutcher KA, Jayasinghe C, Yun Y, Shanov VN (2009) Progress in the Use of Aligned Carbon Nanotubes to Support Neuronal Attachment and Directional Neurite Growth. :187–207.
- Dahlen B, Shute J, Howarth P. (1999) Immunohistochemical localisation of the matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-9 within the airways in asthma. *Thorax.* 54: 590-596.
- Damon DH. (2006) Vascular endothelial-derived semaphorin 3 inhibits sympathetic axon growth. *Am J. Physiol Heart Circ. Physiol.* 290: H1220–H1225.
- Davoine F, Lacy P. (2014) Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: Emerging roles in immunity. *Frontiers in Immunology* 5: 1–17.
- de Curtis I (1991) Neuronal interactions with extracellular matrix. *Cur Op Cell Biol.* 3: 824.
- de Luca AC, Lacour SP, Raffoul W, di Summa PG. (2014) Extracellular matrix components in peripheral nerve repair: How to affect neural cellular response and nerve regeneration? *Neural Regeneration Research*, 9: 1943–1948.
- Dickson DW, Farlo J, Davies P, Crystal H, Fuld P, Yen SH. (1988) Alzheimer's disease. A double-labeling immunohistochemical study of senile plaques. *Am J Pathol.* 132: 86-101.
- Dong YL, Gangula PRR, Fang L, Yallampalli C. (1996) Differential expression of cyclooxygenase-1 and -2 proteins in rat uterus and cervix during the estrous cycle, pregnancy, labor and in myometrial cells. *Prostaglandins*, 52: 13–34.
- Dubey N, Letourneau PC, Tranquillo RT. (1999) Guided neurite elongation and Schwann cell invasion into magnetically aligned collagen in simulated peripheral nerve regeneration. *Exp. Neurol.* 269: 338-350.
- Durcan N, Costello RW, McLean WG, Blusztajn J, Madziar B, Fenech AG, Hall IP, Gleich GJ, McGarvey L, Walsh MT. (2005) Eosinophil-mediated cholinergic nerve remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34:775.
- East E, Blum de Oliveira D, Golding JP, Phillips JB. (2010) Alignment of astrocytes increases neuronal growth in three-dimensional collagen gels and is maintained following plastic compression to form a spinal cord repair conduit. *Tissue Eng. Part A* 16: 3173-3184.
- Fassold A, Falk W, Anders S, Hirsch T, Mirsky VM, Straub RH. (2009) Soluble neuropilin-2, a nerve repellent receptor, is increased in rheumatoid arthritis synovium and aggravates sympathetic fiber repulsion and arthritis. *Arthritis Rheum.* 60, 2892–2901.
- Fassold A, Straub RH. (2010). A new assay for nerve fiber repulsion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1193: 43–47.
- Fawcett JW. (2015) The extracellular matrix in plasticity and regeneration after CNS injury and neurodegenerative disease. *Progress in Brain Research* 218: 213–226.
- Fazleabas AT, Bell SC, Fleming S, Sun J, Lessey BA. (1997) Distribution of integrins and extracellular matrix proteins in the baboon endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy. *Biol Reprod.* 456: 348-356.
- Figueiredo-Pereira ME, Rockwell P, Schmidt-Glenewinkel T, Serrano P. (2014) Neuroinflammation and J2 prostaglandins: linking impairment of the ubiquitin-proteasome pathway and mitochondria to neurodegeneration. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7:104.

- Flood-Page P, Menzies-Gow A, Phipps S, Ying S, Wangoo A, Ludwig MS, Barnes N, Robinson D, Kay AB. (2003) Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics. *J Clin Invest.* 112: 1029-1036.
- Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. (2010) The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 123: 4195-200.
- Gardner RT, Habecker B. (2013) Infarct-Derived Chondroitin Sulfate Proteoglycans Prevent Sympathetic Reinnervation after Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of Neuroscience*, 33: 7175–7183.
- Garland A, Necheles J, White SR, Neeley SP, Leff AR, Carson SS, Alger LE, McAllister K, Solway J. (1997) Activated eosinophils elicit substance P release from cultured dorsal root ganglion neurons. *Am J Physiol.* 273: L1096-1102.
- Gaudet AD, Popovich PG. (2014) Extracellular matrix regulation of inflammation in the healthy and injured spinal cord. *Exp Neurol.* 258: 24-34.
- Gavazzi I, Boyle KS, Edgar D, Cowen T (1995) Reduced laminin immunoreactivity in the blood vessel wall of ageing rats correlates with reduced innervation in vivo and following transplantation. *Cell Tissue Res.* 281: 23.
- Gavazzi I, Boyle KS, Cowen T. (1996) Extracellular matrix molecules influence innervation density in rat cerebral blood vessels. *Brain Research*, 734: 167–74.
- Giger RJ, Urquhart ER, Gillespie SK, Levengood DV, Ginty DD, Kolodkin AL. (1998) Neuropilin-2 is a receptor for semaphorin IV: insight into the structural basis of receptor function and specificity. *Neuron* 21: 1079–1092.
- Gill S, Wight TN, Frevert CW. (2010) Proteoglycans: key regulators of pulmonary inflammation and the innate immune response to lung infection. *Anat. Rec.* 293: 968–981.
- Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby D. (1999) Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nature Medicine* 5: 698–701.
- Gnanamanickam GJ, Llewellyn-Smith IJ. (2011) Innervation of the rat uterus at estrus: a study in full-thickness, immunoperoxidase-stained whole-mount preparations. *J Comp Neurol.* 519: 621-643.
- Gore AC, Attardi B, DeFranco DB. (2006) Glucocorticoid repression of the reproductive axis: effects on GnRH and gonadotropin subunit mRNA levels. *Mol Cell Endocrinol.* 256:40–48.
- Gouon-Evans V, Pollard JW. (2001) Eotaxin is required for eosinophil homing into the stroma of the pubertal and cycling uterus. *Endocrinology* 142: 4515-4521.
- Guillon E, Bretaud S, Ruggiero F. (2016) Slow Muscle Precursors Lay Down a Collagen XV Matrix Fingerprint to Guide Motor Axon Navigation. *J Neurosci.* 36 : 2663–2676.
- Gunin AG, Sharov AA, Nikolaev DV. (2000) Two month glucocorticoid treatment increases estradiol-induced stromal and myometrial cell proliferation in the uterus of ovariectomized rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 88: 171-179.
- Gunin AG, Mashin IN, Zakharov DA. (2001) Proliferation, mitosis orientation and morphogenetic changes in the uterus of mice following chronic treatment with both estrogen and glucocorticoid hormones. *J Endocrinol.* 169: 23-31.
- Gupta VA, Kawahara G, Myers JA, Chen AT, Hall TE, Manzini MC, Currie PD, Zhou Y, Zon LI, Kunkel LM, Beggs AH. (2012) A splice site mutation in laminin- α 2 results in a severe muscular dystrophy and growth abnormalities in zebrafish. *PLoS One.* 7: e43794.
- Graham JB, Neubauer D, Xue QS, Muir D. (2007) Chondroitinase applied to peripheral nerve repair averts retrograde axonal regeneration. *Exp Neurol.* 203:185–195.
- Haase EB, Buchman J, Tietz AE, Chramm LP (1997) Pregnancy-induced uterine neuronal degeneration in the rat. *Cell Tissue Res* 288: 293-306.

- Jaffe HL. (1924) The influence of the suprarenal gland on the thymus. *The Journal of Experimental Medicine* 40:325-343
- Hagerty T, Morgan WW, Elango N, Strong R. (2001) Identification of a glucocorticoid-responsive element in the promoter region of the mouse tyrosine hydroxylase gene. *J Neurochem.* 76: 825-834.
- Harburger DS, Calderwood DA. (2009) Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci.* 122:159-163.
- Harvey PW, Chevins PF. (1987) Deleterious effects of adrenocorticotrophic hormone administration during late pregnancy upon offspring somatic, neurological, and sexual development in mice. *Teratology* 35: 229–238.
- Hasan W, Smith HJ, Ting AY, Smith PG. (2005) Estrogen alters trkA and p75 neurotrophin receptor expression within sympathetic neurons. *J Neurobiol.* 65:192-204.
- Hayashi KT, Moberg GP. (1990) Influence of the hypothalamic-pituitaryadrenal axis on the menstrual cycle and the pituitary responsiveness to estradiol in the female rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Biol Reprod.* 42: 260–265.
- Helige C, Ahammer H, Moser G, Hammer A, Dohr G, Huppertz, B, Sedlmayr P. (2014) Distribution of decidual natural killer cells and macrophages in the neighbourhood of the trophoblast invasion front: A quantitative evaluation. *Human Reproduction*, 29: 8–17.
- Heneka MT, Carson MJ, Khoury JEI, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, ... Kummer Lancet MP. (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14: 388–405.
- Herrenkohl LR. (1979) Prenatal stress reduces fertility and fecundity in female offspring. *Science.* 206: 1097-1099.
- Herrenkohl LR. (1986) Prenatal stress disrupts reproductive behavior and physiology in offspring. *Ann N Y Acad Sci.* 474: 120-128.
- Hewitt SC, Deroo BJ, Hansen K, Collins J, Grissom S, Afshari C, Korach KS. (2003) Estrogen receptor-dependent genomic responses in the uterus mirror the biphasic physiological response to estrogen. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17:2070–2083.
- Hickman SE, Allison EK, Khoury JEI. (2008) Microglial dysfunction and defective β -amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 28: 8354-8360.
- Hildebrand A, Romarís M, Rasmussen LM, Heinegård D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E. (1994) Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J.* 302: 527-534.
- Hill CE, Chamley JH, Burnstock G (1974) Cell surfaces and fibre relationships in sympathetic ganglion cultures: a scanning electron-microscopic study. *J Cell Sci.* 14: 657-669.
- Hjelm A, Ekman-Ordeberg G, Barchan K, Malmström A. (2001) Identification of the major proteoglycans from human myometrium. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 80: 1084-90.
- Hjelm AM, Barchan K, Malmström A, Ekman-Ordeberg GE. (2002) Changes of the uterine proteoglycan distribution at term pregnancy and during labour. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 100:146-151.
- Horrrillo R, Planagumà A, González-Pérez A, Ferré N, Titos E, Miquel R, López-Parra M, Masferrer JL, Arroyo V, Clària J. (2007) Comparative protection against liver inflammation and fibrosis by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor and a nonredox-type 5-lipoxygenase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther.* 323:778-86.
- Houdeau E, Rosseau A, Meusnier C, Prud'Homme MJ, Rousseau JP (1998) Sympathetic innervation of the upper and lower regions of the uterus and cervix in the rat have different origins and routes. *J Comp Neurol* 399: 403-412.

- Hurtado A, Cregga JM Wang HB, Wendella DF, Oudegad M, Gilbertc RJ, McDonald JW. (2011) Robust CNS regeneration after complete spinal cord transection using aligned poly-L-lactic acid microfibers. *Biomaterials* 32: 6068–6079.
- Hynds DL, Snow DM (2001) Fibronectin and laminin elicit differential behaviors from SH-SY5Y growth cones contacting inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans. *J. Neurosci. Res.* 66: 630.
- Ide C. Peripheral nerve regeneration. (1996) *Neurosci Res.* 25: 101–121.
- Ieda M, Fukuda K, (2009) New aspects for the treatment of cardiac diseases based on the diversity of functional controls on cardiac muscles: the regulatory mechanisms of cardiac innervation and their critical roles in cardiac performance. *J. Pharmacol. Sci.* 109: 348–353.
- Itoh S, Hirota R. (1977) [Changes in adrenal gland and thymus induced by sex steroid administration in newborn rats]. 53: 142-150.
- Ivins JK, Yurchenko PD, Lander AD (2000) Regulation of neurite outgrowth by integrin activation. *J. Neurosci.* 20: 6551.
- Jabbour HN, Sales KJ, Catalano RD, Norman JE. (2009) Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. *Reproduction*, 138: 903–919.
- Jaffe HL. (1924) The influence of the suprarenal gland on the thymus: regeneration of the thymus following double suprarenalectomy in the rat. *J Exp Med.* 40: 325-342.
- Jeanneteau F, Garabedian MJ, Chao MV. (2008) Activation of Trk neurotrophin receptors by glucocorticoids provides a neuroprotective effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 4862–7
- Jee YK, Gilmour J, Kelly A, Bowen H, Richards D, Soh C, ... Lavender P. (2005) Repression of Interleukin-5 transcription by the glucocorticoid receptor targets GATA3 signaling and involves histone deacetylase recruitment. *Journal of Biological Chemistry* 280: 23243–23250.
- Jones LL, Margolis RU, Tuszynski MH. (2003) The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp Neurol.* 182: 399-411.
- Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP (2007) Collagens at a glance. *Journal of Cell Science* 120: 1955-1958.
- Kassel O, Sancono A, Krätzschar J, Kreft B, Stassen M, Cato AC. (2001) Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *EMBO J.* 20: 7108-7116.
- Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, Bremer M, and Isakson P. (1996) COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2317-2321.
- Kawabe J, Ushikubi F, Hasebe N. (2010) Prostacyclin in vascular diseases: Recent insights and future perspectives. *Circ J.* 74: 836-843.
- Kilen SM, Szabo M, Strasser GA, McAndrews JM, Ringstrom SJ, Schwartz NB. (1996) Corticosterone selectively increases follicle-stimulating hormone beta-subunit messenger ribonucleic acid in primary anterior pituitary cell culture without affecting its half-life. *Endocrinology.* 137: 3802-3807.
- Kim Y, Haftel VK, Kumar S, Bellamkonda RV. (2008) The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging long peripheral nerve gaps. *Biomaterials* 29: 3117–3127.
- Kingham PJ, McLean WG, Walsh MT, Fryer AD, Gleich GJ, Costello RW. (2003) Effects of eosinophils on nerve cell morphology and development: the role of reactive oxygen species and p38 MAP kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 285: 915-924.

- Koch D, Rosoff WJ, Jiang J, Geller HM, Urbach JS. (2012) Strength in the periphery: Growth cone biomechanics and substrate rigidity response in peripheral and central nervous system neurons. *Biophys J*. 102:452–460.
- Kokenyesi R, Woessner JF Jr. (1991) Effects of hormonal perturbations on the small dermatan sulfate proteoglycan and mechanical properties of the uterine cervix of late pregnant rats. *Connect Tissue Res*. 26: 199-205.
- Korystov YN, Dobrovinskaya OR, Shaposhnikova VV, Eidus LK. (1996) Role of arachidonic acid metabolism in thymocyte apoptosis after irradiation. *FEBS Letters*, 388: 238–241.
- Krekoski C a, Neubauer D, Zuo J, Muir D. (2001) Axonal regeneration into acellular nerve grafts is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci*. 21: 6206–6213.
- Krizsan-Agbas D, Smith PG (2002) Estrogen modulates myometrium-induced sympathetic neurite formation through actions on target and ganglion. *Neuroscience* 114: 339-347.
- Krizsan-Agbas D, Pedchenko, Hasan W, Smith PG (2003) Oestrogen regulates sympathetic neurite outgrowth by modulating brain derived neurotrophic factor synthesis and release by the rodent uterus. *Eur J Neurosci* 18: 2760-2768.
- Krizsan-Agbas D, Pedchenko T, Smith PG (2008) Neurotrimin is an estrogen-regulated determinant of peripheral sympathetic innervation. *J Neurosci Res* 86: 3086-3095.
- Landolt RM, Vaughan L, Winterhalter KH, Zimmermann DT (1995) Versican is selectively expressed in embryonic tissue that act as barriers to neural crest cell migration and axon outgrowth. *Development* 121: 2303.
- Lanfer B, Herman A, Kirsch M, Freudenberg U, Reuner U, Werner C, Storch A, (2010) Direct growth of adult human white matter stem cell-derived neurons on aligned fibrillar collagen. *Tissue Eng*. 16, 1103-1113.
- Lang BT, Cregg JM, DePaul MA, Tran AP, Xu K, Dyck SM, Madalena KM, Brown BP, Weng YL, Li S, Karimi-Abdolrezaee S, Busch SA, Shen Y, Silver J. (2015) Modulation of the proteoglycan receptor PTP α promotes recovery after spinal cord injury. *Nature* 518: 404-408.
- Lapchak PA, Araujo DM, Song D, Zivin JA. (2001) Neuroprotection by the selective cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 results in improvements in behavioral deficits induced by reversible spinal cord ischemia. *Stroke*. 32:1220-5.
- Lasa M, Brook M, Saklatvala J, Clark AR. (2001) Dexamethasone Destabilizes Cyclooxygenase 2 mRNA by Inhibiting Mitogen-Activated Protein Kinase p38 Dexamethasone Destabilizes Cyclooxygenase 2 mRNA by Inhibiting Mitogen-Activated Protein Kinase p38. *Molecular and Cellular Biology*, 21: 771–780.
- Lee DS, Yanagimoto Ueta Y, Xuan X, Igarashi I, Fujisaki K, Sugimoto C, ... Suzuki H. (2005) Expression patterns of the implantation-associated genes in the uterus during the estrous cycle in mice. *The Journal of Reproduction and Development* 51: 787–98.
- Lein PJ, Higgins D, Turner DC, Flier LA, Terranova VP. (1991) The NC1 domain of type IV collagen promotes axonal growth in sympathetic neurons through interaction with the $\alpha 1 \beta 1$ integrin. *The Journal of Cell Biology* 113: 417–28.
- Lentz SI, Miner JH, Snider WD (1997) Distribution of the ten known laminin chains in the pathway and targets of developing sensory axons. *J. Comp. Neurol*. 378: 547.
- Letourneau PC, Condic ML, Snow DM (1994) Interactions of developing neurons with the extracellular matrix. *J Neurosci* 14:915–928.
- Li N, Folch A (2005) Integration of topographical and biochemical cues by axons during growth on microfabricated 3-D substrates. *Exp Cell Res* 311: 307-316.

- Liang G, Shi B, Luo W, Yang J. (2015) The protective effect of caffeic acid on global cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Behavioral and Brain Functions*, 1–10.
- Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK. (1997) Multiple female reproductive failures in Cyclooxygenase 2 – Deficient Mice. *Cell* 91: 197–208.
- Liu T, Houle JD, Xu J, Chan BP, Chew SY. (2012) Nanofibrous Collagen Nerve Conduits for Spinal Cord Repair *Tissue Eng Part A* 18: 1057-1066
- Liu M, Yokomizo T. (2015). The role of leukotrienes in allergic diseases. *Allergology International*, 64: 17–26.
- Lobos E., Gebhardt C., Kluge A., Spanel-Borowski K. (2005) Expression of nerve growth factor (NGF) in the rat uterus during pregnancy: accumulation of precursor proNGF. *Endocrinology* 146: 1922-1929.
- Luna-Gomes T, Bozza PT, Bandeira-Melo C. (2013) Eosinophil recruitment and activation: The role of lipid mediators. *Frontiers in Pharmacology*, 4: 1–8.
- Macfarland A, Mann R. (1977) The Inhibitory Effects of ACTH Reproductive Maturation and Adrenalectomy in Female Rats. *Biology of Reproduction* 16: 306–314.
- Maeda N, Fukazawa N, Ishii M. (2010) Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and plasticity. *Frontiers in Bioscience* 15: 626-644.
- Margolis RU, Margolis RK (1997) Chondroitin sulfate proteoglycans as mediators of axon growth and pathfinding. *Cell Tissue Res*. 290: 343.
- Martínez GF, Bianchimano P, Brauer MM. (2016) Estrogen-induced collagen reorientation correlates with sympathetic denervation of the rat myometrium. *Auton Neurosci*. 201: 32-39. (ADJUNTO)
- Marzioni D, Tamagnone L, Capparuccia L, Marchini C, Amici A, Todros T, Bischof P, Neidhart S, Grenningloh G, Castellucci M (2004) Restricted innervation of uterus and placenta during pregnancy: evidence for a role of the repelling signal Semaphorin 3A. *Dev Dyn* 231: 839-848.
- Matteri RL, Watson JG, Moberg GP. (1984) Stress or acute adrenocorticotrophin treatment suppresses LHRH-induced LH release in the ram. *J Reprod Fertil*. 72: 385–393.
- McEwen BS. (1999) Stress and the aging hippocampus. *Frontiers in Neuroendocrinology* 20: 49–70.
- McGeer PL, Itagaki S, Tago H, McGeer EG. (1987) Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neurosci Lett* 79: 195–200.
- McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG. (1996) Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: A review of 17 epidemiologic studies. *NEUROLOGY* 47: 425-432.
- McGeer EG, McGeer PL. (1998) The importance of inflammatory mechanisms in alzheimer disease. *Experimental Gerontology* 33: 371–378.
- McGeer PL, McGeer EG. (2001) Inflammation, autotoxicity and Alzheimer. *Neurobiology of Aging* 22: 799–809.
- McGeer PL, McGeer EG. (2011) History of innate immunity in neurodegenerative disorders. *Frontiers in Pharmacology* 2: 1–5.
- McGeer PL, McGeer EG. (2013) The amyloid cascade inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy. *Acta Neuropathol*. 126: 479–497.
- McRae PA, Porter BE. (2012) The perineuronal net component of the extracellular matrix in plasticity and epilepsy. *Neurochem Int*. 6: 963-72.
- Melo RC, Machado CR (1993) Noradrenergic and acetylcholinesterase-positive nerve fibres of the uterus in sexually immature and cycling rats. *Histochem J* 25: 213-218.

- Metcalf MJ, Huang Q, Figueiredo-Pereira ME. (2012) Coordination between proteasome impairment and caspase activation leading to TAU pathology: neuroprotection by cAMP. *Cell Death & Disease* 3: e326.
- Miao QL, Ye Q, Zhang XH. (2014). Perineuronal net, CSPG receptor and their regulation of neural plasticity. *Sheng Li Xue Bao : [Acta Physiologica Sinica]*, 66: 387–97.
- Micutkova L, Rychkova N, Sabban EL, Krizanova O, Kvetnansky R. (2003) Quantitation of changes in gene expression of norepinephrine biosynthetic enzymes in rat stellate ganglia induced by stress. *Neurochem Int.* 43: 235-242.
- Miller LE, Jüsten HP, Schölmerich J, Straub RH. (2000) The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14: 2097–2107.
- Miller LE, Weidler C, Falk W, Angele P, Schaumburger J, Schölmerich J, Straub RH. (2004) Increased Prevalence of Semaphorin 3C, a Repellent of Sympathetic Nerve Fibers, in the Synovial Tissue of Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 50: 1156–1163.
- Mohri I, Kadoyama K, Kanekiyo T, Sato Y, Kagitani-Shimono K, Saito Y, ... Taniike M. (2007). Hematopoietic prostaglandin D synthase and DP1 receptor are selectively upregulated in microglia and astrocytes within senile plaques from human patients and in a mouse model of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 66: 469–480.
- Moon LDF, Asher RA, Rhodes KE, Fawcett JW, (2001) Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. *Nat. Neurosci.* 4: 465-466.
- Moore SW, Sheetz MP. (2011) Biophysics of substrate interaction: influence on neural motility, differentiation, and repair. *Dev Neurobiol.* 71: 1090-1101.
- Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. (2012) Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci* 1221: 80–87.
- Moustafa FA (1988) Changes in cholinergic and noradrenergic nerves in the pregnant and postpartum uterus of the albino rat and guinea pig. *Acta Anat (Basel)* 132:310-316.
- Munakata H, Isemura M, Yosizawa Z (1984) Sulfated proteoglycans synthesized in myometrium of the estrogen-treated rabbit. *Tohoku J. Exp. Med.* 144: 291.
- Myers JP, Santiago-Medina M, Gomez TM. (2011) Regulation of axonal outgrowth and pathfinding by integrin-ECM interactions
- Nam TG. (2011) Lipid peroxidation and its toxicological implications. *Toxicological Research* 27: 1–6.
- Nankova B, Kvetnansky R, Hiremagalur B, Sabban B, Rusnak M, Sabban EL. (1996) Immobilization stress elevates gene expression for catecholamine biosynthetic enzymes and some neuropeptides in rat sympathetic ganglia: effects of adrenocorticotropin and glucocorticoids. *Endocrinology* 137: 5597-5604.
- Naska S, Lin DC, Miller FD, Kaplan DR. (2010) p75NTR is an obligate signaling receptor required for cues that cause sympathetic neuron growth cone collapse. *Mol. Cell. Neurosci.* 45: 108–120.
- Nie M, Knox A J, Pang L. (2005) 2-Adrenoceptor Agonists, Like Glucocorticoids, Repress Eotaxin Gene Transcription by Selective Inhibition of Histone H4 Acetylation. *The Journal of Immunology* 175: 478–486.
- Noakes PG, Gautam M, Mudd J, Sanes JR, Merlie JP. (1995) Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking S-Laminin/ Laminin B2. *Nature* 374: 258–262.
- Ochi T, Ohkubo Y, Mutoh S. (2003) Role of cyclooxygenase-2, but not cyclooxygenase-1, on type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice. *Biochemical Pharmacology* 66: 1055–1060.

- Ohtake Y, Wong D, Abdul-Muneer PM, Selzer ME, Li S (2016) Two PTP receptors mediate CSPG inhibition by convergent and divergent signaling pathways in neurons. *Sci Rep.* 6:37152.
- Oohira A, Matsui F, Tokita Y, Yamauchi S, Aono S. (2000) Molecular interactions of neural chondroitin sulfate proteoglycans in the brain development. *Arch Biochem Biophys.* 374: 24-34.
- Orike N, Thrasyvoulou C, Wrigley A, Cowen T. (2001) Differential regulation of survival and growth in adult sympathetic neurons: an in vitro study of neurotrophin responsiveness. *J Neurobiol.* 47: 295-305.
- Owman C, Stjernquist M (1988) Origin, distribution and functional aspects of aminergic and peptidergic nerves in the male and female genital tracts. In: Björklund A, Hökfelt T, Owman C (eds), *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Elsevier Science Publishers, pp. 445-544.
- Pakrasi PL, Dey SK. (1985) Evidence for an inverse relationship between cyclooxygenase and lipoxygenase pathways in the pregnant rabbit endometrium. *Prostaglandins Leukotrienes and Medicine* 18: 347-352.
- Papka RE, Cotton JP, Traurig HH (1985) Comparative distribution of neuropeptide tyrosine-, vasoactive intestinal polypeptide-, substance P-immunoreactive, acetylcholinesterase-positive and noradrenergic nerves in the reproductive tract of the female rat. *Cell Tissue Res.* 242: 475-490.
- Papka RE, Traurig HH. (1993) Autonomic efferent and visceral sensory innervation of the female reproductive system: special reference to neurochemical markers in nerves and ganglionic connections. In: *Nervous Control of the Urogenital System*. (ed. Maggi CA.), pp. 423-436, Harwood Academic Publishers, Switzerland.
- Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. (2004) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 617–629.
- Pasterkamp RJ, Kolodkin AL. (2003) Semaphorin junction: Making tracks toward neural connectivity. *Current Opinion in Neurobiology* 13: 79–89.
- Pastore GN, Dicola LP, Dollahan NR, Gardner RM. (1992) Effect of estriol on the structure and organization of collagen in the lamina propria of the immature rat uterus. *Biol Reprod.* 1992 47:83-91.
- Paulus JD, Halloran MC. (2006) Zebrafish bashful/laminin- α 1 mutants exhibit multiple axon guidance defects. *Dev Dyn.* 235: 213–224.
- Peppler RD, Jacobs JJ. (1976) The effect of adrenalectomy on ovulation and follicular development in the rat. *Biology of Reproduction* 15: 173–178.
- Perez MC, Furth EE, Matsumura PD, Lytle CR. (1996) Role of Eosinophils in Uterine Responses to Estrogen. *Biology of reproduction* 54: 249-254.
- Pettigrew DB, Crutcher KA (1999) White matter of the CNS supports or inhibits neurite outgrowth in vitro depending on geometry. *J Neurosci* 19: 8358.
- Pettigrew DB, Crutcher KA (2001) Myelin contributes to the parallel orientation of axonal growth on white matter *in vitro*. *BMC Neurosci* 2:9
- Pettigrew DB, Shockely KP, Crutcher KA (2001) Disruption of spinal cord white matter and sciatic nerve geometry inhibits axonal growth *in vitro* in the absence of glial scarring. *BMC Neurosci* 2:8
- Phillips JB, Bunting SCJ, Hall SH, Brown RA. (2005) Neural tissue engineering: a self-organizing collagen guidance conduit. *Tissue Eng.* 11, 1611-1617.
- Phipps S, Flood-Page P, Menzies-Gow A, Ong YE, Kay AB. (2004) Intravenous anti-IL-5 monoclonal antibody reduces eosinophils and tenascin deposition in allergen-challenged human atopic skin. *J Invest Dermatol.* 122: 1406.
- Pierre SR, Lemmens MA, Figueiredo-Pereira ME. (2009) Subchronic infusion of the product of inflammation prostaglandin J2 models sporadic Parkinson's disease in mice. *J Neuroinflammation*, 6: 18.

- Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L. (2002) Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex with chondroitinase ABC. *Science* 298: 1248–1251.
- Politch JA, Herrenkohl LR. (1984) Postnatal ACTH and corticosterone: effects on reproduction in mice. *Physiol Behav.* 32: 447-452.
- Porcinatto MA (2006) The extracellular matrix provides directional cues for neuronal migration during cerebellar development. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39: 313.
- Puri CP, Mac Kenzie LW, Garfield RE, Wiest WG. (1984) Uterotropic action of indomethacin on the rat uterus. *Biol Reprod.* 30: 1027-1038.
- Rabin DS, Johnson EO, Brandon DD, Liapi C, Chrousos GP (1990) Glucocorticoids inhibit estradiol-mediated uterine growth: possible role of the uterine estradiol receptor. *Biol Reprod* 42: 74-80.
- Raper JA, Tessier-Lavigne M (1999) Growth cone and axon pathfinding. In: *Fundamental Neuroscience* (MJ Zigmond, FE Bloom, SC Landis, JL Roberts and LR Squire, eds.) Academic Press, San Diego, pp. 519.
- Rhen T, Grissom S, Afshari C, Cidlowski JA (2003) Dexamethasone blocks the rapid biological effects of 17 β -estradiol in the rat uterus without antagonizing its global genomic actions. *FASEB J* 17: 1849.
- Rhen T, Cidlowski J. (2006) Estrogens and glucocorticoids have opposing effects on the amount and latent activity of complement proteins in the rat uterus. *Biology of Reproduction* 74: 265–74.
- Ricciotti E, FitzGerald GA. (2011) Prostaglandins and Inflammation *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 986–1000.
- Richeri A, Bianchimano P, Mármol NM, Viettro L, Cowen T, Brauer MM (2005) Plasticity in rat uterine sympathetic nerves: the role of TrkA and p75 nerve growth factor receptors. *J Anat* 207:125.
- Richeri A, Chalar C, Bianchimano P, Greif G, Brauer MM (2008) Estrogen regulation of semaphorin expression in the rat uterus. *EMBO Workshop Semaphorin Function and Mechanisms of Action*. Abbaye des Vaux de Cernay, France (Abstract).
- Richeri, A., Bianchimano, P., Crutcher, K.A., Brauer, M.M., 2010. Reduced sympathetic neurite outgrowth on uterine tissue sections from rats treated with estrogen. *Cell Tissue Res.* 340: 287–301. (ADJUNTO)
- Richeri A, Chalar C, Martínez G, Greif G, Bianchimano P, Brauer MM. (2011) Estrogen up-regulation of semaphorin 3F correlates with sympathetic denervation of the rat uterus. *Auton Neurosci.* 164:43-50.
- Robertson SA, Mau VJ, Young IG, Matthaei KI. (2000) Uterine eosinophils and reproductive performance in interleukin 5-deficient mice. *Journal of Reproduction and Fertility* 120: 423–32.
- Rocca B, Spain LM, Puré E, Langenbach R, Patrono C, FitzGerald GA. (1999). Distinct roles of prostaglandin H synthases 1 and 2 in T-cell development. *Journal of Clinical Investigation*, 103 : 1469–1477
- Rogers J, Cooper NR, Webster S, Schultz J, McGeer PL, Styren SD, Civin WH, Brachova L, Bradt B, Ward P, Lieberburg I. (1992) Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 10016-10020.
- Rogers J, Kirby LC, Hempelman SR, Berry DL, McGeer PL, Kaszniak AW, Zalinski J, Cofield M, Mansukhani L, Willson P, et al. (1993) Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. *Neurology.* 43: 1609-1611.
- Romberg C, Yang S, Melani R, Andrews MR, Horner AE, Spillantini MG, Bussey TJ, Fawcett JW, Pizzorusso T, Saksida LM, (2013) Depletion of perineuronal nets enhances recognition memory and long-term depression in the perirhinal cortex. *J. Neurosci.* 33 7057–7065.
- Roney K, Holl E, Ting J. (2013) Immune plexins and semaphorins: old proteins, new immune functions. *Protein Cell.* 4: 17–26.

Rosengren E, Sjöberg NO (1967) The adrenergic nerve supply to the female reproductive tract of the cat. *Am J Anat* 121:271-83.

Russo L a, Peano BJ, Trivedi SP, Cavalcanto TD, Olenchock B a, Caruso J a, Smolock AR, Vishnevsky O, Gardner RM. (2009) Regulated expression of matrix metalloproteinases, inflammatory mediators, and endometrial matrix remodeling by 17beta-estradiol in the immature rat uterus. *Reprod Biol Endocrinol* 7:124.

Saffran BN, Crutcher KA. (1990) NGF-induced remodeling of mature uninjured axon collaterals. *Brain Res.* 525: 11–20.

Sahlin L. (1995) Dexamethasone attenuates the estradiol-induced increase of IGF-I mRNA in the rat uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 55: 9-15.

Saklatvala J. (2002) Glucocorticoids: do we know how they work? *Arthritis Res* 4: 146–150.

Sales KJ, Jabbour HN. (2003) Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in reproductive tract physiology and pathology. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 71: 97–117.

Salgado RM, Capelo LP, Favaro RR, Glazier JD, Aplin JD, Zorn TMT. (2009a) Hormone-regulated expression and distribution of versican in mouse uterine tissues. *Reprod Biol Endocrinol.* 7 :60.

Salgado RM, Favaro RR, San Martin S, Zorn TMT. (2009b) The estrous cycle modulates small leucine-rich proteoglycans expression in mouse uterine tissues. *Anat Rec.* 292: 138–153.

Salgado RM, Favaro RR, Zorn TMT. (2011) Modulation of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) expression in the mouse uterus by estradiol and progesterone. *Reprod Biol Endocrinol.* 9:22.

San Martin S, Soto-Suazo M, Ferreira de Oliveira S, Aplin JD, Abrahamsohn P, Zorn TMT. (2003) Small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) in uterine tissues during pregnancy in mice. *Reproduction* 125: 585–595.

Sanches JCT, Jones CJP, Aplin JD, Iozzo R V., Zorn TMT, Oliveira SF. (2010) Collagen fibril organization in the pregnant endometrium of decorin-deficient mice. *J Anat* 216: 144–155.

Sanchez-Pernaute R, Ferree A, Cooper O, Yu M, Brownell AL, Isacson O. (2004) Selective COX-2 inhibition prevents progressive dopamine neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* 1: 1-7.

Sandrock AW Jr, Matthew WD. (1987a) Identification of a peripheral nerve neurite growth-promoting activity by development and use of an in vitro bioassay. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6934.

Sandrock AW Jr, Matthew WD. (1987b) Substrate-bound nerve growth factor promotes neurite growth in peripheral nerve. *Brain Res.* 425: 360-363.

Sawatzky DA, Kingham PJ, Durcan N, McLean WG, Costello RW. (2003) Eosinophil-induced release of acetylcholine from differentiated cholinergic nerve cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 285: L1296-1304.

Schaefer L, Schaefer RM. (2010) Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res.* 339: 237–246.

Schaible H, Straub RH. (2014) Function of the sympathetic supply in acute and chronic experimental joint inflammation. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*: 182, 55–64.

Schmalfeldt M, Bandtlow CE, Dours-Zimmermann MT, Winterhalter KH, Zimmermann DR (2000) Brain derived versican V2 is potent inhibitor of axonal growth. *J. Cell Sci.* 113: 807.

Schneider VA, Granato M (2006) The myotomal diwanka (Ih3) glycosyl- transferase and type XVIII collagen are critical for motor growth cone migration. *Neuron* 50: 683–695.

- Schwalm H, Dubrausky V. (1966) The structure of the musculature of the human uterus – muscles and connective tissue. *Am. J. Obstet Gynecol.* 94: 391.
- Serhan CN. (2010) Novel Lipid Mediators and Resolution Mechanisms in Acute Inflammation New Solution for Resolution of Acute Inflammation. *The American Journal of Pathology* 177: 1576–1591.
- Serova LI, Maharjan S, Sabban EL. (2005) Estrogen modifies stress response of catecholamine biosynthetic enzyme genes and cardiovascular system in ovariectomized female rats. *Neuroscience* 132: 249-259.
- Shen Y, Tenney AP, Busch SA, Horn KP, Cuascut FX, Liu K, He Z, Silver J, Flanagan JG (2009) PTPsigma is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration. *Science* 326:592-596.
- Shen Y (2014) Traffic lights for axon growth: Proteoglycans and their neuronal receptors. *Neural Regen Res* 9:356–361.
- Shi L, Wudy SA, Buyken AE, Maser-Gluth C, Hartmann MF, Remer T. (2011) Prepubertal glucocorticoid status and pubertal timing. *J Clin Endocrinol Metab.* 96: E891–E898.
- Shynlova O, Mitchell JA, Tsampalieros A, Langille AL, Lye SJ (2004) Progesterone and gravidity differentially regulate expression of extracellular matrix components in the pregnant rat myometrium. *Biol Reprod* 70:986.
- Silverstone AE, Frazier DE Jr, Fiore NC, Soultz JA, Gasiewicz TA. (1994) Dexamethasone, β -Estradiol, and 2,3-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin elicit thymic atrophy through different cellular targets. *Toxicol and Applied Pharmacol* 126: 248-259
- Simmons DL, Botting RM, Hla T. (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological Reviews* 56: 387–437.
- Slater D, Dennes W, Sawdy R, Allport V, Bennett P. (1999) Expression of cyclo-oxygenase types-1 and -2 in human fetal membranes throughout pregnancy. *Journal of Molecular Endocrinology* 22: 125–130.
- Smith CJ, Zhang Y, Koboldt CM, Muhammad J, Zweifel BS, Shaffer A, Talley JJ, Masferrer JL, Seibert K, Isakson PC. (1998) Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc Natl Acad Sci* 95:13313-13318.
- Smith JT, Waddell BJ. (2000) Increased fetal glucocorticoid exposure delays puberty onset in postnatal life. *Endocrinology* 141: 2422–2428.
- Snow DM, Brown EM, Letourneau PC. (1996) Growth cone behavior in the presence of soluble chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG), compared to behavior on CSPG bound to laminin or fibronectin. *Int J Dev Neurosci.* 14: 331-349.
- Snow DM, Mullins N, Hynds DI (2001) Nervous system-derived chondroitin sulfate proteoglycans regulate growth cone morphology and inhibit neurite outgrowth: a light, epifluorescence and electron microscopy study. *Microscop. Res. Tech.* 54: 273.
- Snow DM, Smith JD, Gurwell JA. (2002) Binding characteristics of chondroitin sulfate proteoglycans and laminin-1, and correlative neurite outgrowth behaviors in a standard tissue culture choice assay. *J Neurobiol.* 51: 285-301.
- Snow DM, Smith JF, Cunningham At, McFarling J, Goshorn EC (2003) Neurite elongation on chondroitin sulfate proteoglycans is characterized by axonal fasciculation. *Exp. Neurol.* 182: 310.
- Soleman S, Filippov MA, Dityatev A, Fawcett JW. (2013) Targeting the neural extracellular matrix in neurological disorders. *Neuroscience* 253C, 194–213.
- Spieß K, Teodoro WR, Zorn TMT. (2007) Distribution of collagen types I, III, and V in pregnant mouse endometrium. *Connect Tissue Res.* 48: 99–108.

- Sporrong B, Alm P, Owman C, Sjöberg NO, Thorbert G (1978) Ultrastructural evidence for adrenergic nerve degeneration in the guinea pig uterus during pregnancy. *Cell Tissue Res* 195: 189-93.
- Stahn C, Buttgerit F. (2008). Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4: 525–533.
- Stamper HB, Woodruff JJ. (1976) Lymphocyte homing into lymph nodes: in vitro demonstration of the selective affinity of recirculating lymphocytes for high-endothelial venules. *J Exp Med.* 144: 828.
- Stewart EA, Floor AE, Jain P, Nowak RA. (1995) Increased expression of messenger RNA for collagen type I, collagen type II, and fibronectin in myometrium of pregnancy. *Obstet Gynecol.* 86: 417.
- Stewart PJ, Zaloudek CJ, Inman MM, Webster RA (1983) Effects of dexamethasone and indomethacin on estrogen-induced uterine growth. *Life Sci* 33: 2349.
- Straub RH. (2007) The complex role of estrogens in inflammation. *Endocrine Reviews* 28: 521–574.
- Sundahl N, Bridelance J, Libert C, De Bosscher K, Beck IM. (2015) Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds. *Pharmacology and Therapeutics* 152: 28–41.
- Taguchi M, Kubota T, Aso T. (1999) Immunohistochemical localization of tenascin and ki-67 nuclear antigen in human endometrium throughout the normal menstrual cycle. *J Med Dent Sci.* 46: 7-12.
- Takagawa S, Nakamura F, Kumagai K, Nagashima Y, Goshima Y, Saito T. (2013). Decreased Semaphorin3A expression correlates with disease activity and histological features of rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders* 14 : 40.
- Tang P, Zhang Y, Chen C, Ji X, Ju F, Liu X, ... Zhang L. (2015) In Vivo Two-Photon Imaging of Axonal Dieback, Blood Flow, and Calcium Influx With Methylprednisolone Therapy After Spinal Cord Injury. *Scientific Reports*, 5, 9691-9700.
- Tansey MG, Goldberg MS. (2010) Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *National Institutes of Health* 37: 510–518.
- Theodore S, Cao S, McLean PJ, Standaert DG. (2008) Targeted overexpression of human alpha-synuclein triggers microglial activation and an adaptive immune response in a mouse model of Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 67: 1149-1158.
- Thorbert G (1979) Regional changes in structure and function of adrenergic nerves in the guinea pig uterus during pregnancy. *Acta Obstet Gynaecol Scand (suppl.79):* 5-32.
- Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS (2006a) Nerve fibres in peritoneal endometriosis. *Human Reproduction* 21: 3001.
- Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS (2006b) High density of small nerve fibres in the functional layer of the endometrium in women with endometriosis. *Hum Reprod* 21:782–787.
- Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS (2007) Different types of small nerve fibers in eutopic endometrium and myometrium in women with endometriosis. *Fertil Steril* 88:795–803.
- Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS (2008) Effects of hormonal treatment on nerve fibers in endometrium and myometrium in women with endometriosis. *Fertil Steril* 90:1589–1598.
- Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS (2009) Effect of progestogens and combined oral contraceptives on nerve fibers in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 92:1234–1239.
- Torres-Uchoa E, Aguilera G, Herman JP, Fiedler JL, Deak T, Cordeiro de Sousa MB. (2014) Novel aspects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation and glucocorticoid actions. *J Neuroendocrinol* 26: 557-572
- Tran LV, Tokushige N, Berbic M, Markham R, Fraser IS. (2009) Macrophages and nerve fibres in peritoneal endometriosis. *Hum Reprod.* 24: 835-841.

- Taurig HH, Papka RE (1993) Autonomic efferent and visceral sensory innervation of the female reproductive system: special reference to the functional roles of nerves in reproductive organs. In: *Nervous Control of the Urogenital System*. (ed. Maggi CA.), pp. 103-141, Harwood Academic Publishers, Switzerland.
- Tuttle R, Matthew WD. (1991) An in vitro assay for neurite growth using cryostat sections of nervous tissue as substratum. *J Neurosci Methods* 39: 193.
- Vadasz Z, Rainis T, Nakhleh A, Haj T, Bejar J, Halasz K, Toubi E. (2015) The involvement of immune semaphorins in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases (IBDs). *PLoS ONE*, 10: 1–12.
- van Mourik MSM, Macklon NS, Heijnen CJ. (2009) Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *Journal of Leukocyte Biology*, 85: 4–19.
- Végh MJ, Heldring CM, Kamphuis W, Hijazi S, Timmerman AJ, Li KW, van Nierop P, Mansvelder HD, Hol EM, Smit AB, van Kesteren RE. (2014) Reducing hippocampal extracellular matrix reverses early memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2: 76
- Vera PL, Haase EB, Schramm LP (1997) Origins of the sympathetic innervation of the cervical end of the uterus in the rat. *Brain Res* 747:140-143.
- Vo T, Carulli D, Ehlert EM, Kwok JC, Dick G, Mecollari V, Moloney EB, Neufeld G, De WF, Fawcett JW, Verhaagen J. (2013) The chemorepulsive axon guidance protein semaphorin 3A is a constituent of perineuronal nets in the adult rodent brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 56: 186–200.
- Wang D, Fawcett J (2012) The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell Tissue Res* 349:147–160.
- Wang H, Walker SW, Mason JI, Morley SD, Williams BC. (2000) Role of arachidonic acid metabolism in ACTH-stimulated cortisol secretion by bovine adrenocortical cells. *Endocr Res.* 26: 705-709.
- Wang H, Ma WG, Tejada L, Zhang H, Morrow JD, Das SK, Dey SK. (2004) Rescue of Female Infertility from the Loss of Cyclooxygenase-2 by Compensatory Up-regulation of Cyclooxygenase-1 Is a Function of Genetic Makeup. *Journal of Biological Chemistry* 279: 10649–10658.
- Wang Q, Tang XN, Yenari MA (2007) The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 184: 53-68
- Wang X, Nelin LD, Kuhlman JR, Meng X, Welty SE, Liu Y. (2008) The Role of MAP Kinase Phosphatase-1 in the Protective Mechanism of Dexamethasone against Endotoxemia. *Life Sci.* 83: 671–680.
- Watanabe H, Nakata K, Kimata K, Nakanishi I, Yamada Y (1997) Dwarfism and age-associated spinal degeneration of heterozygote *cmd* mice defective aggrecan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6943.
- Weidler C, Holzer C, Harbuz M, Hofbauer R, Angele P, Schölmerich J, Straub RH. (2005). Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium. *Annals of the Rheumatic Diseases* 64: 13–20.
- Whirledge S, Cidlowski JA. (2010) Glucocorticoids, Stress, and Fertility. *Minerva Endocrinol.* 35: 109–125.
- Whirledge S, Cidlowski JA. (2013a). A role for glucocorticoids in stress-impaired reproduction: Beyond the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*, 154(12), 4450–4468.
- Whirledge S, Cidlowski JA. (2013b). Estradiol antagonism of glucocorticoid-induced GILZ expression in human uterine epithelial cells and murine uterus. *Endocrinology*, 154(1), 499–510.
- Whirledge S, Xu X, Cidlowski JA. (2013). Global gene expression analysis in human uterine epithelial cells defines new targets of glucocorticoid and estradiol antagonism. *Biol Reprod*, 89(3), 66.

- Wolman MA, Sittaramane VK, Essner JJ, Yost HJ, Chandrasekhar A, Halloran MC. (2008) Transient axonal glycoprotein-1 (TAG-1) and laminin- α 1 regulate dynamic growth cone behaviors and initial axon direction in vivo. *Neural Dev.* 3:6
- Wood GA, Fata JE, Watson KLM, Khokha R. (2007) Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. *Reproduction* 133: 1035–1044.
- Wu Z, Nagata K, Iijima T. (2000) Immunohistochemical study of NGF and its receptors in the synovial membrane of the ankle joint of adjuvant-induced arthritic rats. *Histochem Cell Biol.* 114: 453-459.
- Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann W E, Barnes CA, Worley PF. (1993) Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11: 371-386.
- Yoshida Y, Ogata A, Kang S, Ebina K, Shi K, Nojima S, ... Kumanogoh A. (2015) Semaphorin 4D contributes to rheumatoid arthritis by inducing inflammatory cytokine production: Pathogenic and therapeutic implications. *Arthritis and Rheumatology* 67: 1481–1490.
- Yu Z, Crichton I, Tang SY, Hui Y, Ricciotti E, Levin MD, ... FitzGerald GA. (2012) Disruption of the 5-lipoxygenase pathway attenuates atherogenesis consequent to COX-2 deletion in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 6727–32.
- Zenclussen AC, Hämmerling GJ. (2015) Cellular regulation of the uterine microenvironment that enables embryo implantation. *Frontiers in Immunology*, 6: 1–12.
- Zenclussen AC. (2005) CD4(+)CD25+ T regulatory cells in murine pregnancy. *J Reprod Immunol.* 65: 101-110.
- Zhang G, Dmitrieva N, Liu Y, McGinty KA, Berkley KJ. (2008) Endometriosis as a neurovascular condition: estrous variations in innervation, vascularization, and growth factor content of ectopic endometrial cysts in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 294: R162-171.
- Zoorob RJ, Cender D. (1998) A Different Look at Corticosteroids - American Family Physician. *American Family Physician* 58: 443–450.
- Zoubina EV, Fan Q, Smith PG (1998) Variation in uterine innervation during the estrous cycle. *The Journal of Comparative Neurology* 397: 561-571.
- Zoubina EV, Smith PG (2000) Axonal degeneration and regeneration in the rat uterus during estrous cycle. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinic* 84, 176-185.
- Zoubina EV, Smith PG (2001) Sympathetic hyperinnervation of the uterus in the estrogen receptor alpha knock-out mouse. *Neuroscience* 103: 237-244.
- Zoubina EV, Mize AL, Alper RH, Smith PG (2001) Acute and chronic oestrogen supplementation decreases uterine sympathetic innervation in ovariectomised adult virgin rats. *Histol Histopathol* 16: 989-996.
- Zoubina EV, Smith PG (2002) Distributions of estrogen receptors alpha and beta in sympathetic neurons of female rats: enriched expression by uterine innervation. *J Neurobiol* 52: 14-23.

ANEXO

Publicaciones

Effects of dexamethasone on estrogen- and pregnancy-induced plasticity in rat uterine sympathetic nerves

P. Bianchimano · A. I. Frías · A. Richeri · M. M. Brauer

Received: 27 March 2007 / Accepted: 22 May 2007 / Published online: 28 September 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract Estrogen and glucocorticoids are known to evoke opposing effects on the uterus. We analyzed the effects of dexamethasone (DEX) on uterine sympathetic denervation elicited by short- and long-term exposure to estrogen of intact prepubertal rats. We also studied the effects of DEX on the physiological degeneration of uterine sympathetic nerves at term pregnancy. Changes in innervation were assessed quantitatively by using computer-assisted methods on uterine cryostat tissue sections stained for tyrosine hydroxylase. At 24 h following treatment of prepubertal rats (25 days of age) with 1 µg or 2.5 µg estrogen, marked increases in uterine size and reductions in the percentage nerve area were observed. Co-administration of DEX (4 mg/kg) attenuated both these short-term estrogen-induced effects. Treatment of 19-day-old rats with a single dose of 25 µg estrogen provoked, at 26 days of age, a 54% reduction in the total nerve area. This reduction was abolished by the co-administration of nine doses of DEX (0.5 mg/kg) at 18–

26 days of age. Treatment of rats with the same regime of DEX alone increased the total nerve area by 46% of the control values. Studies of control pregnant rats revealed the unexpected presence of intrauterine nerve fibers at term. Treatment of pregnant rats with six doses of DEX (4 mg/kg) at 16–21 days of age had no effects on the density of uterine sympathetic nerves. These results suggest that DEX has growth-promoting effects on immature uterine sympathetic nerves and may antagonize the degenerative effects elicited by long-term exposure to estrogen.

Keywords Adrenergic · Glucocorticoids · Stress · Inflammation · Eosinophils · Rat (Wistar-derived, female, albino)

Introduction

The uterus is supplied by sympathetic nerves, which innervate blood vessels and myometrial smooth muscle. Noradrenaline (norepinephrine) released during sympathetic nerve stimulation causes vasoconstriction and elicits the contraction or relaxation of the myometrium depending on the relative concentration of noradrenaline receptors in the uterine smooth muscle (Papka et al. 1985; Owman and Stjernquist 1988). Studies performed in various mammalian species have shown that uterine sympathetic nerves are particularly susceptible to the endocrine environment and display considerable plasticity in response to changes in the circulating levels of sex hormones. For example, the density of uterine sympathetic nerves is markedly and permanently reduced following puberty (Brauer et al. 1992)

This work was partially supported by PEDECIBA, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. The Third World Academy of Sciences (TWAS) supported the visit of A.I. Frías to the Laboratorio de Biología Celular (IIBCE, Montevideo, Uruguay).

P. Bianchimano · A. Richeri · M. M. Brauer (✉)
Laboratorio de Biología Celular, Instituto de Investigaciones
Biológicas Clemente Estable,
Avenida Italia 3318,
Montevideo 11600, Uruguay
e-mail: brauer@iibce.edu.uy

A. I. Frías
Departamento de Biología Animal y Humana,
Facultad de Biología, Universidad de La Habana,
Havana, Cuba

and shows phases of growth and degeneration during the natural estrous cycle (Zoubina et al. 1998; Zoubina and Smith 2000). Several lines of evidence indicate that estrogen is the key hormone controlling plasticity in uterine sympathetic nerves in the non-pregnant female (Brauer et al. 1995, 2002; Zoubina et al. 2001).

In addition to estrogen-induced cyclic changes, uterine sympathetic nerves show dramatic remodeling during pregnancy, when transient progressive degeneration of intra-uterine sympathetic fibers is observed (Owman and Stjernquist 1988; Haase et al. 1997; Klukovits et al. 2002; Chávez-Genaro et al. 2006). Current evidence indicates that estrogen- and pregnancy-induced plasticity in uterine sympathetic nerves is regulated through changes in the neurotogenic properties of the target uterine tissue (Brauer et al. 1998, 2000, 2002; Krizsan-Agbas and Smith 2002) and may also involve alterations in the receptivity of uterine-related sympathetic neurons to target-derived signals (Richeri et al. 2005). Although the nature of these target-derived signals is still fragmentary, the contribution of a range of signals, including neurotrophins (Björling et al. 2002; Chalar et al. 2003; Krizsan-Agbas et al. 2003), proneurotrophins (Lobos et al. 2004), and chemorepulsive signals of the semaphorin family (Marzioni et al. 2004; Richeri et al. 2007) has been suggested.

Stress and glucocorticoids (GCs) are known to have a negative impact on reproduction (Hicks et al. 1994; Nevagi and Kaliwal 2001; Viau 2002). In addition to the well-established suppressive effects of stress and GCs on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, evidence exists that GCs can directly affect the female reproductive tract. GCs are well known to antagonize many actions of estrogen on the uterus, including its growth and differentiation (Stewart et al. 1983; Rabin et al. 1990; Sahlin 1995; Gunin et al. 2001). However, whether GCs antagonize the physiological neurodegeneration elicited by estrogen and pregnancy in uterine sympathetic nerves is unknown. In order to characterize the cross-talk between estrogen and GCs on the sympathetic innervation of the uterus, we have assessed the effects of dexamethasone (DEX) on the denervation provoked by short- and long-term exposure to estrogen of intact prepubertal rats. In addition, the effects of DEX on the physiological degeneration of uterine sympathetic nerves during pregnancy have been analyzed. Changes in innervation have been assessed quantitatively by using immunohistochemical methods associated with well-established computer-assisted methods for nerve density measurements. Some of these results have been reported in abstract form (Bianchimano et al. 2006). Morphological rather than biochemical methods have been selected because they allow the assessment of selective changes in myometrial innervation, which is the most vulnerable to estrogen action (Brauer et al. 1999).

Materials and methods

Animals and treatments

Estrogen and DEX treatment of prepubertal rats

Intact prepubertal female Wistar-derived albino rats ($n=77$) from the breeding colony held at the Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE, Montevideo, Uruguay) were used in this study. Intact prepubertal rats respond to estrogen like mature ovariectomized females and are a widely accepted model to study estrogen action in the uterus (Brauer et al. 1995; Rhen et al. 2003). Animals were sexed at birth, weaned at 3 weeks, and maintained under constant conditions of temperature and illumination, with water and food ad libitum. All procedures were conducted in accordance with the Statement of Compliance (Assurance) with Standards for Human Care and Use of Laboratory Animals signed by the IIBCE in agreement with the National Institutes of Health, USA (Statement of Compliance A5495-01). Estrogen treatment was performed with 17β -estradiol cypionate (Laboratorios König, Argentina) diluted to appropriate doses with peanut oil (Sigma, USA) to a final volume of 0.1 ml per dose. DEX treatment was carried out with disodic DEX phosphate (Dispert-Dex, Laboratorios Dispert, Uruguay) diluted to appropriate doses with physiological saline. For short-term treatments, prepubertal rats were injected subcutaneously on day 25th after birth with 1 μg or 2.5 μg 17β -estradiol cypionate, 4 mg/kg DEX, or combined 17β -estradiol cypionate (1 or 2.5 μg) plus 4 mg/kg DEX. Animals were killed 24 h after treatment. For long-term treatments, prepubertal rats were injected daily with nine doses of 0.5 mg/kg DEX (days 18–26), 25 μg 17β -estradiol cypionate on day 19, or a combination of both treatments. Control animals were treated with physiological saline and/or peanut oil. Animals were killed at 26 days of age, and both DEX-treated groups were sacrificed 5 h after the last DEX injection. To assess the effectiveness of DEX treatments on the organism (Gunin et al. 2001), the adrenal glands and thymus were dissected, cleaned of fat and surrounding connective tissue, and weighed on a precision balance.

DEX treatment of pregnant rats

Eight adult virgin females (3–4 months of age) were mated at proestrus, with day 1 of pregnancy being determined by the presence of spermatozoa in the vaginal smear. Pregnant rats were treated from day 16 of pregnancy with six subcutaneous consecutive injections of DEX at doses of 4 mg/kg or 8 mg/kg. Pregnant rats treated with physiological saline were used as controls. Rats were killed at 22 days of pregnancy.

Immunohistochemistry

Prepubertal animals were perfused via the left ventricle with 25 ml physiological saline followed by 25 ml buffered 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma). The uterine horns were removed, cleaned of fat and connective tissue, and fixed by immersion in 4% PFA for an additional 1.5 h. Pregnant females were perfused only with 50 ml physiological saline, and after removal of the fetuses from the horn by gentle pressure, uteri were fixed by immersion in buffered 4% PFA for 2.5 h. To assess the effects of DEX on pregnancy, the number of corpora lutea and fetuses were recorded. In addition, the crown-rump length and weight of fetuses were measured.

After fixation, uteri from all animal groups were washed in phosphate-buffered saline (PBS), stored in 12% sucrose in PBS overnight at 4°C, and embedded in tissue freezing medium (Shandon, USA). From prepubertal animals, cryostat tissue sections (12 µm) were obtained from the upper third of the uterine horn (cephalic). From pregnant animals, sections were obtained from two different cephalic peri-fetal uterine regions per animal. For the demonstration of uterine sympathetic nerves, sections were thaw-mounted onto gelatin-coated glass slides and incubated overnight at room temperature in a humid chamber with rabbit anti-tyrosine hydroxylase (anti-TH, final dilution 1:400; Affiniti Bioreagents, USA). At the end of the incubation period, sections were washed in PBS and incubated for 1.5 h at room temperature with goat anti-rabbit IgG conjugated with Alexa-Fluor 488 (final dilution 1:400; Molecular Probes, USA), washed in PBS, and mounted in antifade mountant (Citifluor, UK). The specificity of the immunostaining was checked by omission of the incubation in primary antibody.

Nerve density measurements

In prepubertal animals, the density of TH-immunoreactive (TH-I) nerves was assessed in the longitudinal myometrial layer (LML) as reported in our previous studies with some modifications (Chávez-Genaro et al. 2002; Chalar et al. 2003). Nerve counting was carried out on two transverse sections per horn, separated by 250 µm. Sections were examined under a Nikon E800 microscope (Nikon, Japan) equipped with epifluorescence and fitted with a B-2E filter (EX 450–490; BA 520–560). A 20× objective lens was used to capture five to seven different LML areas by means of the CoolSNAP-Pro monochrome digital camera associated with ImagePro Express software (Media Cybernetics, USA). On each digital image, the LML was manually delineated with the aid of a mouse, and the area occupied by sympathetic nerves (bright area) was automatically measured by using the ImagePro Plus software (Media Cybernetics). Because this method allowed the detection of

changes in both width and length of nerve fiber profiles, it represented an improvement with respect to the previously used intercept density measurement method. In order to obtain an estimation of the percentage area occupied by nerves, the nerve area was multiplied by 100 and divided by the muscle area in each image. To avoid measurement inaccuracies attributable to the non-specific fluorescence displayed by eosinophils (present following long-term estrogen treatment), the eosinophil auto-fluorescence in each image was captured by using a Nikon V-2A filter (EX 380–420; BA 450); this non-specific background was then subtracted before measurements were made of the specific bright area occupied by TH-I nerves. Because both estrogen and DEX treatment provoked changes in the size of the uterus, corrections for the size of the LML were carried out to obtain the total nerve area. With this aim, the averaged percentage nerve area was multiplied by the total area of the LML and divided by 100. Measurements of the LML area were carried out on digital images of adjacent tissue sections stained with hematoxylin and eosin. These preparations were also used to measure the myometrial, endometrial, and total cross-sectional area of the uterine horn.

In pregnant animals, the density of TH-I nerves was assessed on two transverse sections per peri-fetal region, separated at least by 250 µm. On each section (via a 20× objective lens), all non-overlapping fields presenting nerve fiber profiles were captured digitally. No attempts were made to distinguish between different uterine structures (i.e., myometrium, endometrium, vascular plexus). As before, the area occupied by nerves was automatically measured on each image, and the total nerve area per section was obtained by adding these individual values. The density of TH-I nerves was expressed as the total nerve area per cross section.

Quantitation of eosinophils

To assess the effectiveness of estrogen and DEX treatments further, we evaluated quantitatively the extent of eosinophil recruitment to the uterus. With this aim, we initially stained cryostat tissue sections with hematoxylin and Sirius Red (Direct Red 80, Sigma; see below). Sirius Red is a widely accepted staining for eosinophils (Rhen et al. 2003) because it binds exclusively to polypeptides rich in basic amino acids (Nielsen et al. 1998) such as those found in some eosinophil cytoplasmic granules (i.e., major basic protein). Following the observation that the auto-fluorescence displayed by eosinophils perfectly matched Sirius Red staining, we used fluorescent images to perform the automatic counting of eosinophils with the Image Pro Plus software. The number of cells in the endometrium and myometrium were counted on five manually delineated fields per uterine region and in two sections per uterine horn. The number of eosinophils was expressed as the number of cells per square millimeter.

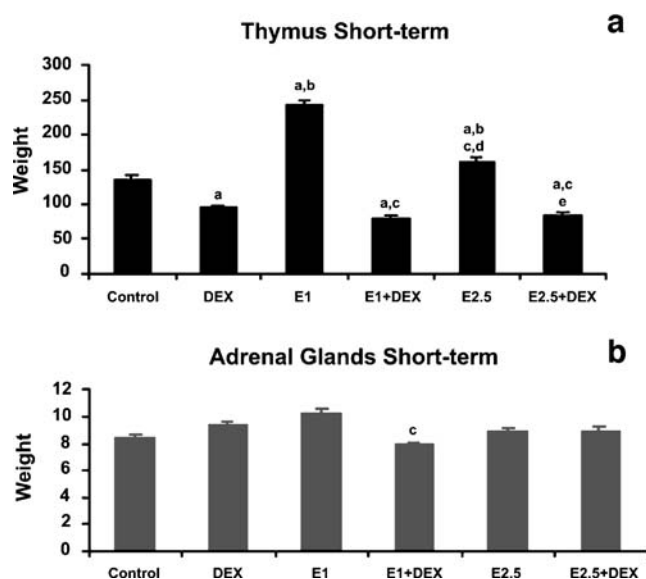


Fig. 1 Quantitative assessment of the short-term effects of dexamethasone (DEX, 4 mg/kg), two different doses of estrogen (E1 1 μ g, E2.5 2.5 μ g), and combined treatment (E1+DEX, E2.5+DEX) on the wet weight (milligram per 50 g body weight) of the thymus (a) and adrenal glands (b) of intact prepubertal rats. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM. Data were compared by one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer multiple comparison test. Values of $P \leq 0.05$ were considered statistically significant (a significant difference from control, b significant difference from DEX, c significant difference from E1, d significant difference from E1+DEX, e significant difference from E2.5)

Statistical analyses

Quantitative results are expressed as the mean $\pm$ SEM. Data pairs were compared by using Student's *t*-test. For multiple comparisons, data were analyzed by using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey-Kramer test. Values of $P \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Prepubertal rats

Effects of estrogen and DEX on thymus and adrenal gland

Short-term effects Treatment with 1 μ g and 2.5 μ g estrogen increased thymus weight by 80% and 20%, respectively (Fig. 1a). Administration of 4 mg/kg DEX alone reduced thymus weight by 29% (Fig. 1a). Co-administration of DEX with both estrogen doses prevented estrogen-induced thymus growth and reduced thymus weight below control values (Fig. 1a). Estrogen and DEX alone had no effect on the wet weight of the adrenal glands (Fig. 1b). Only animals co-treated with 1 μ g estrogen plus DEX showed a

22% reduction in the adrenal gland weight compared with the group treated with 1 μ g estrogen (Fig. 1b).

Long-term effects Seven days after the administration of a single dose of 25 μ g estrogen, no significant changes in thymus wet weight were observed (Fig. 2a); however, a 12% decrease in adrenal gland weight was detected (Fig. 2b). Administration of nine doses of 0.5 mg/kg DEX alone or in combination with estrogen decreased the wet weight of thymus to 11% of control values (Fig. 2a) and the adrenal glands to 58% and 52% of control values, respectively (Fig. 2b).

Effects of estrogen and DEX on uterus

Short-term effects Morphometric studies (Fig. 3) showed that, 24 h following the administration of a single dose of 4 mg/kg DEX, the cross-sectional area of the endometrium had increased by more than two-fold that of the control values, but no significant changes in the cross-sectional area of the myometrium were observed. Treatment with 1 μ g estrogen markedly increased the total (4.6-fold), endometrial (5.8-fold), and myometrial (3.6-fold) cross-sectional areas. Co-administration of DEX markedly reduced (61%) the estrogen-induced increase in the total

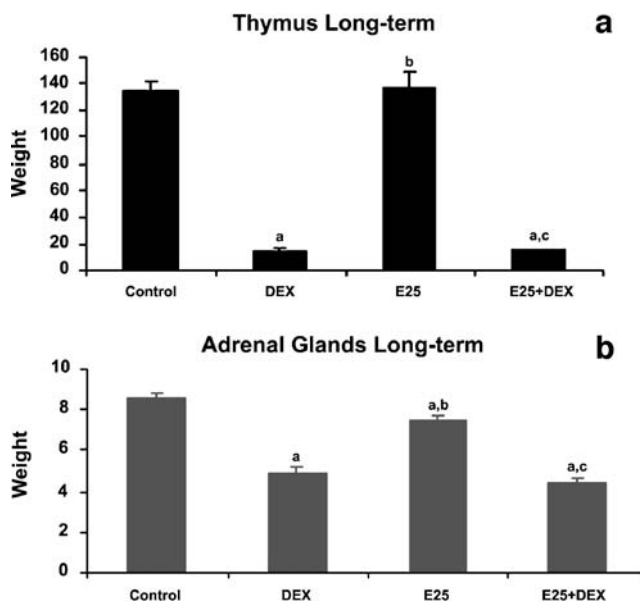


Fig. 2 Quantitative assessment of the long-term effects of DEX (0.5 mg/kg), estrogen (E25 25 μ g), and combined treatment (E25+DEX) on the wet weight (milligram per 50 g body weight) of the thymus (a) and adrenal glands (b) of intact prepubertal rats. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM. Data were compared by one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer multiple comparison test. Values of $P \leq 0.05$ were considered statistically significant (a significant difference from control, b significant difference from DEX, c significant difference from E25)

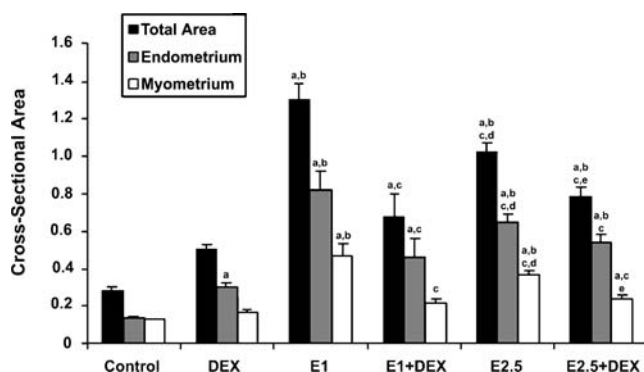


Fig. 3 Quantitative assessment of the short-term effects elicited by DEX (4 mg/kg), two different doses of estrogen (E1 1 µg, E2.5 2.5 µg), and combined treatment (E1+DEX, E2.5+DEX) on the total, endometrial, and myometrial cross-sectional areas (in mm²) of the cephalic region of the prepubertal rat uterine horn. Results are expressed as the mean±SEM. Data were compared by one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer multiple comparison test. Values of $P \leq 0.05$ were considered statistically significant (a significant difference from control, b significant difference from DEX, c significant difference from E1, d significant difference from E1+DEX, e significant difference from E2.5)

cross-sectional area of the uterine horn. This reduction was more prominent in the myometrium (74%) than in the endometrium (53%). Treatment with 2.5 µg estrogen also caused marked increases in the cross-sectional areas of the uterine horn (total: 3.6-fold; endometrium: 4.6-fold; myometrial compartment: 2.8-fold). However, these increases were significantly smaller than those elicited by the 1 µg estrogen dose. Co-administration of DEX reduced, by 54%, the estrogen-induced growth of the myometrial compartment but had no effect on the increase of the endometrium.

Long-term effects Measurement studies (Fig. 4) indicated that treatment of intact prepubertal rats with nine doses of 0.5 mg/kg DEX caused a 74% increase in the total cross-sectional area of the uterine horn. This growth was mainly attributable to the increase in size of the endometrium (2.1-fold). Seven days after the administration of a single dose of 25 µg estrogen, the total cross-sectional area of the uterine horn had increased by over six-fold that of the control values. Estrogen-induced uterine growth was more evident in the myometrial (7.7-fold) than in the endometrial (5.5-fold) compartment. Co-administration of DEX diminished, by 13%, the estrogen-induced increase in the cross-sectional area of the myometrial compartment but had no effect on the endometrium.

Effects of estrogen and DEX on uterine eosinophil infiltration

Eosinophils were absent from the uterine horn of prepubertal controls and from animals treated with both regimes

(long- and short-term treatments) of DEX administration. Similarly, no eosinophils were seen 24 h following the administration of either 1 µg or 2.5 µg estrogen (Fig. 5c). In contrast, by 7 days after the administration of a single dose of 25 µg estrogen, a massive eosinophil infiltration was seen in both the endometrium and myometrium (Fig. 5d). Co-administration of DEX reduced, by 91%, the number of eosinophils in both uterine compartments (Fig. 5e, f).

Effects of estrogen and DEX on uterine sympathetic nerves

In prepubertal controls (Fig. 6a), immunohistochemical studies carried out on the cephalic region of the uterine horn showed that sympathetic nerves were mainly distributed around blood vessels and associated with the LML. Only occasional fibers were seen in the endometrium or in the circular myometrial layer. The overall pattern of the distribution of uterine sympathetic nerves was unaffected by the different protocols of estrogen and DEX administration (Figs. 6b–f, 7a–d), although significant changes in the density of myometrial innervation were observed. None of the treatments provoked appreciable changes in the sympathetic perivascular innervation.

Short-term effects Measurement studies (Table 1) showed that administration of 4 mg/kg DEX caused no significant changes in the percentage area and total nerve area occupied by sympathetic nerves in the LML. Treatment with a single dose of 1 µg estrogen provoked a 52% decrease in the percentage nerve area. However, since the cross-sectional area of the LML increased nearly three-fold that of the control values, no effects on the total nerve area were observed. Co-administration of DEX reduced, by

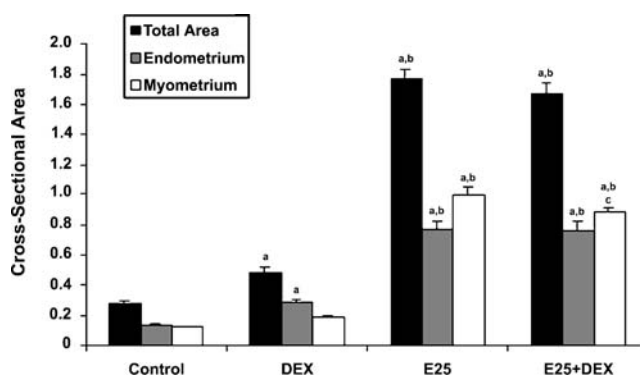
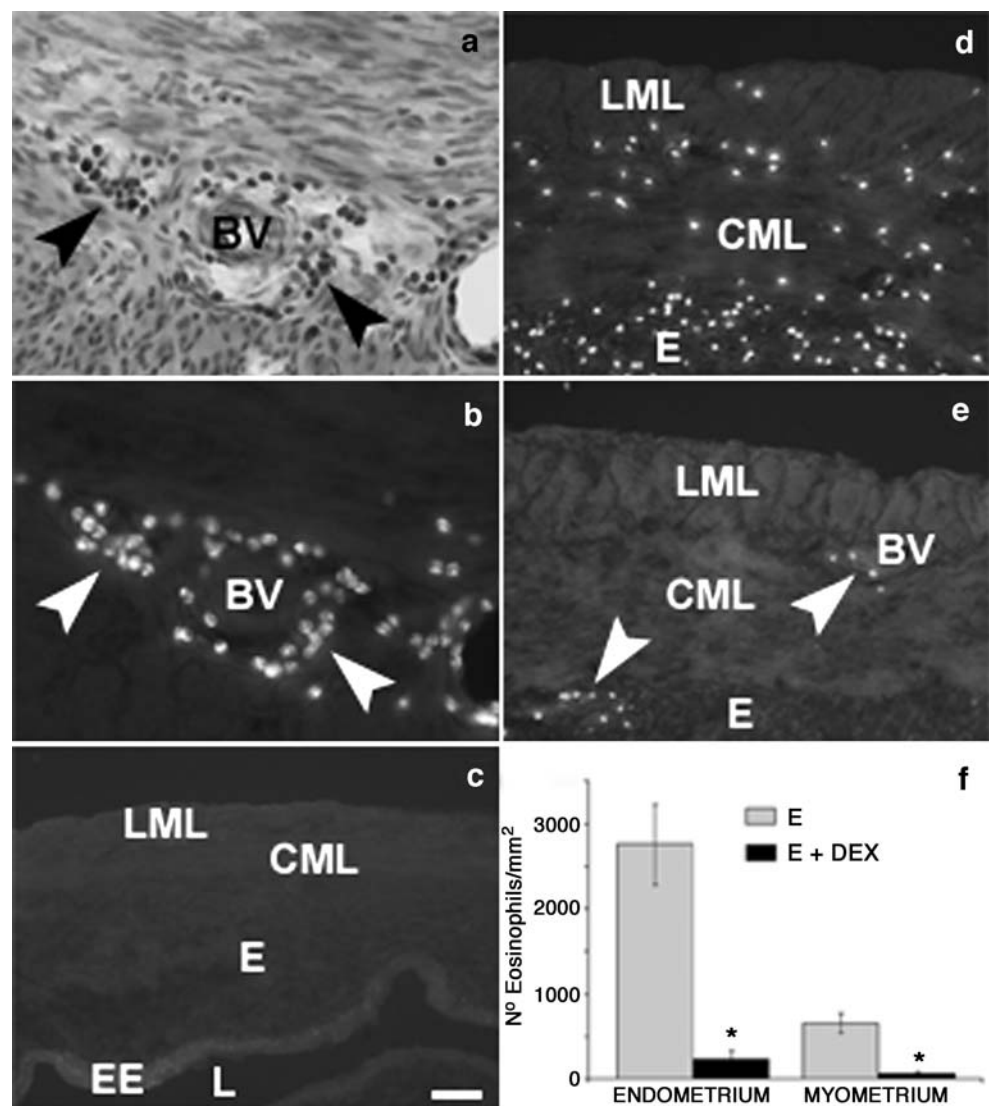


Fig. 4 Quantitative assessment of the long-term effects provoked by DEX (0.5 mg/kg), estrogen (E25 25 µg), and combined treatment (E25+DEX) on the total, endometrial, and myometrial cross-sectional area (in mm²) of the cephalic region of the prepubertal rat uterine horn. Results are expressed as the mean±SEM. Data were compared by one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer multiple comparison test. Values of $P \leq 0.05$ were considered statistically significant (a significant difference from control, b significant difference from DEX, c significant difference from E25)

Fig. 5 Cryostat tissue sections illustrating estrogen-induced eosinophil recruitment to the uterus in intact prepubertal rats (*BV* blood vessel, *CML* circular myometrial layer, *E* endometrium, *EE* endometrial epithelium, *L* lumen, *LML* longitudinal myometrial layer). **a** Eosinophils (arrows) stained with Sirius Red. **b** The same field by fluorescence microscopy. Note that eosinophil auto-fluorescence perfectly matches Sirius Red staining. **c** Absence of eosinophils in the uterine horn of a prepubertal rat, 24 h following treatment with 2.5 μ g estrogen. **d** Massive eosinophil infiltration in both myometrium and endometrium, following long-term exposure to estrogen. **e** Long-term effects of combined estrogen and DEX treatment. Bar (in **c**) 25 μ m (**a**, **b**), 50 μ m (**c**–**e**). **f** Quantitative assessment of long-term effects provoked by estrogen (*E* 25 μ g) and combined estrogen plus DEX (*E*+DEX) on the number of eosinophils in the endometrium and myometrium. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM. Data were compared by the Student's *t*-test. Values of $P\leq 0.05$ were considered statistically significant (*significant difference from control)



71%, the estrogen-induced increase in the LML cross-sectional area, attenuated the reductions in the percentage nerve area, but had no effects on the total nerve area.

Treatment with a single dose of 2.5 μ g estrogen decreased the percentage nerve area by 39% and increased the cross-sectional area of the LML 2.3-fold. As a consequence, a 46% increase in the total nerve area was observed. Co-administration of 4 mg/kg DEX reduced, by 60%, the estrogen-induced increase in the LML cross-sectional area and prevented the increase in total nerve area elicited by estrogen.

Long-term effects Treatment with nine doses of 0.5 mg/kg DEX caused a generalized increase in the density of sympathetic nerves, which was also evident in the mesometrial triangle and circular myometrial layer (Fig. 7a–b). Measurement studies (Table 2) showed a 46% increase in the total nerve area occupied by sympathetic nerves in the LML. Administration of a single dose of 25 μ g estrogen

reduced, by 54%, the total nerve area and caused a 94% reduction in the percentage nerve density. Co-administration of DEX completely prevented the reduction in total nerve area induced by estrogen, and animals co-treated with estrogen and DEX showed values of total nerve area identical to those of prepubertal controls treated with vehicle.

Pregnant rats

General and reproductive effects of DEX

Pregnant rats treated with six doses of 8 mg/kg DEX ($n=3$) died without delivering, between gestational days 21 and 22. Pregnant rats treated with 4 mg/kg DEX ($n=2$) showed reduced thymus weights [control: 50.3 ± 1.2 ($n=3$) vs. DEX: 29.4 ± 0.8 mg per 100 g body weight, *t*-test: $P<0.0001$], but displayed non-significant changes in the weight of the adrenal glands (control: 19.2 ± 0.8 vs. DEX: 18.5 ± 0.1 mg

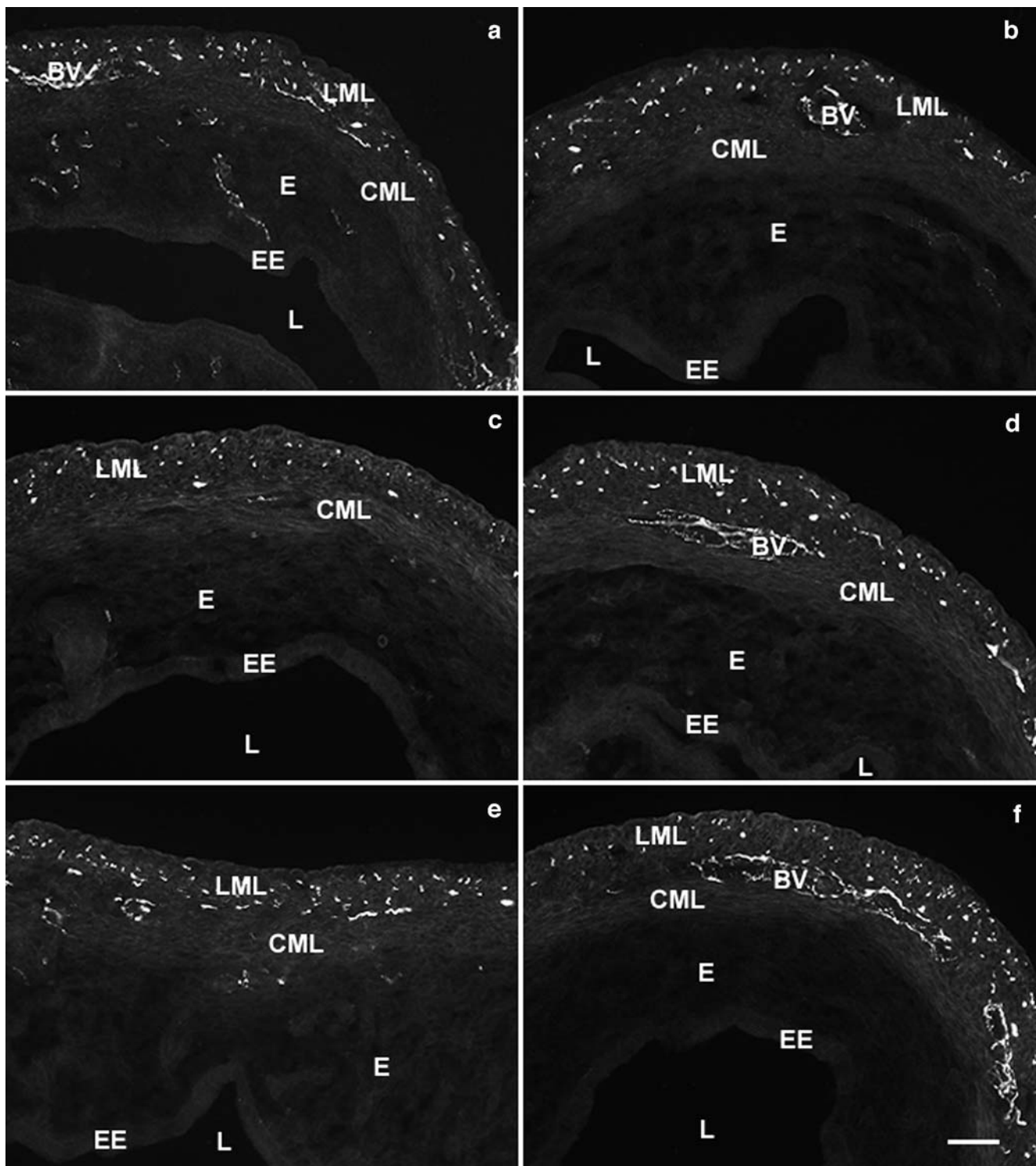


Fig. 6 Transverse cryostat tissue sections of the rat uterine horn showing tyrosine hydroxylase-immunoreactive (TH-I) sympathetic nerves (*BV* blood vessel, *CML* circular myometrial layer, *E* endometrium, *EE* endometrial epithelium, *LML* longitudinal myometrial layer,

L lumen). **a** In 26-day-old intact prepubertal controls. **b–f** Following short-term treatment with 4 mg/kg DEX (**b**), 1 μ g estrogen (**c**), 2.5 μ g estrogen (**e**), combination of both estrogen treatments with DEX (**d**, **f**). Bar 50 μ m

per 100 g body weight). In control and DEX-treated pregnant rats, the number of corpora lutea closely matched the total number of fetuses (control: 35/33; DEX: 25/24). However, in DEX-treated animals, seven out of 24 fetuses

were dead. Alive fetuses showed reduced crown-rump lengths (control: 37.7 ± 0.5 [$n=33$] vs. DEX 28.6 ± 0.6 mm [$n=17$]; t -test: $P < 0.0001$), and weights (control: 4.37 ± 0.1 vs. DEX: 2.05 ± 0.1 g; t -test: $P < 0.0001$).

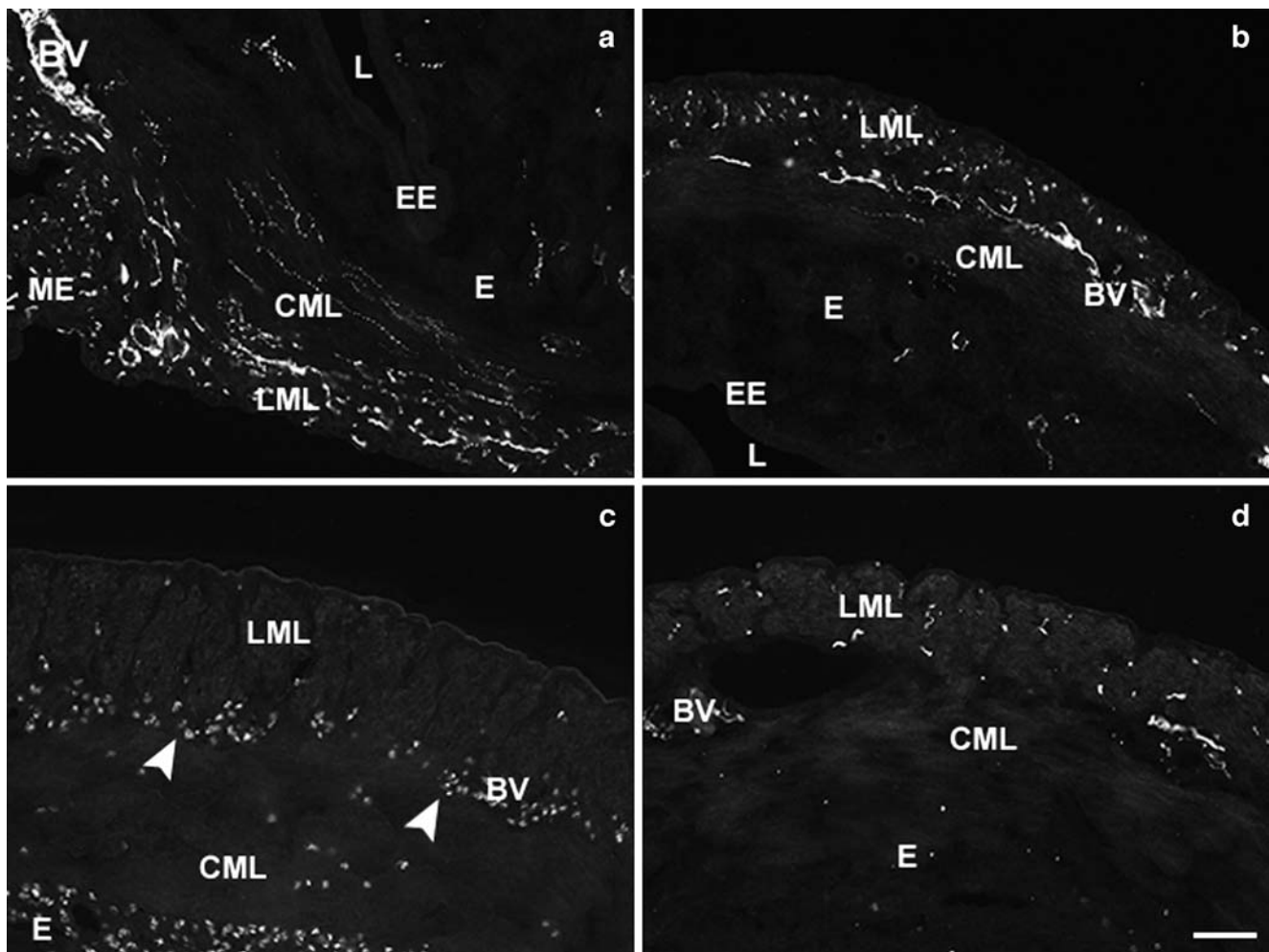


Fig. 7 Transverse cryostat tissue sections of the uterine horn showing TH-1 sympathetic nerves in 26-day-old intact prepubertal rats (*BV* blood vessel, *CML* circular myometrial layer, *E* endometrium, *EE* endometrial epithelium, *LML* longitudinal myometrial layer, *L* lumen,

ME mesometrial entrance, *arrows* eosinophils). **a, b** Following long-term treatment with nine daily consecutive doses of 0.5 mg/kg DEX. **c** After treatment with 25 μ g estrogen given at 19 days of age. **d** Following a combination of both treatments. Bar 50 μ m

Table 1 Quantitative assessment of the short-term effects of dexamethasone (*DEX* 4 mg/kg), two different doses of estrogen (*E1* 1 μ g, *E2.5* 2.5 μ g), and combined estrogen plus DEX (*E1+Dex*, *E2.5+DEX*) on the total cross-sectional area (mm^2) of the longitudinal myometrial layer (LML), the percentage area, and total area (mm^2) occupied by

sympathetic nerves in the LML of the cephalic region of the uterine horn of intact prepubertal rats. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM (*n*). Data were compared by one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer multiple comparison test. Values of $P \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Treatment	LML area	% Nerve area	Total nerve area
Control	0.04 $\pm$ 0.001 (14)	3.1 $\pm$ 0.2	0.0013 $\pm$ 0.0001
DEX	0.04 $\pm$ 0.003 (8)	3.2 $\pm$ 0.3	0.0014 $\pm$ 0.0001
E1	0.11 $\pm$ 0.012 (6) ^{a,b}	1.5 $\pm$ 0.3 ^{a,b}	0.0014 $\pm$ 0.0002
E1+DEX	0.06 $\pm$ 0.007 (5) ^c	2.2 $\pm$ 0.2	0.0013 $\pm$ 0.0001
E2.5	0.09 $\pm$ 0.005 (14) ^{a,b,d}	1.9 $\pm$ 0.2 ^{a,b}	0.0019 $\pm$ 0.0002 ^a
E2.5+DEX	0.06 $\pm$ 0.004 (12) ^{a,c,e}	2.2 $\pm$ 0.2	0.0013 $\pm$ 0.0001

^a Significant difference from control

^b Significant difference from DEX

^c Significant difference from E1

^d Significant difference from E1+DEX

^e Significant difference from E2.5

Table 2 Quantitative assessment of the long-term effects of DEX (0.5 mg/kg), estrogen (E25 25 µg), and combined estrogen plus DEX (E25+DEX) on the total cross-sectional area (mm²) of the LML, the percentage area and total area (mm²) occupied by sympathetic nerves in the LML of the cephalic region of the uterine horn of intact

Treatment	LML area	% Nerve area	Total nerve area
Control	0.04±0.001 (14)	3.1±0.2	0.0013±0.0001
DEX	0.05±0.002 (6)	3.7±0.3	0.0019±0.0002 ^a
E25	0.31±0.017 (6) ^{a,b}	0.18±0.02 ^{a,b}	0.0006±0.0001 ^{a,b}
E25+DEX	0.28±0.012 (6) ^{a,b}	0.45±0.04 ^{a,b}	0.0013±0.0001 ^{b,c}

^a Significant difference from control

^b Significant difference from DEX

^c Significant difference from E25

Effects of pregnancy and DEX on uterine sympathetic nerves

In both control and DEX-treated pregnant rats, a well-developed sympathetic innervation was seen in the mesometrium and mesometrial entrance (not shown). In both groups, many intrauterine perivascular nerve fibers were recognized (Fig. 8a,b), plus free-running nerve bundles (Fig. 8c) and isolated fibers (Fig. 8d). Many nerve fibers showed swollen varicosities (Fig. 8d). Quantitative studies indicated that the mean total nerve area per cross uterine section was doubled in DEX-treated pregnant rats; however, values did not reach statistical significance because of the large variability of data (control: 0.003±0.001 [*n*=3] vs. DEX: 0.007±0.002 mm² [*n*=2]).

prepubertal rats. Results are expressed as the mean±SEM (*n*). Data were compared by one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer multiple comparison test. Values of *P*≤0.05 were considered statistically significant.

Discussion

Effects of DEX on estrogen-induced uterine growth

All protocols of estrogen administration caused marked increases in the total cross-sectional area of the uterine horn. Unexpectedly, uterine growth elicited by the 1 µg estrogen dose was more prominent than the growth promoted by the 2.5 µg dose. This differential effect was also evident in the thymus and might be related to the 1 µg estrogen dose being within physiological values; this dose also produces estrogen serum levels in the range observed on the evening of proestrus in intact cycling rats (Rhen et al. 2003). None of the estrogen treatments employed in this study provoked ovulation.

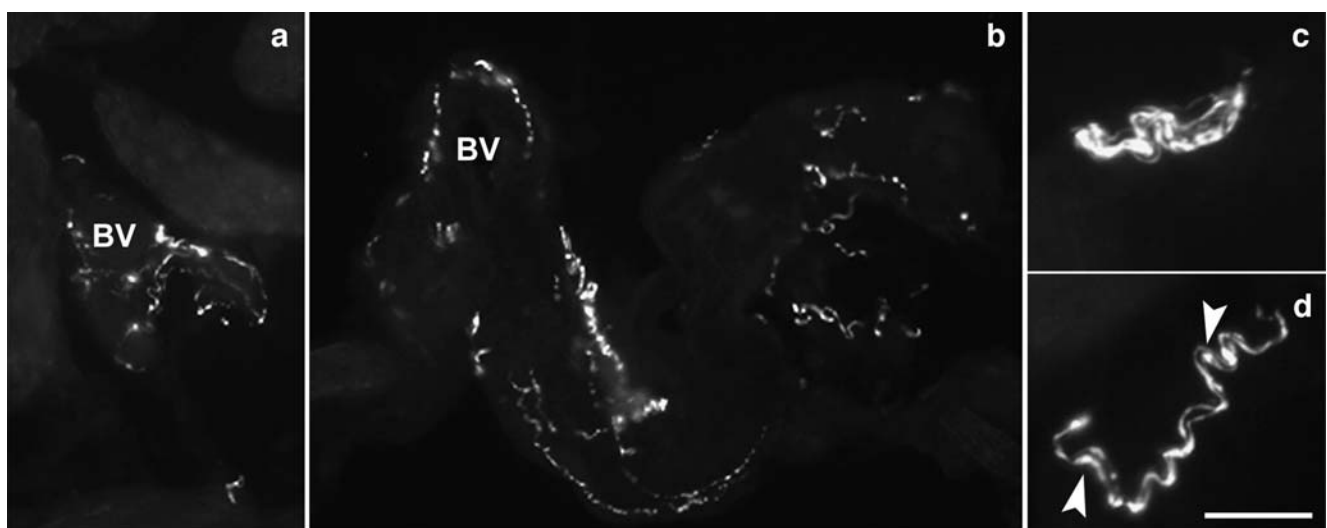


Fig. 8 Transverse cryostat tissue sections of the uterine horn showing TH-I intrauterine sympathetic nerves in control (a,c) and DEX-treated (b,d) term-pregnant rats (22 days post-coitum). a, b Nerve fibers

associated with blood vessels (BV). c, d Respectively, free-running nerve bundle and nerve fibers, showing swollen varicosities (arrows). Bar 54 µm (a, b), 20 µm (c, d)

As previously reported, DEX attenuated the growth-promoting effects elicited by estrogen in the uterus and thymus (Campbell 1978; Stewart et al. 1983; Rabin et al. 1990). This effect was particularly evident in animals treated with the 1 μ g estrogen dose, because when co-administrated with the 2.5 μ g dose, DEX failed to counteract the growth-promoting effects of estrogen on the endometrium and showed a diminished impact on the growth of the myometrium. A similar pattern of changes was seen following long-term exposure to estrogen and DEX. Gunin et al. (2000) have suggested that differences elicited by GCs on estrogen-induced changes in the diverse uterine compartments might result from dissimilar shifts in the number of estrogen receptors and from distinctive shifts in GC receptors (GRs) in the different uterine tissues.

Effects of DEX on estrogen-induced remodeling of uterine sympathetic nerves

Our results regarding the effects of prepubertal estrogen treatment on rat uterine sympathetic nerves were in general agreement with previous findings (Brauer et al. 1995; Zoubina et al. 2001). Acute estrogen administration caused a marked reduction in the apparent density of sympathetic nerves in the LML. However, this reduction was no longer evident after correction for changes in the size of this myometrial layer. Moreover, 24 h following treatment with 2.5 μ g estrogen, the values of total nerve density were significantly higher than those of prepubertal controls, suggesting that under certain conditions, estrogen might have an early growth-promoting effect on immature uterine sympathetic nerves. In contrast, following long-term exposure to estrogen, reductions in nerve density persisted after corrections for changes in the size of the LML, indicating an actual loss of sympathetic nerve fibers.

Acute treatment of prepubertal rats with a single 4 mg/kg dose of DEX caused no changes in the density of sympathetic nerves. However, following administration of nine doses of 0.5 mg/kg DEX, a 46% increase in the total nerve area was observed, suggesting an actual gain of nerve fibers. Similarly, an increased density of intraovarian sympathetic nerves was detected following long-term (15 days) administration of DEX to mature pigs (Jana et al. 2005). Co-administration of DEX prevented the loss of sympathetic nerves elicited by long-term exposure to estrogen. Of note, this change was not related to reductions in the cross-sectional area of the LML, because DEX showed a poor performance in counteracting the myometrial growth promoted by long-exposure to estrogen. Taken together, our results suggest that, in immature rats, DEX has a growth-promoting effect on uterine sympathetic nerves and also attenuates the degenerative effects elicited by estrogen. GC-

induced impairment of the physiological degeneration of uterine sympathetic nerves elicited by estrogen might therefore contribute to stress-associated disfunctions during the natural estrous cycle.

GCs are well documented as exerting many stimulatory influences on the sympatho-adrenal system. For example, in the adrenal medulla and paravertebral sympathetic ganglia, stress and GCs induce increases in the gene-expression of noradrenaline-biosynthetic enzymes (Nankova et al. 1996). Many of these GC actions are mediated via GRs, which interact with specific hormone response elements or with other transcription factors to regulate gene transcription. GRs have been described in many regions of the central nervous system, where they regulate various aspects of neuronal plasticity. In this context, DEX might enhance uterine sympathetic nerve growth and attenuate estrogen-induced nerve degeneration by acting through GRs in sympathetic neurons. Although there is evidence for the presence of GRs in the superior cervical ganglion of immature rats (Bohn et al. 1984), the presence of GRs in the sympathetic ganglia supplying the uterus has not been determined.

Considering the relevance of the target uterine tissue in the regulation of the plasticity of uterine-sympathetic nerves (Brauer et al. 1998, 2000, 2002; Krizsan-Agbas and Smith 2002), we suggest that DEX may also enhance sympathetic nerve growth and attenuate estrogen-induced nerve degeneration by affecting the neuritogenic properties of the uterus. For example, DEX has been shown to increase nerve growth factor (NGF) synthesis in the cerebral cortex and hippocampus, and by increasing NGF levels in these targets, GCs might play a role in the maturation of postnatal cholinergic neurons (Shi et al. 1998; Shi and Mocchetti 2000). The presence of GRs has been well established in the uterus (Ho et al. 1999; Gunin et al. 2003). Moreover, NGF and other members of the neurotrophin family are expressed in the rodent uterus, where their synthesis is regulated by sex hormones (Björling et al. 2002; Chalar et al. 2003; Krizsan-Agbas et al. 2003). Additionally, *in vivo* studies have indicated that DEX regulates uterine estrogen receptor levels (Rabin et al. 1990; Sahlin 1995; Rhen et al. 2003; Gunin et al. 2003). This might be relevant, because the inhibitory effects of estrogen on uterine sympathetic nerves are mediated through α -estrogen receptors (Zoubina and Smith 2001).

Effects of DEX on pregnancy-induced degeneration of uterine sympathetic nerves

Our studies on pregnant rats confirmed the occurrence of a marked reduction in the density of sympathetic nerves in the rat uterus by term (Moustafa 1988; Haase et al. 1997;

Klukovits et al. 2002; Chávez-Genaro et al. 2006). However, in our animals, pregnancy-induced denervation was not complete, and several intrauterine nerve fibers were recognized at term, particularly in association with blood vessels. Nevertheless, many nerve fibers showed signs of nerve degeneration, including swollen varicosities. A recent superfusion study (Zupkó et al. 2005) has shown that, in the rat, deterioration and loss of function in uterine sympathetic nerves during pregnancy occur earlier than structural changes and has indicated that, after delivery, nerve function recovers later than structure. Therefore, the fibers observed in our term-pregnant rats may be functionally impaired, thus allowing a normal progression of pregnancy and delivery. The functional significance of the physiological loss of sympathetic nerves during pregnancy is not fully understood. This selective neurodegeneration is thought to be essential to protect feto-placental circulation from ischemia, to maintain myometrial quiescence during the growth and accommodation of the fetus, and to prevent pre-term labor by reducing uterine contractility (Owman and Stjernquist 1988).

Treatment of pregnant rats with DEX did not provoke significant changes in the density of sympathetic nerves, suggesting that the reduced fetal growth and increased fetal death elicited by DEX are not related to the potentially harmful consequences of an impaired uterine sympathetic denervation (i.e., reduced blood flow). However, the possibility that DEX induces functional changes in sympathetic transmission cannot currently be ruled out. Factors controlling the differential effects elicited by DEX on estrogen- and pregnancy-induced denervation of uterine sympathetic nerves are not clear at present. However, some explanations can be suggested. Studies in rats (Puri and Garfield 1982) have shown that progesterone levels are high during pregnancy and decline from day 19 until parturition. In contrast, estradiol levels start to increase only after day 19, rise on day 21, and peak immediately before parturition. These results indicate that the progressive sympathetic nerve loss observed in the rat uterus during pregnancy mainly occurs under the influence of progesterone. This might be relevant, because DEX has no effect on estrogen-induced changes in the uterine levels of the progesterone receptor (Rabin et al. 1990). Moreover, the ability of GCs to suppress the estradiol-mediated uterine effects, including myometrial growth, is generally accepted to be less efficient during pregnancy. Finally, differential effects elicited by pregnancy and prepubertal estrogen treatment may also be related to the different maturational stage of the nerve fibers. Recent intraocular transplantation studies have revealed that the maturational stage of the nerve fibers is relevant in determining the susceptibility of uterine sympathetic nerves to the effects of estrogen and pregnancy (Chávez-Genaro et al. 2002, 2006).

Possible contribution of inflammation to estrogen-induced uterine sympathetic denervation

Many actions of estrogen on the uterus resemble an inflammatory response, which includes vasodilation, edema of endometrium and myometrium, and accumulation of fluid in the uterine lumen. DEX blocks these pro-inflammatory effects (Stewart et al. 1983). Inflammation is known to be associated with increases in the production of many mediators, such as cytokines, chemokines, reactive oxygen species, and arachidonic acid metabolites. Some of these mediators have been shown to be harmful for the nervous tissue in several pathological conditions, such as stroke, trauma, and some neurodegenerative disorders (Wang et al. 2007). Similarly, in the periphery, inflammation affects the balance between sympathetic and primary afferent sensory nerves in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis, by altering the local synthesis of semaphorins (Miller et al. 2004). Therefore, inflammation might, directly or indirectly, play a part in the selective sympathetic denervation induced by estrogen in the uterus.

Eosinophil infiltration to the uterus is considered an additional marker of uterine inflammation. In our studies, we have observed that, after 24 h, both employed estrogen doses are unable to provoke the recruitment of eosinophils into the uterus, although they provoke marked trophic changes and fluid accumulation in the uterine lumen. This is surprising because other authors have reported the presence

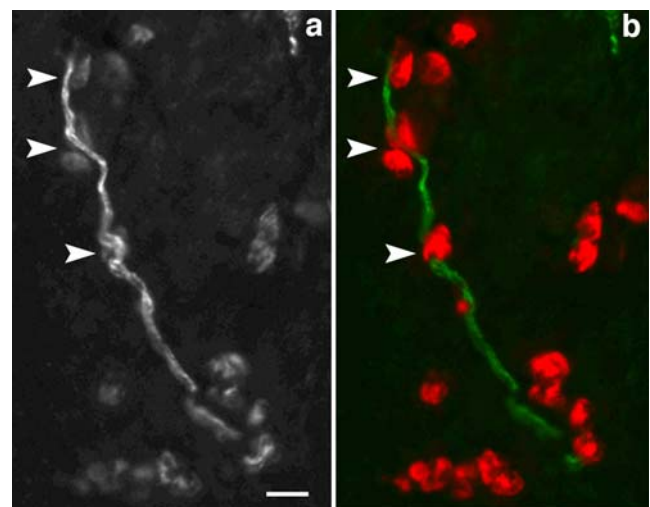


Fig. 9 Eosinophils around a sympathetic nerve fiber in the uterine horn of an intact prepubertal rat, 7 days following treatment with 25 μ g estrogen. **a** Nerve fiber immunostained for TH; fluorescence microscopy with the B-2E filter. Many eosinophils, recognized by their non-specific fluorescence, are seen closely to the nerve fiber (arrows). **b** Same microscopic field after superimposing the pseudo-colored image of the TH-I nerve fiber (green) and the pseudo-colored image of the eosinophils (red) obtained with the V-2A filter. Images were pseudo-colored and superimposed by using ImagePro Plus software. Bar 10 μ m

of eosinophils in the prepubertal rat uterus, a few hours following administration of 17β -estradiol (Rhen et al. 2003). The functional significance of estrogen-induced eosinophil recruitment to the uterus is not fully understood. Eosinophil infiltration is a common feature in many inflammatory pathological conditions, such as asthma, eosinophilic gastroenteritis, and inflammatory bowel disease. In these pathologies, eosinophils have been shown to localize in close apposition to cholinergic nerves, where they promote nerve remodeling through the release of mediators such as the eosinophil cationic protein and NGF (Lee et al. 2001; Kingham et al. 2003; Durcan et al. 2006). In our immunofluorescence preparations, we have observed many eosinophils apposed to myometrial and perivascular sympathetic nerve fibers following estrogen treatment (Fig. 9). These images closely resemble those seen in the airways of antigen-challenged guinea pigs (Costello et al. 1997). The functional significance of the localization of eosinophils to uterine sympathetic nerves in the estrogen-stimulated uterus remains uncertain, and further studies will be required to assess the role of inflammation and eosinophils in the physiological remodeling of uterine nerves by estrogen.

References

- Bianchimano P, Frias AI, Richeri A, Brauer MM (2006) Antagonistic effects of estrogen and dexamethasone on uterine sympathetic nerves. Proceedings 21th Congress of the Argentine Society for Neurochemistry (SAN). Córdoba, Argentina, p 115 (abstract)
- Björling DE, Beckman M, Clayton MK, Wang ZY (2002) Modulation of nerve growth factor in peripheral organs by estrogen and progesterone. *Neuroscience* 110:155–167
- Bohn MC, McEwen B, Luine VN, Black IB (1984) Development and characterization of glucocorticoid receptors in the rat superior cervical ganglion. *Dev Brain Res* 14:211–218
- Brauer MM, Lincoln J, Blundell D, Corbacho A (1992) Postnatal development of noradrenaline-containing nerves of the rat uterus. *J Auton Nerv Syst* 39:37–50
- Brauer MM, Corbacho A, Burnstock G (1995) Effects of chronic and acute oestrogen treatment on the development of noradrenaline-containing nerves of the rat uterus. *Int J Dev Neurosci* 13:791–798
- Brauer MM, Burnstock G, Thrasivoulou C, Cowen T (1998) In oculo transplants of myometrium from postpartum guinea pigs fail to support sympathetic reinnervation. *J Anat* 193:509–517
- Brauer MM, Llodrá J, Scorza MC, Chávez R, Burnstock G, Thrasivoulou C, Cowen T (1999) Differential effects of prepubertal chronic oestrogen treatment on the synthesis of noradrenaline in uterine myometrial and perivascular sympathetic nerves. *Int J Dev Neurosci* 17:295–303
- Brauer MM, Chávez R, Llodrá J, Richeri A, Scorza C (2000) Effects of chronic oestrogen treatment are not selective for uterine noradrenaline-containing sympathetic nerves: a transplantation study. *J Anat* 196:347–355
- Brauer MM, Chávez-Genaro R, Richeri A, Viettro L, Frias AI, Burnstock G, Cowen T (2002) The oestrogenized rat myometrium inhibits organotypic sympathetic reinnervation. *Auton Neurosci* 101:13–22
- Campbell PS (1978) The mechanism of inhibition of uterotrophic responses by acute dexamethasone pretreatment. *Endocrinology* 103:716–723
- Costello RW, Schofield BH, Kephart GM, Gleich GJ, Jacoby DB, Fryer AD (1997) Localization of eosinophils to airway nerves and effect on neuronal M2 muscarinic receptor function. *Lung Cell Mol Physiol* 17:L93–L103
- Chalar C, Richeri A, Viettro L, Chávez-Genaro R, Bianchimano P, Mármol NM, Crutcher K, Burnstock G, Cowen T, Brauer MM (2003) Plasticity in rat uterine sensory nerves: the role of NGF and TrkA. *Cell Tissue Res* 314:191–205
- Chávez-Genaro R, Crutcher K, Viettro L, Richeri A, Coirolo N, Burnstock G, Cowen T, Brauer MM (2002) Differential effects of oestrogen on developing and mature uterine sympathetic nerves. *Cell Tissue Res* 308:61–73
- Chávez-Genaro R, Lombide P, Anisetti G (2006) A quantitative study of rat uterine sympathetic innervation during pregnancy and postpartum. *Reprod Fertil Dev* 18:525–531
- Durcan N, Costello RW, McLean WG, Blusztajn J, Madziar B, Fenech AG, Hall IP, Gleich GJ, McGarvey L, Walsh MT (2006) Eosinophil-mediated cholinergic nerve remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34:775–786
- Gunin AG, Sharov AA, Nikolaev DV (2000) Two month glucocorticoid treatment increases estradiol-induced stromal and myometrial cell proliferation in the uterus of ovariectomized rats. *Obstet Gynecol* 88:171–179
- Gunin AG, Mashin IN, Zakharov DA (2001) Proliferation, mitosis orientation and morphogenetic changes in the uterus of mice following treatment with both estrogen and glucocorticoid hormones. *J Endocrinol* 169:23–31
- Gunin AG, Emelianov VU, Tomachev AS (2003) Expression of estrogen receptor- α , glucocorticoid receptor, β -catenin and glycogen synthase kinase-3 β in the uterus of mice following long-term treatment with estrogen and glucocorticoid hormones. *Eur J Obstet Gynecol* 107:62–67
- Haase EB, Buchman J, Tietz AE, Schramm LP (1997) Pregnancy-induced uterine neuronal degeneration in the rat. *Cell Tissue Res* 288:293–306
- Hicks JJ, Duran-Reyes G, Diaz-Flores M (1994) Effect of dexamethasone as an inhibitor of implantation and embryo development on the rat. *Contraception* 50:581–589
- Ho CKM, Tetsuka M, Hillier SG (1999) Regulation of 11β -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms and glucocorticoid receptor gene expression in the rat uterus. *J Endocrinol* 163:425–431
- Jana B, Dzienis A, Rogozinska A, Piskula M, Jedlinska-Krakowska M, Wojtkiewicz J, Majewski M (2005) Dexamethasone-induced changes in sympathetic innervation of porcine ovaries and their steroidogenic activity. *J Reprod Dev* 51:715–725
- Kingham PJ, McLean WG, Walsh MT, Fryer AD, Gleich GJ, Costello RW (2003) Effects of eosinophils on nerve cell morphology and development: the role of reactive oxygen species and p38 MAP kinase. *Am J Lung Cell Mol Physiol* 285:L915–L924
- Klukovits A, Gáspár R, Sántha P, Jancsó G, Falkay G (2002) Functional and histochemical characterization of a uterine adrenergic denervation process in pregnant rats. *Biol Reprod* 67:1013–1017
- Krizsan-Agbas D, Smith PG (2002) Estrogen modulates myometrium-induced sympathetic neurite formation through actions on target and ganglion. *Neuroscience* 114:339–347
- Krizsan-Agbas D, Pedchenko T, Hassan W, Smith PG (2003) Oestrogen regulates sympathetic neurite outgrowth by modulating brain-derived neurotrophic factor synthesis and release by the rodent uterus. *Eur J Neurosci* 18:2760–2768
- Lee L-Y, Gu Q, Gleich GJ (2001) Effects of human eosinophil granule-derived cationic protein on C-fiber afferents in the rat lung. *J Appl Physiol* 91:1318–1326

- Lobos E, Gebhardt C, Kluge A, Spanel-Borowski K (2004) Expression of nerve growth factor (NGF) isoforms in the rat uterus during pregnancy: accumulation of precursor proNGF. *Endocrinology* 146:1922–1929
- Marzioni D, Tamagnone L, Capparuccia L, Marchini C, Amici A, Todros T, Bischof P, Neidhart S, Grenningloh G, Castellucci M (2004) Restricted innervation of uterus and placenta during pregnancy: evidence for a role of the repelling signal semaphorin 3A. *Dev Dyn* 231:839–848
- Miller LE, Weidler C, Falk W, Angele P, Schaumburger J, Schölmerich J, Straub RH (2004) Increased prevalence of semaphorin 3C, a repellent of sympathetic nerve fibers, in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50:1156–1163
- Moustafa FA (1988) Changes in cholinergic and noradrenergic nerves in the pregnant and postpartum uterus of the albino rat and guinea pig. *Acta Anat* 132:310–316
- Nankova B, Kvetnansky R, Hiremagalur B, Sabban B, Rusnak M, Sabban EL (1996) Immobilization stress elevates gene expression for catecholamine biosynthetic enzymes and some neuropeptides in rat sympathetic ganglia: effects of adrenocorticotropin and glucocorticoids. *Endocrinology* 137:5597–5604
- Nevagi SA, Kaliwal BB (2001) Effects of dexamethasone on implantation and pregnancy in the albino rat. *Indian J Exp Biol* 39:1163–1165
- Nielsen LF, Moe D, Kirkeby S, Garbarsch C (1998) Sirius Red and acid fuchsin staining mechanisms. *Biotech Histochem* 73:71–77
- Owman C, Stjernquist M (1988) Origin, distribution and functional aspects of aminergic and peptidergic nerves in the male and female genital tracts. In: Björklund A, Hökfelt T, Owman C (eds) *Handbook of chemical neuroanatomy*. Elsevier, Amsterdam, pp 445–544
- Papka RE, Cotton JP, Traurig HH (1985) Comparative distribution of neuropeptide tyrosine-, vasoactive intestinal polypeptide-, substance P-immunoreactive, acetylcholinesterase-positive and noradrenergic nerves in the reproductive tract of the female rat. *Cell Tissue Res* 242:475–490
- Puri CP, Garfield RE (1982) Changes in hormone levels and gap junctions in the rat uterus during pregnancy and parturition. *Biol Reprod* 27:967–975
- Rabin DS, Johnson EO, Brandon DD, Liapi C, Chrousos GP (1990) Glucorticoids inhibit estradiol-mediated uterine growth: possible role of the uterine estradiol receptor. *Biol Reprod* 42:74–80
- Rhen T, Grissom S, Afshari C, Cidlowski JA (2003) Dexamethasone blocks the rapid biological effects of 17 β -estradiol in the rat uterus without antagonizing its global genomic actions. *FASEB J* 17:1849–1870
- Richeri A, Bianchimano P, Mármol NM, Vierto L, Cowen T, Brauer MM (2005) Plasticity in rat uterine sympathetic nerves: the role of TrkA and p75 nerve growth factor receptors. *J Anat* 207: 25–134
- Richeri A, Chalar C, Bianchimano P, Greif G, Brauer MM (2007) Oestrogen regulation of semaphorin expression in the rat uterus. VII IBRO World Congress of Neurosciences. Melbourne, Australia (abstract)
- Sahlin L (1995) Dexamethasone attenuates the estradiol-induced increase in IGF-I mRNA in the rat uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55:9–15
- Shi B, Mocchetti I (2000) Dexamethasone induces TrkA and p75NTR immunoreactivity in the cerebral cortex and hippocampus. *Exp Neurol* 162:257–267
- Shi B, Stuart JR, Bradoli C, Mocchetti I (1998) Dexamethasone induces hypertrophy of developing medial septum cholinergic neurons: potential role of nerve growth factor. *J Neurosci* 18:9326–9334
- Stewart PJ, Zaludeck CJ, Inman MM, Webster RA (1983) Effects of dexamethasone and indomethacin on estrogen-induced uterine growth. *Life Sci* 33:2349–2356
- Viau V (2002) Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and -adrenal axes. *J Neuroendocrinol* 14: 506–515
- Wang Q, Tang XN, Yenari MA (2007) The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 184:53–68
- Zoubina EV, Smith PG (2000) Axonal degeneration and regeneration in rat uterus during the estrous cycle. *Auton Neurosci* 84: 176–185
- Zoubina EV, Smith PG (2001) Sympathetic hyperinnervation of the uterus in estrogen receptor alpha knock-out mouse. *Neuroscience* 103:237–244
- Zoubina EV, Fan Q, Smith PG (1998) Variation in uterine innervation during the estrous cycle. *J Comp Neurol* 397:561–571
- Zoubina EV, Mize AL, Alper RH, Smith PG (2001) Acute and chronic estrogen supplementation decreases uterine sympathetic innervation in ovariectomized adult virgin rats. *Histol Histopathol* 16:989–996
- Zupkó I, Csonka D, Falkay G (2005) A rat model for functional characterization of pregnancy-induced denervation and postpartum reinnervation in the myometrium and cervix: a superfusion study. *Reproduction* 130:743–749

Reduced sympathetic neurite outgrowth on uterine tissue sections from rats treated with estrogen

Analía Richeri · Paola Bianchimano ·
Keith A. Crutcher · M. Mónica Brauer

Received: 25 November 2009 / Accepted: 25 February 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract In order to evaluate the contribution of substrate-bound factors to the extent and patterning of the sympathetic innervation of rat uterus following estrogen treatment, superior cervical ganglion explants from neonatal and adult ovariectomized rats were cultured on tissue sections of fresh frozen uterus from adult ovariectomized rats treated with estrogen or a vehicle. The main findings were: (1) neurite growth was greatly influenced by histological features of the underlying section; (2) on myometrial sections, neurites followed the orientation of the main axis of the longitudinally sectioned muscle cells; (3) neurites showed limited growth on transversally sectioned smooth muscle; (4) neuritic patterning was unaffected by a reduction in migrating ganglionic non-neuronal cells; (5) neurite outgrowth, but not non-neural cell migration, was markedly reduced on myometrial sections from rats treated with estrogen. These results suggest that adult myometrium continues to provide signals allowing the organotypic patterning and growth of sympathetic axons, that

estrogen treatment modifies myometrial substrate properties so that it is less supportive for sympathetic neurite growth, and that adult sympathetic neurons retain their ability to recognize substrate-bound cues present in the myometrium. On endometrial sections, neurites formed radially symmetric halos, which were reduced in size on estrogen-treated endometrial substrates. Thus, changes in the neuritogenic capacity of the uterus underlie plasticity in uterine sympathetic nerves, and alterations in substrate-bound factors contribute to the diminished receptivity of the estrogenized uterus to its sympathetic innervation.

Keywords Autonomic · Plasticity · Tissue culture · Gynecological pathologies · Collagen · Rat (Wistar)

Introduction

One of the most outstanding features of the sympathetic innervation of the uterus is its remarkable physiological plasticity, which is regulated by naturally occurring changes in the systemic levels of sex hormones. Although the contribution of progesterone to this plasticity still remains unclear, strong evidence suggests that estrogen is a key hormone regulating the remodeling of uterine sympathetic nerves in the non-pregnant female (for a review, see Brauer 2008). In sexually mature rats, the density of myometrial sympathetic nerves decreases during the estrogen-dominant phases of the sex cycle, and chronic exposure of adult ovariectomized rats to estrogen induces the pruning of mature intrauterine sympathetic nerves (Zoubina et al. 1998, 2001). The inhibitory effects of estrogen are mediated through alpha-estrogen receptors (ER- α). ER- α knockout mice possess an increased density of uterine sympathetic nerves and do not respond to ovariectomy or

Analía Richeri and Paola Bianchimano contributed equally to this work and are postgraduate students of PEDECIBA, Uruguay. This work was supported by a Fogarty International Research Collaboration Award (FIRCA, NIH, grant no. TW007213).

A. Richeri · P. Bianchimano · M. M. Brauer (✉)
Laboratory of Cell Biology,
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable,
Avenida Italia 3318,
Montevideo 11600, Uruguay
e-mail: brauer@iibce.edu.uy

K. A. Crutcher
Department of Neurosurgery,
University of Cincinnati College of Medicine,
231 Albert Sabin Way,
Cincinnati, OH 45267-0515, USA

estrogen supplementation with changes in the density of uterine sympathetic nerves (Zoubina and Smith 2001).

Early studies have shown the abnormal behavior of uterine sympathetic nerves in pregnancy-associated pathologies, such as pre-eclampsia (Rydhström et al. 1989). However, the behavior and contribution of uterine nerves to the symptoms and etiology of gynecological disorders, such as endometriosis (Medina and Lebovic 2009), adenomyosis (Quinn 2007a), and uterine fibroids (Adolfsson et al. 2000; Quinn 2007b) have only recently started to be analyzed in detail. All these conditions are considered to be dependent on estrogens because they occur in women of childbearing age and decrease during natural reproductive senescence (estropause/menopause). For these reasons, these pathologies respond to hormonal treatments that produce a hypoestrogenic state, including gonadotropin-releasing hormone agonists (GnRHa; Akira et al. 2009; Stein and Ascher-Walsh 2009; Vercellini et al. 2009). Such findings reinforce the need for a better understanding of the cellular and molecular factors controlling the responses of uterine nerves to estrogen under normal and pathological conditions.

Previous *in vivo* (Brauer et al. 2000, 2002) and *in vitro* (Krizsan-Agbas and Smith 2002) studies have shown that, under the influence of estrogen, the uterine myometrium loses its ability to support its sympathetic innervation. Moreover, current evidence indicates that the estrogenized myometrium is a source of several locally produced, diffusible factors with negative effects on sympathetic nerve growth, including brain-derived neurotrophic factor (BDNF; Krizsan-Agbas et al. 2003), pro-nerve growth factor (pro-NGF; Lobos et al. 2005), neurotrimin (Krizsan-Agbas et al. 2008), and some secreted members of the class 3 semaphorins (Marzioni et al. 2004; Richeri et al. 2008; Brauer 2008). In addition to soluble factors, neurite outgrowth requires substrate-bound signals. These signals play a crucial role during development, and evidence has been presented that such factors continue to function during maturity to regulate neuronal plasticity and regeneration (Hou et al. 2008).

Many *in vitro* studies have addressed the contribution of substrate-bound signals to neurite outgrowth by using patterned surfaces (i.e., stripe assays; Snow et al. 2002). More recently, high-resolution nanoscale patterned substrates have demonstrated that, at least *in vitro*, both substrate composition and geometry (including three-dimensional patterning) contribute to the regulation of growth cone behavior (Li et al. 2008; Crutcher et al. 2009; von der Mark et al. 2010). In the present study, we have sought to test the hypothesis that alterations in substrate-bound signals in the estrogenized myometrium contribute to its inability to support sympathetic nerve growth. With this aim, we have used the tissue section culture method (cryoculture), because this technique allows

the study of the contribution of substrate-bound signals independently of any ongoing synthesis of neurite growth-promoting and growth-inhibiting factors by the target tissue. In addition, this method permits the correlation of patterns of nerve growth with specific features of the underlying tissue (reviewed in Crutcher 1993). Some of these results have been published in abstract form (Bianchimano et al. 2008).

Materials and methods

Animals and treatments

Studies were conducted on female Wistar-derived albino rats from the breeding colony at the Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE, Montevideo, Uruguay). Animals were sexed at birth, weaned at 3 weeks, and maintained under controlled conditions of temperature (21–22°C) and illumination (12 h light/dark cycles) with water and food provided *ad libitum*. All animal procedures were conducted in accordance with the Statement of Compliance with Standards for Human Care and Use of Laboratory Animals, and the number of experimental animals was reduced to the minimum required to obtain statistically significant data.

Uterine tissue donors Adult rats (10 weeks old) were anesthetized with 90 mg/kg ketamine (Unimedical, Uruguay) plus 10 mg/kg xylazine (Unimedical) and bilaterally ovariectomized (OVX) through two small incisions in the lumbar region. Following surgery, rats were allowed to recover and returned to the animal facility. None of the animals showed signs of pain or infection requiring post-operative analgesics or antibiotics. To minimize discomfort, ovariectomized females were housed in individual cages following surgery and until they were killed. Estrogen treatment of OVX uterine tissue donors, consisted of three subcutaneous injections of 50 µg β-estradiol 17-cypionate (Laboratorios König, Argentina) given on days 5, 7, and 9 following surgery. Animals were killed by an overdose of sodium pentobarbital on the day after completion of treatment. This regimen was selected because it provoked a substantial degree of uterine sympathetic denervation and reduced the atrophic changes induced by ovariectomy in the uterus (Chávez-Genaro et al. 2002; Richeri et al. 2005). Vehicle-treated (peanut oil; Sigma-Aldrich, USA) OVX rats were killed 3 days following surgery. Although the harvesting of this tissue would have been desirable at the same post-operative time as the estrogen-treated animals, reductions in the thickness of the myometrium following ovariectomy (Fig. 1a, b) limited the number of usable tissue sections

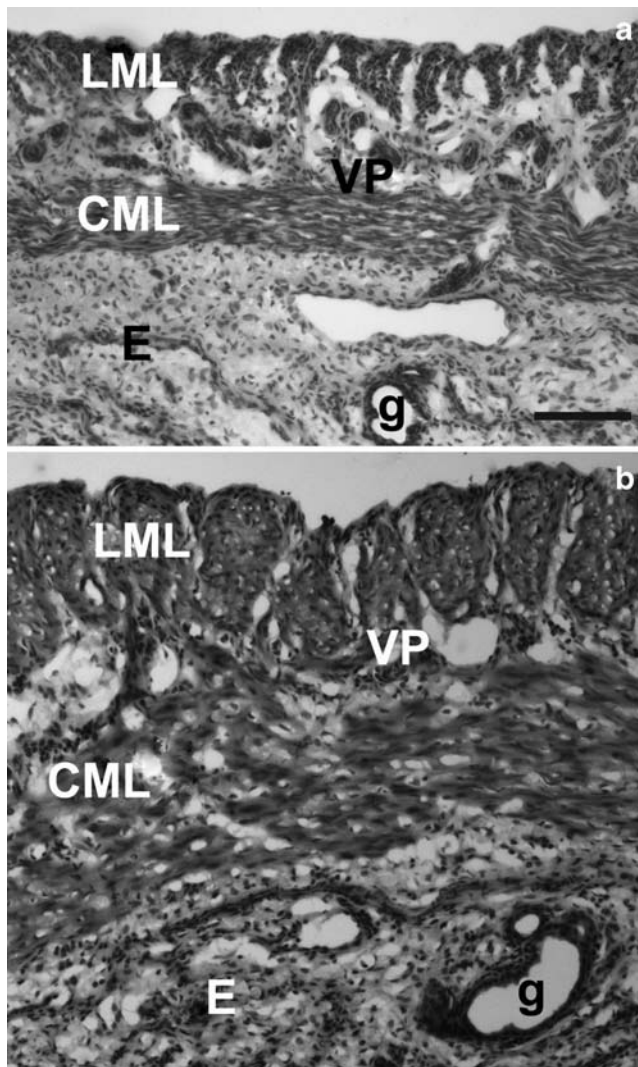


Fig. 1 Histological changes in the uterus following ovariectomy and estrogen replacement. Transverse cryostat tissue sections (8 μ m thick) of the rat uterine horn at 3 days following ovariectomy (**a**) and at 10 days following ovariectomy plus estrogen replacement (**b**). Hematoxylin and eosin staining (CML circular myometrial layer, E endometrium, g endometrial gland, LML longitudinal myometrial layer, VP vascular plexus). Bars 100 μ m

with appropriate orientation of the smooth muscle cells for quantitative studies. As a result, the use of a 3-day survival time point substantially reduced the number of donor animals needed.

Ganglionic explants donors Explants of the superior cervical ganglion (SCG) from neonatal (4–5 days old) and adult (10 weeks) OVX rats were used. Although the SCG does not normally innervate the uterus (Vera et al. 1997; Houdeau et al. 1998), their neurons have been shown to respond to several uterine-derived growth-promoting and growth-inhibiting signals in a way similar to that of uterine-projecting sympathetic neurons, both in vitro (Krizsan-

Agbas and Smith 2002; Krizsan-Agbas et al. 2003, 2008) and in anterior eye chamber transplantation studies (Brauer et al. 1998, 2000, 2002).

Tissue culture

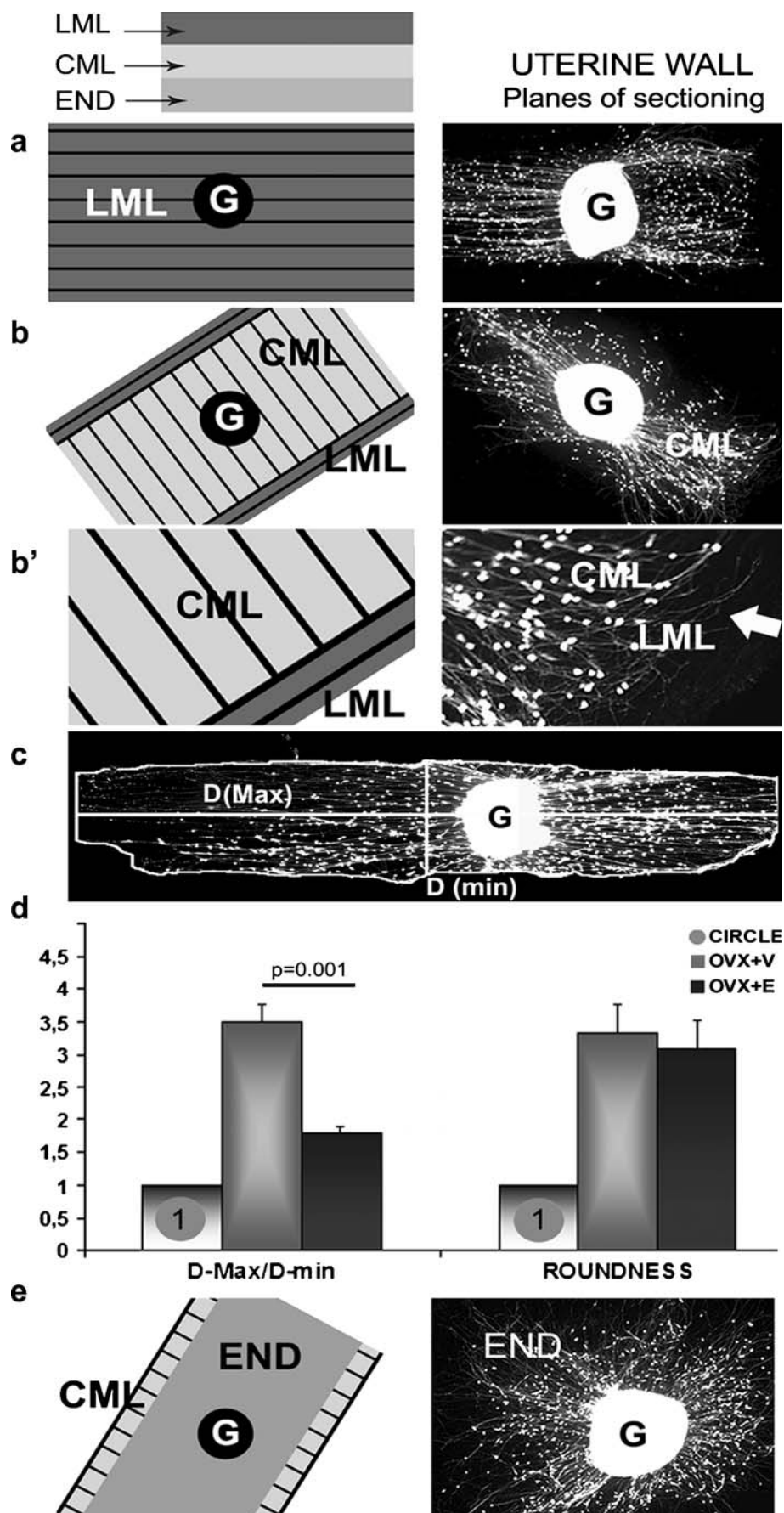
The uterine horns were removed under aseptic conditions, freed from fat and connective tissue, opened longitudinally, and flat-mounted onto pre-cooled cryostat chucks. Cryostat tissue sections (14 μ m thick) were obtained at various depths into the tissue, including the longitudinal myometrial layer, the circular myometrial layer, and the endometrium. In some studies, sections cut transversally to the long axis of the uterine horn were employed. Sections were thaw-mounted onto the bottom of 35-mm untreated plastic tissue-culture dishes (Falcon BD, USA). Some sections were mounted on glass slides and immunostained with anti-tyrosine-hydroxylase (α -TH, final dilution 1:400; ABR–Affinity BioReagents, USA) to assess endogenous sympathetic innervation.

SCGs were freed from connective tissue and further dissected into explants (500–600 μ m in diameter). Cultures were grown in serum-free Neurobasal medium (Gibco, Invitrogen, USA) supplemented with 2% B-27 (Gibco, Invitrogen), 0.5 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich), 1% antibiotics (Gibco, Invitrogen), and NGF (Harlan Bio-products for Science, USA) at concentrations of 0.5 ng/ml for neonatal explants and 5 ng/ml for adult ganglion explants. NGF concentrations were based on preliminary studies designed to establish the minimum concentration required to obtain consistent neurite outgrowth on sections from freshly frozen tissue. To assess the contribution of non-neuronal cells to neuritic patterning and outgrowth, cell proliferation in the ganglion explants was arrested by treatment with 30 μ g/ml mitomycin C (Sigma-Aldrich) dissolved in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 medium (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37°C (Damon 2006). After a washout of mitomycin C, explants were placed onto tissue sections. Control ganglion explants were incubated in DMEM/F12 medium for 1 h at 37°C.

Microscopy, imaging, and quantitative assessment of neurite outgrowth and non-neuronal cell migration

At 3 days after plating, cultures were incubated with a fluorescent vital dye (5-carboxyfluorescein diacetate, acetoxymethyl ester; Molecular Probes, Invitrogen) for 1.5 h and examined under a Nikon E800 fluorescence microscope. Images were captured at magnifications of 4 $\times$ and 10 $\times$ by using a CoolSNAP-Pro Monochrome Digital camera with Image ProExpress software (Media Cybernetics, USA). Following imaging, preparations

Fig. 2 Influence of uterine substrate on neurite patterning. Culture of sympathetic ganglion explants (*G*; 500–600 μm in diameter) on tissue sections obtained at various depths from freshly frozen flat-opened uterine horn showed that neurites grew following particular features of the underlying tissue sections. On sections of the longitudinal (*LML*, **a**) and circular (*CML*, **b**) myometrial layers, neurites followed the orientation of the main axis of the longitudinally sectioned, smooth muscle cells. When neurites reached a boundary between these two cell orientations, they make sharp turns to adapt their course to the main axis of the muscle cells (**b'**, arrow). The schematic representation in **c** shows the quantitative method employed to assess the diameter ratio ($D\text{-Max}/D\text{-min}$) and roundness of the neuritic halo observed on sections of the longitudinally-sectioned *LML*. The diameter ratio and roundness of the elongated neuritic halo formed on sections of the *LML* of control (*OVX+V*) and estrogen-treated (*OVX+E*) uterine tissue donors (**d**) was quantified. Radially symmetric halos formed on sections of the endometrium (*END*, **e**)



were fixed in 4% paraformaldehyde and stained with 0.01% toluidine blue to assess their histology. Neurite outgrowth and non-neuronal cell migration were blindly measured on tissue sections of the longitudinally sectioned, longitudinal myometrial layer and endometrium by using ImagePro Plus software (Media Cybernetics). Measurement data collected from uterine sections obtained from the same rat were averaged, so that each uterine donor was treated as one independent observation ($n=4-5$ rats per treatment). Results are expressed as the median with first and third quartiles. Morphometric measurements were compared by using non-parametric tests. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

Results

Pattern of neurite outgrowth on control uterine tissue sections

Culture experiments carried out by using as substrate tissue sections obtained at various depths and orientations of the flat-opened uterine horn revealed that the course of growing neurites was greatly influenced by histological features of the underlying tissue section (Figs. 2, 3). On sections of both the longitudinal (Figs. 2a, c, 3a, c) and circular (Figs. 2b, 3b) myometrial layers, neurites preferentially grew following the direction of the main axis of the longitudinally sectioned, smooth muscle cells. Neurites rarely grew perpendicular to this axis (i.e., across the sectioned cell), and on occasions, they turned by up to 90° to adapt their course to the orientation of the main muscle axis (Figs. 2b', 3g). In order to assess quantitatively the extent of this organotypic patterning (i.e., the degree to which the neuritic course adapted to the main axis of the longitudinally sectioned, smooth muscle layers), the diameter ratio (diameter maximum/diameter minimum) and roundness of the neuritic halo were measured by using Image ProPlus software (Fig. 2c, d). Both the diameter ratio and roundness were above 1 (perfect circle=1) in ganglionic explants growing on the longitudinally sectioned, longitudinal myometrial layer, thus reflecting the adaptation of neuritic growth to the main axis of the longitudinal myometrial layer. On transverse sections of the uterine horn, most neurites grew in association with the longitudinally sectioned, muscle cells of the circular myometrial layer (Fig. 3b). Some isolated neurites grew on the cross-sectioned longitudinal muscle layer, forming an irregular network pattern (Fig. 3b, d).

Qualitative microscopic examination of toluidine blue-stained cultures suggested that neurites preferentially grew apposed to smooth muscle cells/bundles (Fig. 3c, g). Some neurites grew along blood vessels (Fig. 3c, arrowhead, h).

Some fibers showed expanded growth cones (Fig. 3c, inset), whereas other presented varicosities. The pattern of nerve growth on myometrial tissue sections resembled that of the endogenous uterine sympathetic innervation in that the predominant orientation was along the main axis of the smooth muscle fibers (Fig. 3e), and many fibers were associated with the vasculature (Fig. 3f).

Treatment of neonatal ganglion explants with mitomycin C reduced, by 62%, the overall density of non-neuronal cells migrating on myometrial sections (DMEM/F12=248 [206–276]; mitomycin C=95 [64–141], $P < 0.03$); methodological details are given below). Reductions in the number of migrating non-neuronal cells had no effect on the pattern and extent of neuritic growth (Figs. 4a, b, see also below).

Neurite outgrowth on myometrial tissue sections from estrogen-treated rat donors

In both neonatal (Fig. 4a, c) and adult (Fig. 5a, b) ganglionic explants, the pattern of neuritic growth on myometrial sections was unaffected by estrogen treatment of the uterine donors. However, in both cases, significant reductions in the extent of neuritic growth were observed. To assess these changes quantitatively (Fig. 4e), the maximum neurite length (MNL) was calculated. To this end, the lengths of the five longest neurites were measured by drawing a straight line from the proximal border of the explant to the distal end of each neurite. In order to control for variability in explant size, the MNL was divided by the mean explant diameter to obtain a normalized growth ratio (neurite growth ratio, NGR). In neonatal ganglionic explants, the MNL was reduced by 37% on myometrial sections of estrogen-treated donors, and the NGR showed a 55% reduction (Fig. 6d, e). The diameter ratio was consistently reduced by 51% (Fig. 2d). In order to assess changes in neurite density (Fig. 4e), the number of neurites crossing a perpendicular line 1000 μm from the proximal border of the explant was counted, and the intercept nerve density was expressed as the number of neurites per millimeter. These studies showed that intercept nerve density was reduced by 85% in neonatal ganglionic explants cultured on myometrial sections of estrogen-treated donors (Fig. 6f).

On control myometrial sections, ganglionic explants from adult ovariectomized rats (Fig. 5a) gave rise to shorter neurites than neonatal ganglia (Fig. 4a). On estrogen-treated myometrial substrates (Fig. 5b), the MNL was reduced by 29% (Fig. 6g), and the NGR declined 40% (Fig. 6h). To assess changes in nerve density, the percentage area occupied by neurites was measured (see Fig. 5c–e). The density of neurites leaving the explant showed a reduction on myometrial sections from estrogen-treated donors, but the difference did not reach statistical significance (Fig. 6i).

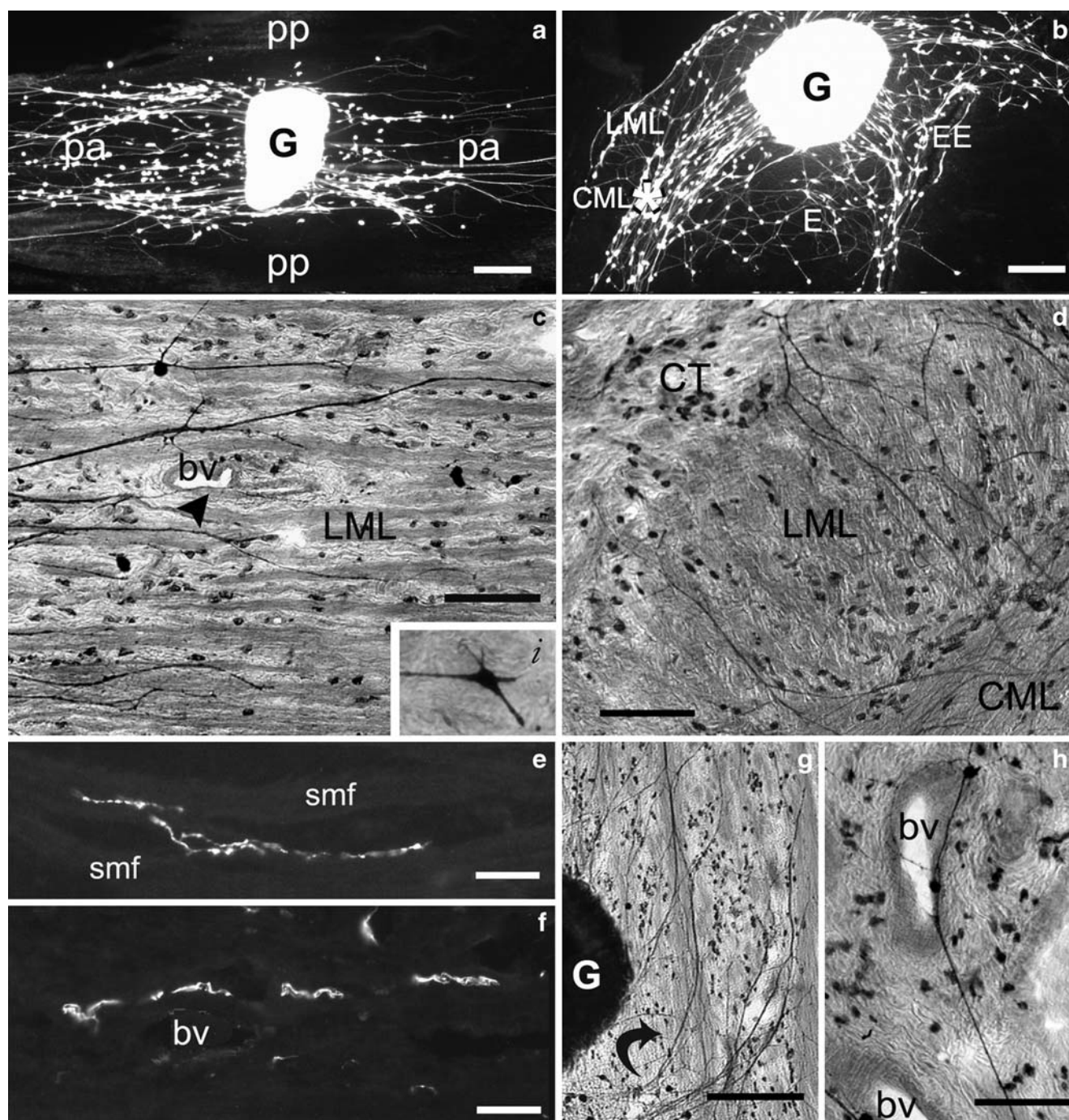


Fig. 3 Pattern of neurite outgrowth on myometrial tissue sections from control ovariectomized rats. Representative fluorescein-labeled neonatal sympathetic ganglion explants (*G*) cultured for 3 days on unfixed uterine tissue sections. **a** Neurites extending on sections of the flat-opened longitudinal myometrial layer followed the parallel (*pa*) orientation of the main axis of the longitudinally sectioned, smooth muscle cells. Note that the myometrial section covers the entire field. However, neurites did not grow perpendicularly (*pp*) to the muscle main axis. In **b**, a transverse section of the uterine horn was used as substrate. Note that most neurites grew paralleling the main axis of the longitudinally-sectioned circular myometrial layer (*star*, *CML*) and comparatively fewer neurites grew toward the transversally sectioned, smooth muscle cells in the longitudinal myometrial layer (*LML*). Some fibers were seen penetrating the endometrium (*E*) and lying in

association with the endometrial epithelium (*EE*). **c**, **d**, **g**, **h** Toluidine blue-stained cultures showing neurite growth mostly associated with myometrial smooth muscle cells and intrauterine blood vessels (*bv*, see arrowhead in **c**). *Inset i* in **c** Expanded growth cone. **d** Transverse section of the uterine horn illustrating the orientation of neurites on the transversally sectioned *LML* (*CT* connective tissue in the outer uterine surface). **g** Some neurites (*curved arrow*) turned up to 90° to follow the direction of muscle fibers. **h** Neurite growing in association with the surface of a sectioned blood vessel (*bv*). **e**, **f** Uterine tissue sections fixed conventionally and stained for tyrosine hydroxylase to reveal the endogenous sympathetic innervation and its association with individual smooth muscle fibers (*smf*) in the longitudinal myometrial layer and intrauterine blood vessels (*bv*). Bars 400 μm (**a**), 200 μm (**b–d**, **g**, **h**), 25 μm (**e**, **f**)

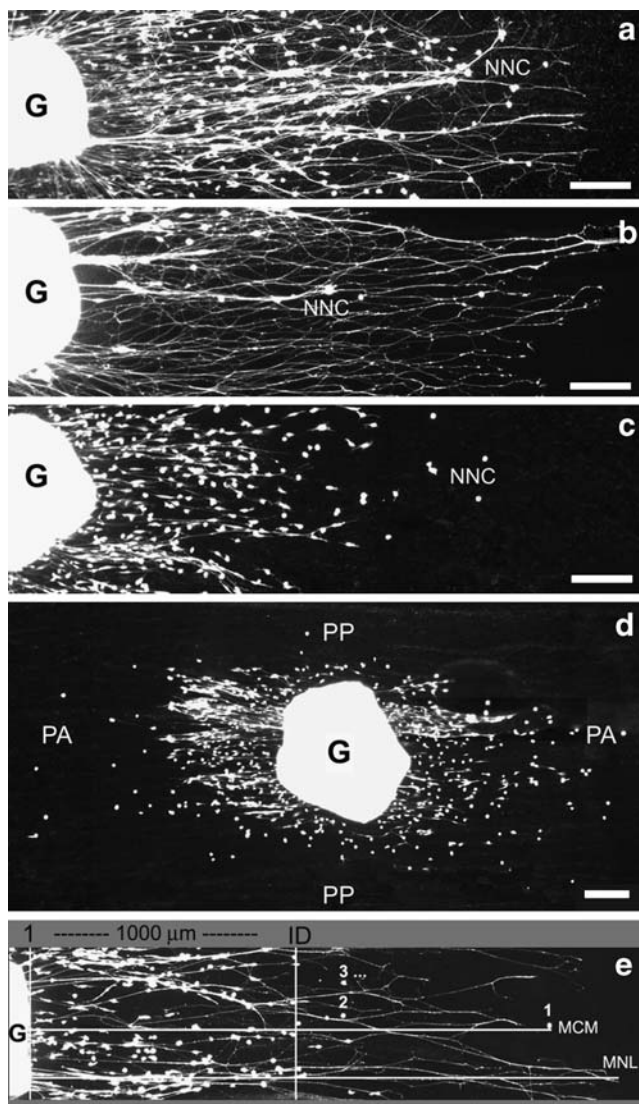


Fig. 4 Neurite outgrowth and non-neuronal cell migration from neonatal sympathetic ganglia on sections of myometrium from control and estrogen-treated rats. Representative images of fluorescein-labeled sympathetic control (a) and mitomycin-C-treated (b) neonatal ganglion explants (G) cultured for 3 days on unfixed tissue sections of the longitudinal myometrial layer of a control ovariectomized adult rat. Neurite outgrowth on myometrial sections was unaffected by the sharp reduction in the number of migrating ganglionic non-neuronal cells (NNC). Neonatal ganglion explants plated on myometrial sections of estrogen-treated rat donors are shown in c, d. Note that neurite growth, but not non-neuronal cell migration, is markedly reduced on sections of estrogenized myometrium. In d, non-neuronal cells preferentially migrate parallel (PA) to the smooth muscle cells long axis, and only a few cells migrate perpendicularly (PP). Bars 200 μ m. In the representation of the quantitative morphological analyses (e), the rectangular mask containing the longitudinal myometrial layer was superimposed on the vital dye image, cropped, and then used for quantitative analysis. Only images in which neurites did not reach the edge of the section and did not encounter other tissue structure (i.e., circular myometrial layer, vascular plexus, or endometrium) were employed. Measurements include maximum neurite length (MNL), neurite intercept density (ID) at 1000 μ m from the proximal border of the ganglion explant (black 1); maximum non-neuronal cell migration (MCM); non-neuronal cell migration beyond 1000 μ m from the ganglion explant proximal border (white 1, 2, 3...)

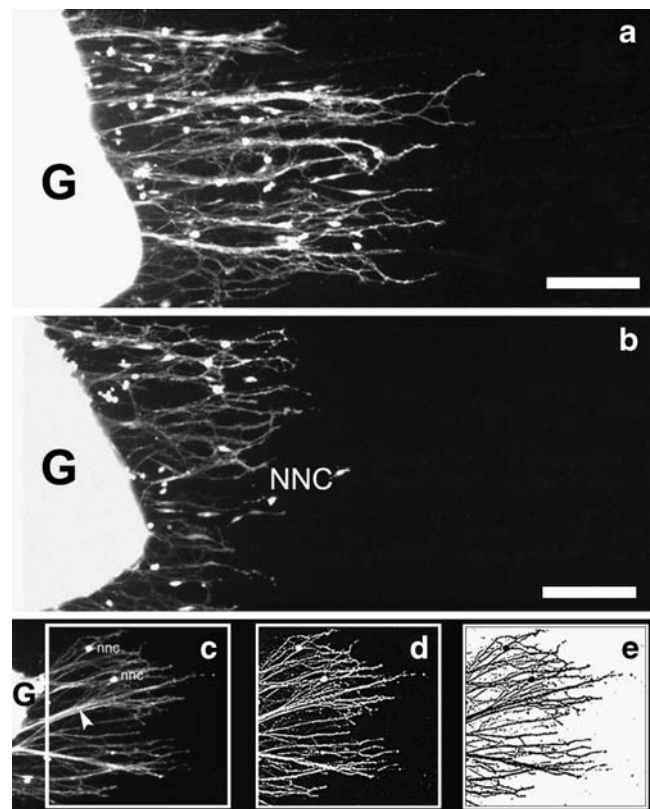


Fig. 5 Neurite outgrowth and non-neuronal cell migration from adult sympathetic ganglia on sections of myometrium from control and estrogen-treated rats. Representative images of fluorescein-labeled adult rat sympathetic ganglion explants plated on sections of the longitudinal myometrial layer of adult ovariectomized rats treated with vehicle (a) or estrogen (b). Note that neurite growth was markedly reduced on sections of estrogenized myometrium. Only a small population of non-neuronal cells (NNC) migrated out of adult ganglionic explants (G). Bars 200 μ m. As shown in the representations of the method employed to measure changes in neurite density, a 0.25-mm² square was superimposed on the image of neurites (arrowhead) located close to the explant border (c) and then cropped (nnc non-neuronal cells). Following contrast enhancement (d) by using a Kernels higauss filter (9 $\times$ 9), neurites were isolated by means of the “threshold” function of Image ProPlus software (e), and the resulting nerve area was measured and expressed per square millimeter of tissue section

Non-neuronal cell migration on control and estrogen-treated myometrial tissue sections

On both vehicle- and estrogen-treated myometrial substrates, a large number of non-neuronal cells migrated out from neonatal ganglionic explants (Fig. 4a, c). Like the neurites, non-neuronal cells preferentially followed the orientation of the main axis of the longitudinally sectioned, smooth muscle cells (Figs. 4d, 7a). The extent of non-neuronal cell migration [i.e., maximum cell migration (MCM) and number of cells migrating beyond 1000 μ m (NC), Fig. 4e] was unchanged on estrogen-treated myometrial sections (Figs. 4a, c, 7a, b). Non-neuronal cell migration was limited in adult

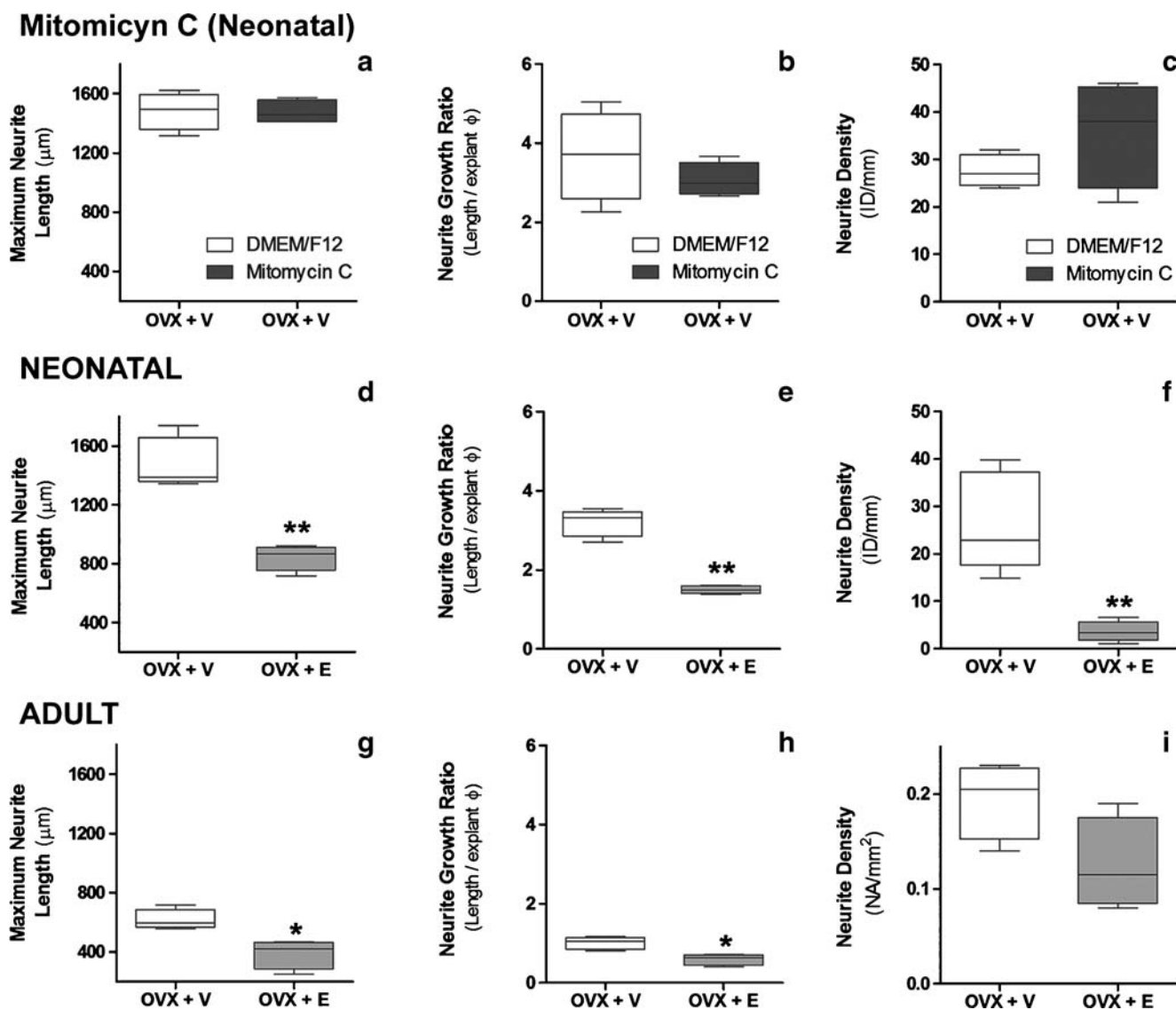


Fig. 6 Quantitative assessment of neurite outgrowth on myometrial sections. Neonatal ganglion explants (a–c) treated with mitomycin C (30 $\mu\text{g/ml}$) or DMEM/F12 (control) plated on cryostat tissue sections of the longitudinal myometrial layer from adult ovariectomized (OVX) rats. Neonatal (d–f) and adult ovariectomized (g–i) ganglion explants plated on cryostat tissue sections of the longitudinal myometrial layer from adult OVX rats were treated with vehicle (OVX+V) or estrogen

(OVX+E). Data pairs were compared by using the Mann-Whitney non-parametric test. Multiple comparisons were avoided because experiments were not conducted simultaneously (ϕ diameter, ID/mm neurite intercept density per millimeter at 1000 μm from proximal ganglion border, NA/mm² neurite area per mm² of muscle section at the ganglion border). *Significant difference ($P=0.03$) compared with control. **Significant difference ($P=0.008$) compared with control

sympathetic ganglia (Fig. 5a, b) and similar on both control and estrogen-treated myometrial substrates (Fig. 7c, d).

Neurite outgrowth and non-neuronal cell migration on endometrial tissue sections from estrogen-treated rat donors

Explants plated on sections of the endometrium from control OVX rats formed radially symmetric halos composed of an intricate meshwork of neurites (Figs. 2e, 8a). This pattern resembled the neuritic halo surrounding explants plated on collagen-coated dishes (Fig. 8c). Neurite outgrowth was reduced on explants growing on endometrial sections of

estrogen-treated rats (Fig. 8b), and this growth was restricted to the basal lamina of endometrial glands (Fig. 8d) and the lining epithelium (Fig. 8e). Similar results were seen with individual sympathetic neurons that occasionally dissociated from explants during the preparation and became attached to the uterine tissue section (Fig. 8f). To assess quantitatively the changes in neuritic extent, we measured the diameter of the neuritic halo, the MNL, and the number of neurites crossing a circular intercepting line located at 1000 μm from the explant (see Fig. 8g, h). These studies showed that, on estrogen-treated endometrial sections, the diameter of the neuritic halo was reduced by 51% (Fig. 9a, b), and the NGR

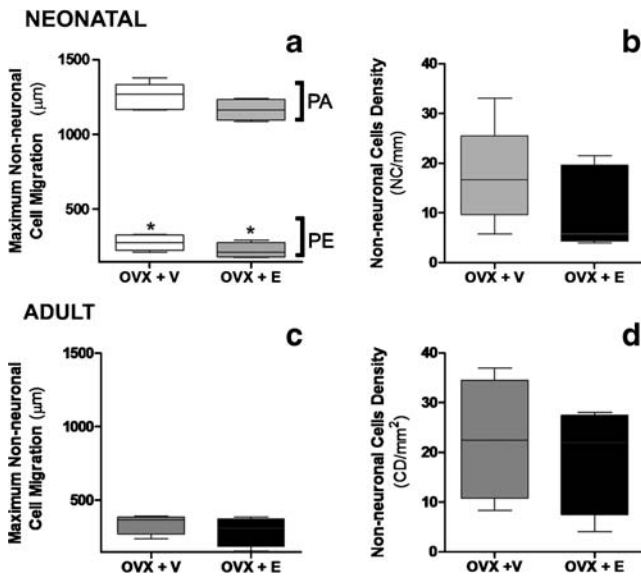


Fig. 7 Non-neuronal cell migration on myometrial sections. Quantitative assessment of non-neuronal cell migration (NC) from superior cervical ganglion explants of neonatal (**a**, **b**) and adult ovariectomized (OVX) rats (**c**, **d**) plated on cryostat tissue sections of the longitudinal myometrial layer from adult OVX rats treated with vehicle (OVX+V control) or estrogen (OVX+E). In neonatal ganglia (**a**), non-neuronal cell migration was measured both parallel (PA) and perpendicular (PE) to the main axis of the longitudinal muscle layer. *Significant difference ($P < 0.05$) between PE and PA of each treatment (Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA test, followed by Dunn's multiple comparison test). In adult ganglia (**d**), non-neuronal cell density (CD) was measured at three different distances from the ganglion explant by superimposing a 0.25-mm^2 stereological grid composed of orthogonally distributed triangular points located at $50\text{-}\mu\text{m}$ intervals. All points overlying non-neuronal cells were counted and averaged, and the cell density was expressed as the number of intercepts per square millimeter. Data pairs were compared by using the Mann-Whitney non-parametric test

was reduced by 48% (Fig. 9c). The intercept density was less on estrogen-treated endometrial sections, but the difference was not statistically significant (Fig. 9d). On sections of control endometrium (Fig. 8a), non-neuronal cells migrated in all directions and did not appear to show any particular pattern. Morphometric studies showed that non-neuronal cell migration on endometrial sections was unaffected by estrogen treatment of uterine tissue donors (Figs. 8b, 9e, f). On these sections, many non-neuronal cells migrated along the basal lamina of the endometrial epithelium and glands, whereas others migrated on the endometrial stroma (Fig. 8b, d, e).

Discussion

Substrate-bound signals contributes to histotypic patterning of myometrial sympathetic nerves

The results presented here show that tissue sections from freshly frozen myometrium from adult ovariectomized

control rats support extensive neurite outgrowth from neonatal sympathetic ganglionic explants. On these sections, neurites do not produce radially symmetric halos, as they form on collagen-coated dishes. Instead, they grow by adapting their course to the orientation of the main axis of the longitudinally sectioned, smooth muscle cells, thus mimicking endogenous innervation. Moreover, on occasions, neurites make sharp turns to follow this particular orientation. Like neonatal neurons, adult sympathetic neurons also produce a histotypic pattern of neuritic growth on myometrial tissue sections. These findings indicate that adult sympathetic neurons retain their ability to recognize cues present in uterine tissue. The maximum neuritic length achieved by adult sympathetic neurons is considerably lower than that of their neonatal counterparts, and adult neurons require higher concentrations of NGF to produce neurites on myometrial tissue sections. Adult sympathetic neurons are known to retain their growth responsiveness to NGF during their adult life (Oriike et al. 2001). However, the requirements for the regenerative growth displayed by adult neurons probably differ from the developmental growth necessities that may be more characteristic of neonatal neurons.

Taken together, these data indicate that adult myometrial smooth muscle target tissues continue to provide signals allowing the organotypic patterning and growth of their sympathetic nerve supply. This is not surprising, because changes in the neuritogenic capacity of the adult uterus are thought to contribute to the estrogen-driven remodeling of sympathetic innervation during the natural estrous cycle and also to allow regeneration of sympathetic nerves following delivery (Brauer 2008). These observations highlight the contribution of substrate-bound signals, because organotypic patterning of neurites occurs without the intervention of any ongoing production of permissive or inhibitory signals by the living tissue. These results are also consistent with the view that growing neurites make choices among different pathways and stress the importance of tissue micro-architecture in determining the pattern of innervation. A similar role for tissue "geometry" in supporting neurite outgrowth has been shown in studies in which sections of brain and spinal cord white matter support parallel but not perpendicular neurite outgrowth (Pettigrew and Crutcher 1999, 2001; Pettigrew et al. 2001; Crutcher et al. 2009).

Ganglionic non-neuronal cells do not contribute to the pattern or extent of neurite outgrowth on myometrial tissue sections

In tissue section cultures employing neonatal ganglionic explants, a considerable number of migrating non-neuronal cells is seen attached to myometrial tissue sections after 3

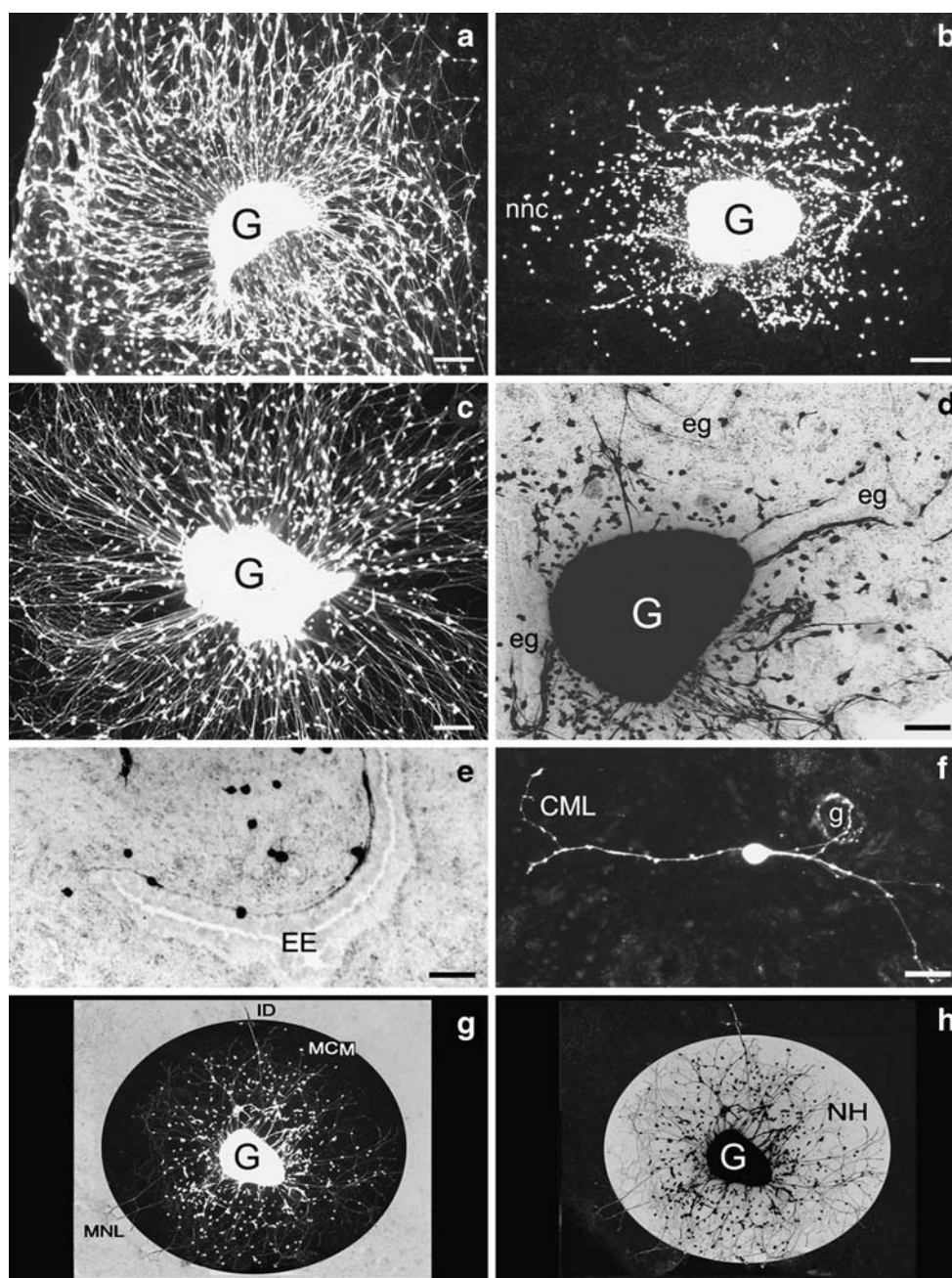


Fig. 8 Neurite outgrowth and non-neuronal cell migration on sections of endometrium. Representative fluorescein-labeled sympathetic neonatal ganglion explants (*G*) cultured for 3 days on unfixed tissue sections of endometrium from adult ovariectomized rats treated with vehicle (**a**) or estrogen (**b**). The pattern of growth on endometrial tissue sections of control rats (**a**) closely resemble the pattern of growth of explants on culture dishes coated with total rat-tail collagen (**c**). Neurite outgrowth, but not non-neuronal cell migration (*nnc* non-neuronal cells), was markedly diminished on endometrial sections of estrogen-treated rats (**b**). In toluidine blue-stained cultures (**d**, **e**) on endometrial sections of estrogen-treated rats, neurite outgrowth appeared to be largely restricted to the basal lamina of endometrial glands (*eg*) and the endometrial epithelium

(*EE*). In **f**, neurites from a fluorescein-labeled sympathetic neuron surround an endometrial gland (*g*) and turn 90° to follow the direction of smooth muscle cells in a neighboring portion of the circular myometrial layer (*CML*). Bars 200 μm (**a–c**), 150 μm (**d**), 120 μm (**e**), 40 μm (**f**). Representation of quantitative morphological analyses of neurite outgrowth and non-neuronal cell migration on sections of the endometrium is shown in **g**, **h**. The diameter of the neuritic halo (*NH*) was measured by drawing a circle or ellipse encompassing the end of the vast majority of neurites from which the mean diameter of the ganglion explant (*G*) was subtracted (*ID* neurite intercept density at 1000 μm, *MNL* maximal neurite length, *MCM* maximal non-neuronal cell migration)

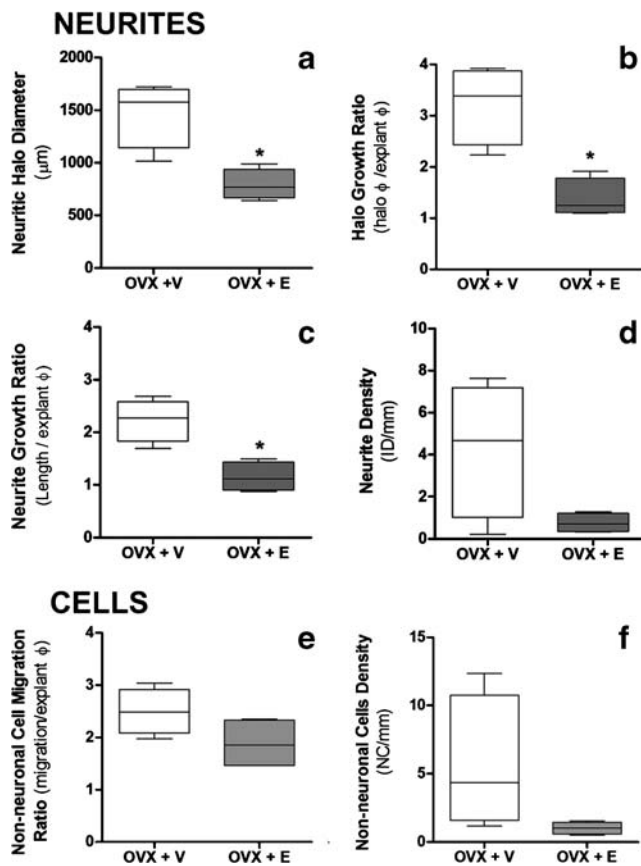


Fig. 9 Neurite outgrowth and non-neuronal cell migration on endometrial substrates. Quantitative assessment of neurite outgrowth (a–d) and non-neuronal cell migration (e, f) from superior cervical ganglion explants plated on endometrial tissue sections from adult ovariectomized rats treated with vehicle (OVX+V control) or estrogen (OVX+E). Data pairs were compared by using the Mann-Whitney non-parametric test (ϕ diameter, ID/mm neurite intercept density per millimeter at 1000 μm from proximal ganglion border, NC/mm number of non-neuronal cells migrating beyond 1000 μm from outer limit of the ganglion explant). *Significant difference ($P=0.03$) compared with OVX+V

days in culture. Although the identity of these non-neuronal cells has not been assessed, a previous scanning electron-microscopic study has shown that, in culture, several types of non-neuronal cells migrate out from neonatal rat SCG, including Schwann cells, other glial cells with a multipolar appearance, connective tissue cells, and macrophages (Hill et al. 1974). A smaller amount of migrating non-neuronal cells is observed in adult sympathetic ganglionic explants, perhaps reflecting their lower mitotic activity and/or reduced responsiveness to signals present in the uterine tissue.

Previous studies have shown that, in vitro, non-neuronal cells (i.e., Schwann cells) contribute to sympathetic neurite outgrowth by synthesizing and secreting factors such as laminin and NGF (Anton et al. 1994). Moreover, such factors might bind to the section and

influence neurite outgrowth (Tuttle and Matthew 1991). Our studies, however, have demonstrated that, in neonatal ganglionic explants, experimental reductions in the number of migrating non-neuronal cells have no impact on the pattern or extent of neuritic growth. Similarly, the naturally reduced number of non-neuronal cells migrating out of adult ganglionic explants does not prevent neurite outgrowth or affect the pattern of neuritic growth on myometrial tissue sections.

Estrogen reduces sympathetic neurite outgrowth on myometrial tissue sections without affecting non-neuronal cell migration

The pattern of neurite growth from both neonatal and adult sympathetic ganglion explants on myometrial tissue sections of estrogen-treated donors is similar to that on control tissue. However, the overall extent of growth is markedly reduced in both cases. These results mimic the inhibitory effects elicited by estrogen both in immature (Chávez-Genaro et al. 2002) and in adult (Zoubina et al. 2001) uterine sympathetic nerves in vivo and suggest that substrate-associated signals contribute to the selective denervation elicited by estrogen in the myometrium. Similarly, anterior eye chamber transplantation studies involving tissues submitted to freeze-thaw cycles before transplantation have shown that poorly innervated cerebral blood vessels from aged rats attract fewer reinnervating nerve fibers from the iris than the normally innervated tissues from young animals (Gavazzi et al. 1996). A reduced neuritic growth occurring on sections of estrogenized myometrium is observed, in spite of the fact that the sympathetic neurons used in this study do not normally innervate the uterus (Vera et al. 1997; Houdeau et al. 1998). This is consistent with previous studies demonstrating that both neonatal and adult SCG are responsive to target-derived diffusible signals produced by the estrogenized myometrium (Krizsan-Agbas and Smith 2002; Krizsan-Agbas et al. 2003, 2008). Moreover, in anterior eye chamber transplant studies, these neurons have been found to mimic the response of native uterine-projecting sympathetic neurons (Brauer et al. 1998, 2000, 2002).

In this study, we have observed that non-neuronal cell migration is influenced by features in the underlying tissue section, and that, like neurites, most cells follow the long axis of the smooth muscle cells. This indicates that both neuronal and non-neuronal cells are influenced by similar cues present in the underlying myometrial tissue. However, non-neuronal cell migration is similar on both control and estrogen-treated substrates, suggesting that non-neuronal cells are less responsive than neurites to estrogen-induced changes in the composition or architecture of the underlying substrate.

Estrogen reduces sympathetic neurite outgrowth on endometrial tissue sections

As adult rat endometrium is poorly innervated by sympathetic nerves (Papka et al. 1985), an unexpected finding of the present investigation is the observation that endometrial sections from control ovariectomized rats support extensive sympathetic neurite outgrowth. Interestingly, the growth of neurites on control endometrial sections takes the form of radially symmetric halos that closely resemble those formed on collagen-coated dishes (without tissue sections). This indicates that neurite growth is not influenced by any particular feature in the underlying endometrial section. However, the possibility that the substantial amount of neurites present on the section masks interactions with particular structures present in the substrate cannot be presently disregarded. The formation of an extensive neuritic halo on control endometrial sections suggests the presence of permissive substrate-associated signals. The presence of collagen type I and type IV and of laminin and fibronectin associated with the endometrial stroma and epithelial/glandular basal membranes (Shynlova et al. 2004) are consistent with this conclusion. However, on the assumption that the endometrium provides a permissive substrate, such permissiveness contrasts with the natural sparseness of endogenous sympathetic nerves in the adult rat endometrium. The lack of significant innervation in the endometrium might be explained by other factors. These may include diffusible inhibitory/chemorepulsive signals, which, in the living tissue, could override the permissiveness provided by the endometrial substrate. In addition, the uneven distribution of NGF observed in the rat myometrium and endometrium in vivo (Chalar et al. 2003) could also bias growth of sympathetic nerves toward the myometrium in vivo.

Neurite outgrowth, but not non-neuronal cell migration, is markedly diminished on estrogenized endometrial tissue sections. Interestingly, neurite outgrowth is specifically inhibited on the endometrial stroma but continues to occur in association with the basal lamina of endometrial epithelium and glands. These results suggest that, under the influence of estrogen, the endometrial stroma produces inhibitory signals for sympathetic nerves, whereas epithelial basal laminae retain their ability to support neuritic growth. The relatively recent finding of an abnormal presence of sympathetic and other nerves in eutopic endometrium and ectopic endometriotic growths in women with endometriosis (Tokushige et al. 2006, 2007) and in ectopic cysts of rats with experimental endometriosis (Berkley et al. 2004, 2007) have increased the relevance of understanding in detail the mechanisms regulating the innervation of the endometrium and its responses to estrogen. Recent studies have demonstrated that increased levels of NGF and other

trophic molecules contribute to the abnormal innervation observed in eutopic endometrium and ectopic endometriotic growths in women with endometriosis (Anaf et al. 2002; Tokushige et al. 2006). In this context, the present cryoculture results may pose interesting questions about the contribution of substrate-bound signals to the regulation of endometrial innervation under normal and estrogen-associated pathological conditions.

Possible nature of substrate-bound signals contributing to pattern of sympathetic nerves and inhibition of their growth on estrogenized myometrial tissue sections

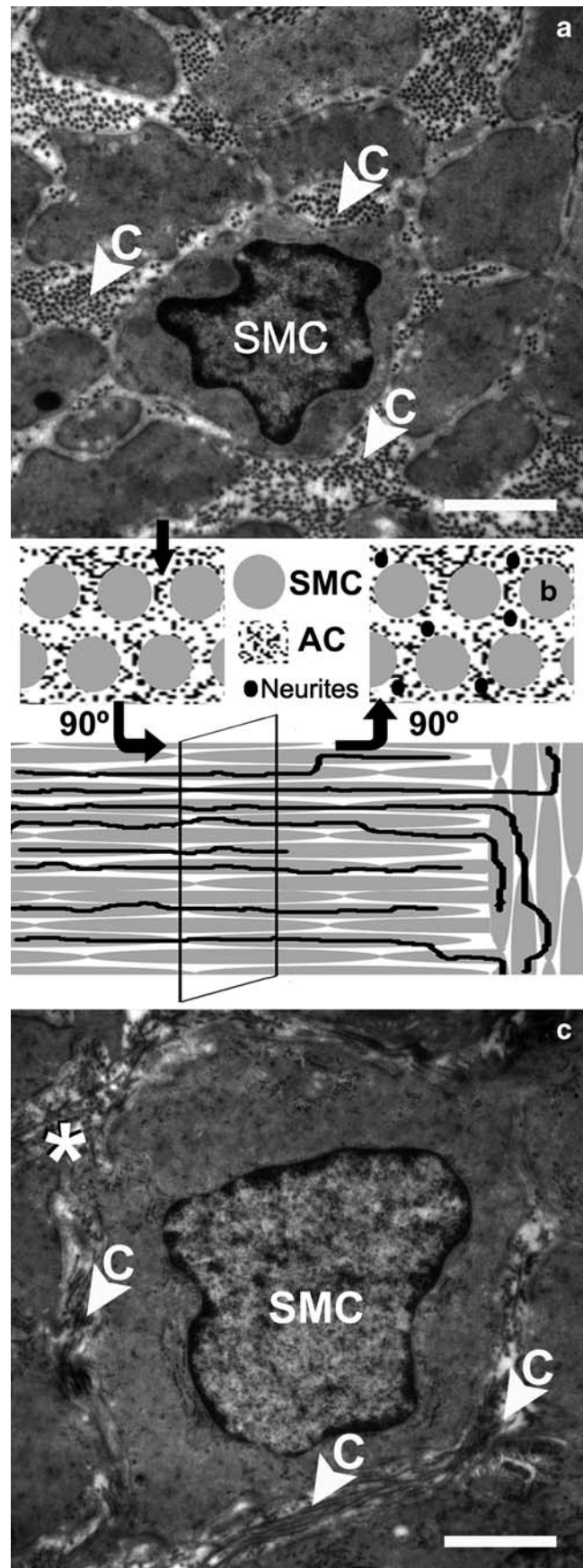
In our culture studies, we have observed that neurites grow closely associated to myometrial smooth muscle cells. This observation is consistent with previous studies showing that neurites from embryonic chick ciliary ganglia plated on cryostat sections of adult rat kidney and skeletal muscle preferentially grow along the sectioned surfaces of renal tubules and muscle fibers (Covault et al. 1987). The preferential association indicates that growing neurites interact with specific molecules present in the cell membranes and/or surrounding basal lamina. Several components of the extracellular matrix (ECM) and basal lamina have been shown to support and stimulate neurite outgrowth (Hou et al. 2008). In addition, basement membranes serve as reservoirs of several neurotrophic factors, including NGF.

The ECM and basement membranes surrounding myometrial smooth muscle cells contain several adhesion molecules, such as laminin, fibronectin, and collagen (Shynlova et al. 2004). Laminin and fibronectin, when presented as substrata and in tissue section culture experiments, stimulate the outgrowth of various classes of axons (Hynds and Snow 2001). Collagen is an ECM protein widely employed for neural cultures, either as a substrate or forming three-dimensional collagen gels. Interestingly, collagen alignment has been shown to affect the extent of neurite growth. For example, magnetically aligned type I collagen gel has been shown to direct the invasion of neurites and Schwann cells from dorsal root ganglia cultured on the gel surface and, consequently, increases the depth of invasion relative to control collagen gel (highly hydrated collagen matrix). This enhancement has been attributed to the contact guidance response of the growth cones to the aligned collagen fibrils (Dubey et al. 1999). Moreover, magnetically aligned collagen gel filling a collagen nerve guide has been shown to improve peripheral nerve regeneration (Ceballos et al. 1999). In agreement with these concepts, preliminary electron-microscopic studies by our group (Martínez et al. 2009) have shown that, in control ovariectomized rats, collagen fibrils in the ECM surrounding myometrial fibers are highly aligned and

follow the direction of the main axis of the smooth muscle cells (Fig. 10a). This particular collagen alignment might therefore contribute to the particular patterning of growing neurites on myometrial tissue sections (Fig. 10b).

The factors determining the decreased permissiveness of estrogenized myometrium to sympathetic fibers are unknown. In the uterus, major structural and biochemical alterations in the ECM and basal lamina of smooth muscle cells have been shown to occur under the influence of sex hormones (Ross and Klebanoff 1971; Munakata et al. 1984; Cidadão et al. 1990; Borel 1991) and during pregnancy (Nishinaka and Fukuda 1991; Stewart et al. 1995; Slater and Murphy 1999; Shynlova et al. 2004). These alterations in the ECM may therefore affect the receptivity of the uterus to growing axons. In our preliminary electron-microscopic studies, we have observed that, following estrogen treatment of adult OVX rats, the collagen alignment in ECM surrounding the myometrial fibers is different from that in controls. In treated animals, collagen fibrils are mainly oriented perpendicular to the smooth muscle cells long axis (Fig. 10c) and, on occasions, show a random orientation not attributable to the plane of sectioning. Changes in collagen alignment might have a negative impact on the ability of the myometrial sections to support sympathetic neuritic growth. However, the significance of these changes remains to be evaluated. Finally, we should consider that substrate-associated signals might also involve molecules other than those composing the ECM and might include transmembrane and membrane-anchored molecules, plus diffusible factors that, *in vivo*, have been shown to be largely bound to tissues and matrix. Further studies will be required to identify the nature of the substrate-bound signals contributing to the regulated sympathetic neurodegeneration elicited by estrogen in the uterus. The finding that such tissue properties are conserved in tissue section culture method provides an opportunity to study this phenomenon in greater detail.

Fig. 10 Alignment of myometrial collagen. Representative conventional transmission electron-microscopic images (glutaraldehyde/osmium tetroxide fixation) of a transverse section of the longitudinal myometrial layer of the rat uterine horn at 3 days following ovariectomy (**a**) and 10 days following ovariectomy plus estrogen replacement (**c**). Note that, in controls, collagen fibrils (**C**) in the extracellular matrix surrounding myometrial smooth muscle cells (**SMC**) are highly aligned and oriented following the direction of the muscle main axis (represented in **b**, upper left; **AC** aligned collagen). This axis is also followed *in vitro* by sympathetic neurites on myometrial tissue sections (represented in **b**, bottom, upper right). In estrogen-treated animals, collagen fibrils are mainly oriented perpendicular to the smooth muscle cells long axis and, in some regions, show a less aligned distribution (*star*), which cannot be explained by the plane of sectioning. Bars 2 μ m



Acknowledgements Special thanks are extended to Dr. Fernanda Blasina, Lucía Vaamonde, and the staff of the Neurochemistry Department (IIBCE) for their technical assistance and valuable suggestions. The technical support and electron micrographs provided by Gaby Martínez and Patricia Silveira are greatly appreciated. Critical reading of the manuscript by Professor Timothy Cowen and Dr. David Pettigrew is gratefully acknowledged.

References

- Adolfsson PI, Huang I, Berg G, Svensson SPS (2000) Changes in $\beta 2$ -adrenoceptors expression and in adenylyl cyclase and phosphodiesterase activity in human uterine leiomyomas. *Mol Hum Reprod* 6:835–842
- Akira S, Iwasaki N, Ichikawa M, Mine K, Kuwabara Y, Takeshita T, Tajima H (2009) Successful long-term management of adenomyosis associated with deep thrombosis by low-dose gonadotropin-releasing hormone agonist therapy. *Clin Exp Obstet Gynecol* 36:123–125
- Anaf V, Simon P, Nakadi I, Fay I, Simonart T, Buxant F, Noel JC (2002) Hyperalgesia, nerve infiltration and nerve growth factor expression in deep adenomyotic nodules, peritoneal and ovarian endometriosis. *Hum Reprod* 17:1895–1900
- Anton E, Weskamp G, Reichardt LF, Matthew WD (1994) Nerve growth factor and its low-affinity receptor promotes Schwann cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2795–2799
- Berkley KJ, Dmitrieva N, Curtis KS, Papka RE (2004) Innervation of ectopic endometrium in a rat model of endometriosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11094–11098
- Berkley KJ, McAllister SL, Accius BE, Winnard KP (2007) Endometriosis-induced vaginal hyperalgesia in the rat: effect of estropause, ovariectomy, and estradiol replacement. *Pain* 132:S150–S159
- Bianchimano P, Richeri A, Blasina F, Vaamonde L, Crutcher K, Brauer MM (2008) Substrate contributes to patterning of uterine sympathetic nerves (abstract). 4th International Meeting of the Latin American Society of Developmental Biology. Buenos Aires, Argentina, p 25
- Borel JP (1991) Uterine collagens. General review. *Rev Fr Gynecol Obstet* 86:715–722
- Brauer MM (2008) Cellular and molecular mechanisms underlying plasticity in uterine sympathetic nerves. *Auton Neurosci* 140:1–16
- Brauer MM, Burnstock G, Thrasivoulou C, Cowen T (1998) In oculo transplants of myometrium from postpartum guinea pigs fail to support sympathetic reinnervation. *J Anat* 193:509–517
- Brauer MM, Chávez R, Llodrá J, Richeri A, Scorza C (2000) Effects of chronic oestrogen treatment are not selective for uterine noradrenaline-containing sympathetic nerves: a transplantation study. *J Anat* 196:347–355
- Brauer MM, Chávez-Genaro R, Richeri A, Viettro L, Frias AI, Burnstock G, Cowen T (2002) The oestrogenized rat myometrium inhibits organotypic sympathetic reinnervation. *Auton Neurosci* 101:13–22
- Chalar C, Richeri A, Viettro L, Chávez-Genaro R, Bianchimano P, Marmol NM, Crutcher K, Burnstock G, Cowen T, Brauer MM (2003) Plasticity in developing rat uterine sensory nerves: the role of NGF and TrkA. *Cell Tissue Res* 314:191–205
- Chávez-Genaro R, Crutcher K, Viettro L, Richeri A, Coirolo N, Burnstock G, Cowen T, Brauer MM (2002) Differential effects of estrogen on developing and mature uterine sympathetic nerves. *Cell Tissue Res* 308:61–73
- Ceballos D, Navarro X, Dubey N, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR, Tranquillo RT (1999) Magnetically aligned collagen gel filling a collagen nerve guide improves peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 158:290–300
- Cidadão AJ, Thorsteinsdóttir S, David-Ferreira JF (1990) Immunocytochemical study of tissue distribution and hormonal control of chondroitin-, dermatan- and keratan sulfates from rodent uterus. *Eur J Cell Biol* 52:105–116
- Covault J, Cunningham JM, Sanes JR (1987) Neurite outgrowth on cryostat tissue sections of innervated and denervated skeletal muscle. *J Cell Biol* 105:2479–2488
- Crutcher KA (1993) Tissue sections as culture substrates: overview and critique. *Hippocampus* 3:157–164
- Crutcher KA, Jayasinghe C, Yun YH, Shanov VN (2009) Progress in the use of aligned carbon nanotubes to support neuronal attachment and directional neurite growth. In: Schulz MJ, Shanov VN (ed) *Nanomedicine materials, devices, and systems*. Artech House, Boston London, pp 187–207
- Damon DH (2006) Vascular endothelial-derived semaphorin 3 inhibits sympathetic axon growth. *Am J Physiol Heart Physiol* 290: H1220–H1225
- Dubey N, Letourneau PC, Tranquillo RT (1999) Guided neurite elongation and Schwann cell invasion into magnetically aligned collagen in simulated peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 158:338–350
- Gavazzi I, Boyle KS, Cowen T (1996) Extracellular matrix molecules influence innervation density in rat cerebral blood vessels. *Brain Res* 734:167–174
- Hill CE, Chamley JH, Burnstock G (1974) Cell surfaces and fibre relationships in sympathetic ganglion cultures: a scanning electron-microscopic study. *J Cell Sci* 14:657–669
- Hou ST, Jiang SX, Smith RA (2008) Permissive and repulsive cues and signaling pathways of axonal outgrowth and regeneration. *Int Rev Cell Mol Biol* 267:125–181
- Houdeau E, Rousseau A, Meusnier C, Prud'homme MJ, Rousseau JP (1998) Sympathetic innervation of the upper and lower regions of the uterus and cervix in the rat has different origins and routes. *J Comp Neurol* 399:403–412
- Hynds DL, Snow DM (2001) Fibronectin and laminin elicit differential behaviors from SH-SY5Y growth cones contacting inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans. *J Neurosci Res* 66:630–642
- Krizsan-Agbas D, Smith PG (2002) Estrogen modulates myometrium-induced sympathetic neurite formation through actions on target and ganglion. *Neuroscience* 114:339–347
- Krizsan-Agbas D, Pedchenko T, Hassan W, Smith PG (2003) Estrogen regulates sympathetic neurite outgrowth by modulating brain-derived neurotrophic factor synthesis and release by the rodent uterus. *Eur J Neurosci* 18:2760–2768
- Krizsan-Agbas D, Pedchenko T, Smith PG (2008) Neurotrimin is an estrogen-regulated determinant of peripheral sympathetic innervation. *J Neurosci Res* 86:3086–3095
- Li GN, Liu J, Hoffman-Kim D (2008) Multi-molecular gradients of permissive and inhibitory cues direct neurite outgrowth. *Ann Biomed Eng* 36:889–904
- Lobos E, Gebhardt C, Kluge A, Spanel-Borowski K (2005) Expression of nerve growth factor (NGF) isoforms in the rat uterus during pregnancy: accumulation of precursor proNGF. *Endocrinology* 146:1922–1929
- Mark K von der, Park J, Bauer S, Schmuki P (2010) Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix. *Cell Tissue Res* 339:131–153
- Martínez G, Silveira P, Bianchimano P, Richeri A, Brauer MM (2009) El estrógeno reduce la capacidad neuritogénica del sustrato uterino. Papel de la geometría del colágeno (abstract). *Sextas Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular*, Montevideo, Uruguay, p 75
- Marzioni D, Tamagnone L, Capparuccia L, Marchini C, Amici A, Todros T, Bischof P, Neidhart S, Grenningloh G, Castellucci M

- (2004) Restricted innervation of uterus and placenta during pregnancy: evidence for a role of the repelling signal semaphorin 3A. *Dev Dyn* 231:839–848
- Medina MG, Lebovic DI (2009) Endometriosis-associated nerve fibers and pain. *Acta Obstet Gynecol Scand* 88:968–975
- Munakata H, Isemura M, Yosizawa Z (1984) Sulfated proteoglycans synthesized in myometrium of the estrogen-treated rabbit. *Tohoku J Exp Med* 144:291–297
- Nishinaka K, Fukuda Y (1991) Changes in extracellular matrix materials in the uterine myometrium of rats during pregnancy and postparturition. *Acta Pathol Jpn* 41:122–132
- Orike N, Thrasivoulou C, Wrigley A, Cowen T (2001) Differential regulation of survival and growth in adult sympathetic neurons: an in vitro study of neurotrophin responsiveness. *J Neurobiol* 47:295–305
- Papka RE, Cotton JP, Traurig HH (1985) Comparative distribution of neuropeptide tyrosine-, vasoactive intestinal polypeptide-, substance P-immunoreactive, acetylcholinesterase-positive and noradrenergic nerves in the reproductive tract of the female rat. *Cell Tissue Res* 242:475–490
- Pettigrew DB, Crutcher KA (1999) White matter of the CNS supports or inhibits neurite outgrowth in vitro depending on geometry. *J Neurosci* 19:8358–8366
- Pettigrew DB, Crutcher KA (2001) Myelin contributes to the parallel orientation of axonal growth on white matter in vitro. *BMC Neurosci* 2:9
- Pettigrew DB, Shockely KP, Crutcher KA (2001) Disruption of spinal cord white matter and sciatic nerve geometry inhibits axonal growth in vitro in the absence of glial scarring. *BMC Neurosci* 2:8
- Quinn M (2007a) Uterine innervation in adenomyosis. *J Obstet Gynaecol* 27:287–291
- Quinn M (2007b) Uterine innervation in fibroids: a qualitative study. *J Obstet Gynaecol* 27:489–492
- Richeri A, Bianchimano P, Mármol NM, Vietto L, Cowen T, Brauer MM (2005) Plasticity in rat uterine sympathetic nerves: the role of TrkA and p75 nerve growth factor receptors. *J Anat* 207:125–134
- Richeri A, Chalar C, Bianchimano P, Greif G, Brauer MM (2008) Estrogen regulation of semaphorin expression in the rat uterus (abstract). *EMBO Workshop Semaphorin Function and Mechanisms of Action*. Abbaye des Vaux de Cernay, France
- Ross R, Klebanoff SJ (1971) The smooth muscle cell. 1. In vivo synthesis of connective tissue proteins. *J Cell Biol* 50:159–171
- Rydhström H, Walles B, Owman C (1989) Myometrial norepinephrine in human pregnancy—abnormally elevated levels at term related to various disorders leading to Cesarean section. *Am J Reprod Med* 34:901–904
- Shynlova O, Mitchell JA, Tsampalieros A, Langille AL, Lye SJ (2004) Progesterone and gravidity differentially regulate expression of extracellular matrix components in the pregnant rat myometrium. *Biol Reprod* 70:986–992
- Slater M, Murphy CR (1999) Chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans are sequentially expressed in the uterine extracellular matrix during early pregnancy in the rat. *Matrix Biol* 18:125–131
- Snow DM, Smith JD, Gurwell JA (2002) Binding characteristics of chondroitin sulphate proteoglycans and laminin-1, and correlative neurite outgrowth behaviors in standard tissue culture assays. *J Neurobiol* 51:285–301
- Stein K, Ascher-Walsh C (2009) A comprehensive approach to the treatment of uterine leiomyomata. *Mt Sinai J Med* 76:546–556
- Stewart EA, Floor AE, Jain P, Nowak RA (1995) Increased expression of messenger RNA for collagen type I, collagen type II, and fibronectin in myometrium of pregnancy. *Obstet Gynecol* 86:417–422
- Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS (2006) Nerve fibres in peritoneal endometriosis. *Hum Reprod* 21:3001–3007
- Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS (2007) Different types of small nerve fibers in eutopic endometrium and myometrium in women with endometriosis. *Fertil Steril* 88:795–803
- Tuttle R, Matthew WD (1991) An in vitro assay for neurite growth using cryostat sections of nervous tissue as substratum. *J Neurosci Methods* 39:193–202
- Vera PL, Haase EB, Schramm LP (1997) Origins of the sympathetic innervation of the cervical end of the uterus in the rat. *Brain Res* 747:140–143
- Vercellini P, Somigliana E, Viganò P, Abbiati A, Barbara G, Crosignani PG (2009) Endometriosis: current therapies and new pharmacological developments. *Drugs* 69:649–675
- Zoubina EV, Smith PG (2001) Sympathetic hyperinnervation of the uterus in the estrogen receptor alpha knock-out mouse. *Neuroscience* 103:237–244
- Zoubina EV, Fan Q, Smith PG (1998) Variation in uterine innervation during the estrous cycle. *J Comp Neurol* 397:561–571
- Zoubina EV, Mize AL, Alper RH, Smith PG (2001) Acute and chronic oestrogen supplementation decreases uterine sympathetic innervation in ovariectomised adult virgin rats. *Histol Histopathol* 16:989–996



Contents lists available at ScienceDirect

Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical

journal homepage: www.elsevier.com/locate/autneu

Estrogen-induced collagen reorientation correlates with sympathetic denervation of the rat myometrium

G.F. Martínez, P. Bianchimano, M.M. Brauer *

Laboratory of Cell Biology, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 April 2016

Received in revised form 8 September 2016

Accepted 9 September 2016

Available online xxxx

Keywords:

Autonomic

Plasticity

Electron microscopy

Cryoculture

Tendon

ABSTRACT

Estrogen inhibits the growth and causes the degeneration (pruning) of sympathetic nerves supplying the rat myometrium. Previous cryoculture studies evidenced that substrate-bound signals contribute to diminish the ability of the estrogenized myometrium to support sympathetic nerve growth. Using electron microscopy, here we examined neurite-substrate interactions in myometrial cryocultures, observing that neurites grew associated to collagen fibrils present in the surface of the underlying cryosection. In addition, we assessed quantitatively the effects of estrogen on myometrial collagen organization in situ, using ovariectomized rats treated with estrogen and immature females undergoing puberty. Under low estrogen levels, most collagen fibrils were oriented in parallel to the muscle long axis (83% and 85%, respectively). Following estrogen treatment, 89% of fibrils was oriented perpendicularly to the muscle main axis; while after puberty, 57% of fibrils acquired this orientation. Immunohistochemistry combined with histology revealed that the vast majority of fine sympathetic nerve fibers supplying the myometrium courses within the areas where collagen realignment was observed. Finally, to assess whether depending on their orientation collagen fibrils can promote or inhibit neurite outgrowth, we employed cryocultures, now using as substrate tissue sections of rat-tail tendon. We observed that neurites grew extensively in the direction of the parallel-aligned collagen fibrils in the tendon main axis but were inhibited to grow perpendicularly to this axis. Collectively, these findings support the hypothesis that collagen reorientation may be one of the factors contributing to diminish the neuritogenic capacity of the estrogen-primed myometrial substrate.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Estrogen inhibits the growth and causes the degeneration (pruning) of sympathetic nerve fibers supplying the uterine smooth muscle (myometrium). These effects of estrogen are driven by changes in the ability of myometrium to support its sympathetic innervation. Moreover, evidences indicate that this plasticity is regulated by a complex multifactorial mechanism, involving a range of target-derived molecular signals with negative effects on sympathetic nerves (Brauer and Smith, 2015; Brauer, 2016).

In a previous study, we assessed the contribution of substrate-bound signals to the reduced neuritogenic capacity of the estrogenized myometrium using the tissue section culture method (cryoculture), (reviewed in Crutcher, 1993). In our studies, cryocultures consisted in culturing rat sympathetic ganglion explants on frozen tissue sections

of rat myometrial longitudinal layer (Richeri et al., 2010; Brauer and Smith, 2015). The main outcomes of this investigation were that: (a) growing neurites preferentially followed the orientation of the main axis of the longitudinally sectioned smooth muscle; (b) neurites grew closely associated to the muscle bundles and generally avoided the areas of the section occupied by the connective tissue separating bundles; and (c) neurite outgrowth was markedly inhibited on myometrial sections from rats treated with estrogen. These results were interpreted to suggest that neurite growth was deeply influenced by features of the underlying tissue section; and that estrogen modifies myometrial substrate properties, so that it is less supportive for sympathetic neurite growth.

The mechanisms underlying the stereotyped growth of neurites on myometrial tissue sections and the reduced neuritogenic capacity of the estrogenized myometrial substrate are largely unknown. Preliminary observations, led us to the hypothesis that alterations in the spatial orientation of collagen fibrils might be involved (Martínez et al., 2009; Richeri et al., 2010). To further explore this hypothesis; in the present study we analyzed: (a) the nature of neurite-myometrial substrate interactions in cryoculture using transmission electron microscopy; (b) the extent of collagen rearrangements in situ, using as models

Abbreviations: ECM, extracellular matrix; LML, longitudinal myometrial layer; OVX, ovariectomized; SMCs, smooth muscle cells.

* Corresponding author at: Laboratory of Cell Biology, IIBCE, Avenida Italia 3318, Montevideo 11600, Uruguay.

E-mail address: brauer2009@gmail.com (M.M. Brauer).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2016.09.001>

1566-0702/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article as: Martínez, G.F., et al., Estrogen-induced collagen reorientation correlates with sympathetic denervation of the rat myometrium, *Auton. Neurosci.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2016.09.001>

adult OVX rats treated with estrogen (Zoubina et al., 2001) and immature rats undergoing natural puberty (Brauer et al., 1992); (c) whether *in situ*, changes in collagen orientation occurs in the areas of myometrium where sympathetic nerves distribute; and (d) the relevance of collagen alignment on the patterning and extent of sympathetic neurite outgrowth employing cryocultures where frozen tissue sections of rat-tail tendon were used as substrate.

We believe that these studies will add to the understanding of the nature of target-derived signals regulating plasticity in uterine sympathetic nerves. A better understanding of these mechanisms has gained relevance due to increasing evidences showing alterations in uterine nerves in different estrogen-regulated gynecological diseases (Brauer and Smith, 2015; Brauer, 2016).

2. Materials and methods

2.1. Animals and treatments

Studies were conducted on female Wistar-derived albino rats from the breeding colony held at the Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE, Montevideo, Uruguay). Animals were sexed at birth, weaned at 3 weeks and maintained under controlled conditions of temperature (21–22 °C) and illumination (12 h light/dark cycles) with water and food provided *ad libitum*. All animal procedures were conducted in accordance with standards of the Ethics Committee on the Use of Laboratory Animals (CEUA-IIBCE) regulated by the National Law No. 18611.

2.1.1. Ovariectomy and estrogen treatment

Adult rats (10 weeks old) were anesthetized with 90 mg/kg ketamine (Unimedical, Uruguay) plus 10 mg/kg xylazine (Unimedical) and bilaterally ovariectomized through two small incisions in the lumbar region. Ovariectomized rats were treated with three subcutaneous injections of 50 µg of β -estradiol 17-cypionate (Laboratorios König, Argentina) given on days 5, 7, and 9 following surgery and euthanized on day 10. Control animals were treated with vehicle (peanut oil; Sigma-Aldrich, USA).

2.1.2. Pubertal transition

Prepubertal animals were euthanized before the occurrence of vaginal canalization. Pubertal rats were euthanized at the first estrus following vaginal canalization, as determined by vaginal cytology (Brauer et al., 1992).

2.1.3. Treatment with 5-hydroxydopamine

Prepubertal females were injected intraperitoneally with 100 mg/Kg of 5-hydroxy-dopamine (Sigma-Aldrich) diluted in saline solution containing 0.2% ascorbic acid and euthanized 20 h after treatment (Tranzer and Thoenen 1967; Knight 1980).

2.2. Cryocultures

Cryocultures were carried out as previously described (Richeri et al., 2010), using as substrate frozen tissue sections of the longitudinal myometrial layer (LML) or rat-tail tendon, both from adult OVX rats. Briefly, the uterine horns were removed under aseptic conditions, opened longitudinally and flat-mounted onto pre-cooled cryostat chucks. For the preparation of tendon tissue blocks, isolated rat-tail tendons were cut in 1-cm-long fragments and placed parallel to each other in flat bullet-shaped embedding molds (Sigma-Aldrich, USA: Cat. N° E4390) filled with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/F12, Sigma-Aldrich). When the mold cavity was filled with tendon fragments, the excess of liquid was removed and tissues allowed freezing at -20°C . Cryostat tissue sections (14 µm thick) of myometrium or tendon blocks were thaw-mounted onto the bottom of 35-mm untreated plastic tissue-culture dishes (Falcon BD, USA).

Superior cervical ganglia from neonatal female rats (3–5 days old) were removed, freed from connective tissue and dissected into explants (500–600 µm in diameter). Each explant was placed on top of a tissue sections (Fig. 1a). Cultures were grown for three days in serum-free Neurobasal medium (Gibco, Invitrogen, USA) supplemented with 2% B-27 (Gibco, Invitrogen), 0.5 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich), 1% antibiotics (Gibco, Invitrogen) and 0.5 ng/ml NGF (Harlan Bioproducts for Science, USA).

In rat-tail tendon cryocultures, neurites were demonstrated with a fluorescent vital dye (5-carboxyfluorescein diacetate, acetoxymethyl ester; Molecular Probes, Invitrogen) for 1.5 h and examined under a Nikon E800 fluorescence microscope. Images were captured using a CoolSNAP-Pro Monochrome Digital camera with Image ProPlus software (Media Cybernetics, USA), (Richeri et al., 2010). In cryocultures carried out on myometrial tissue sections, neurite outgrowth was assessed by contrast phase microscopy and cultures fixed and processed for transmission electron microscopy (TEM) as detailed below.

2.3. Electron microscopy

2.3.1. Studies on myometrial cryocultures

Cultures were fixed for 5 min in 0.5% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich) diluted in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.2) at room temperature (to reduce neurite retraction) followed by 2.5% glutaraldehyde for 1 h at 4 °C. After washing in PB, tissues were post-fixed in 1% osmium tetroxide (Sigma-Aldrich), dehydrated in alcohol series and embedded in Epon (Fluka, USA). Ultrathin sections, transverse to the direction of both the smooth muscle main axis and growing neurites were obtained (Fig. 1b, c), stained with uranyl acetate and lead citrate and examined under a Jeol 100CXII TEM operated at 60 kV.

2.3.2. Studies on myometrium *in situ*

Uteri of adult OVX rats treated with estrogen or vehicle; and prepubertal and pubertal females were removed and freed from fat and connective tissue. From each uterine horn, two pieces of the middle region were dissected and fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde diluted in PB for 24 h at 4 °C. After washing, tissues were post-fixed in 1% osmium tetroxide for 1.5 h at 4 °C, dehydrated in alcohol series and absolute acetone and embedded in Durcupam ACM (Fluka). Ultrathin sections, transverse to the longitudinal myometrial layer main axis, were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined under the TEM.

2.3.3. Quantitative assessment of collagen orientation

Changes in collagen organization were quantitatively evaluated on images of the interstitial ECM surrounding transversely-sectioned smooth muscle cells (SMCs) of the LML. Measurements were carried out on five images obtained from four different regions (depths) of each uterine horn (20 images per horn). All data obtained from each horn ($n = 6$) were averaged and used for statistical comparison. As illustrated in Fig. 2, the following parameters were measured: (a) percentage area of the total image occupied by smooth muscle cells and interstitial ECM, and further calculation of the ECM/smooth muscle ratio; (b) percentage area of the interstitial ECM occupied by collagen; and (c) percentage of the total collagen area represented by fibrils oriented parallel and non-parallel to the smooth muscle cells long axis.

2.4. Immunohistochemistry for sympathetic nerves and histology

Uterine horns from prepubertal rats ($n = 3$) were fixed by immersion in 4% PFA for 1.5 h at 4 °C, washed in phosphate-buffered saline (PBS), stored in 12% sucrose in PBS overnight at 4 °C and embedded in tissue freezing medium (Shandon, USA). Cryostat tissue sections (8 µm) were obtained at two different depths of the middle region of the uterine horns, separated for at least 2 mm. For the demonstration of sympathetic nerves, sections were thaw-mounted onto gelatin-coated glass slides and incubated overnight at room temperature in a humid chamber with

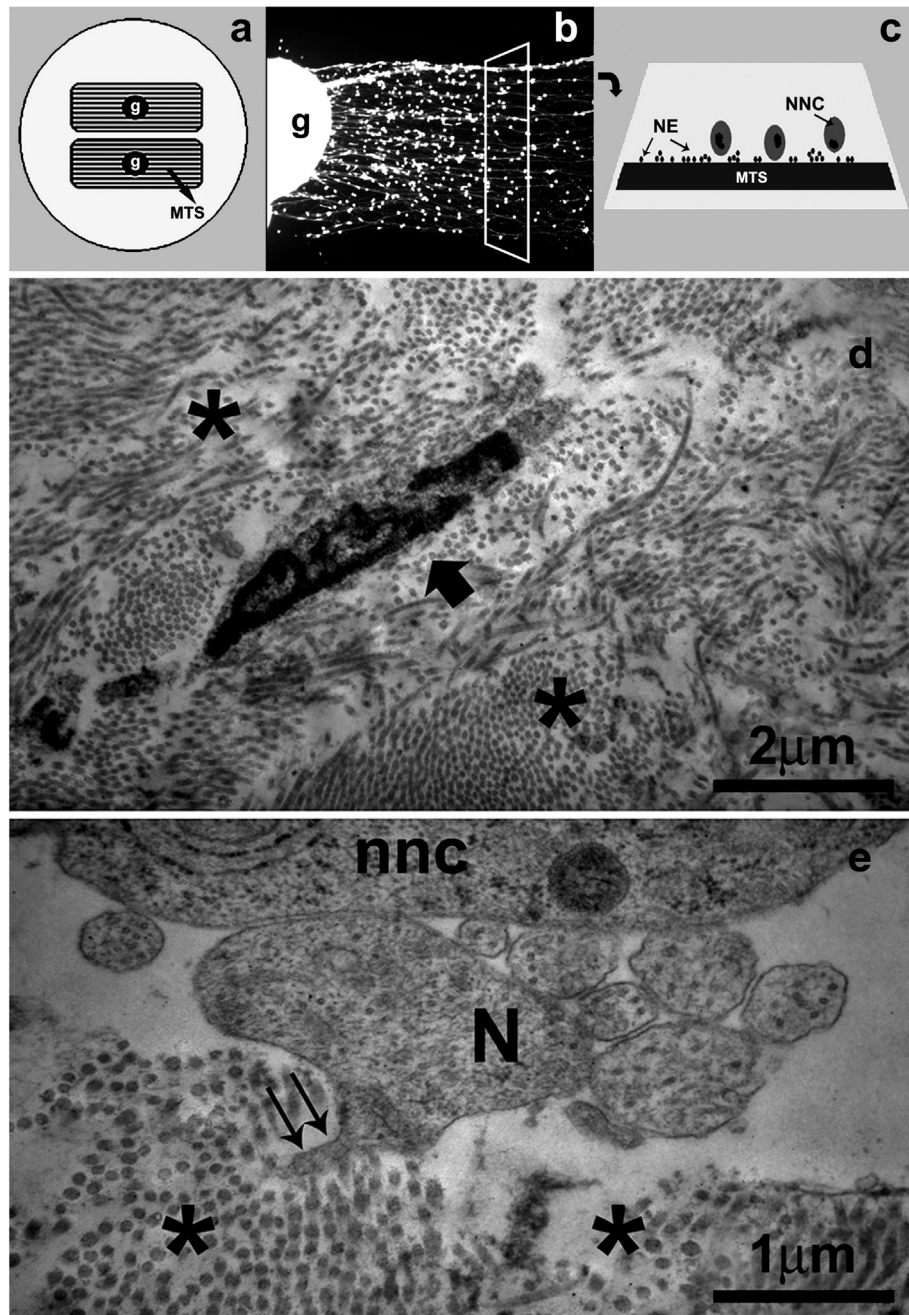


Fig. 1. (a) Diagram of a cryoculture illustrating superior cervical ganglion explants (g) seeded on unfixed frozen tissue sections of the rat longitudinal myometrial layer (LML). MTS, myometrial tissue section. (b) Representative cryoculture (vital dye) showing sympathetic neurites growing selectively in the direction of the main axis of the longitudinally sectioned myometrial muscle. The rectangular area indicates the plane at which ultrathin sections for electron microscopy were obtained. (c) Diagram of a transverse ultrathin section showing growing neurites (NE) and non-neuronal cells (NNC) on top of a myometrial cryosection. Panel d illustrates a representative image of a myometrial tissue section after three days in culture. Asterisks, collagen fibrils. Arrow, remains of a cell nucleus. Panel e, depicts groups of neurites (N) growing on highly aligned collagen fibrils present in the surface of a myometrial tissue section (asterisks). Double arrow points to close contacts between a neurite and the substrate. nnc, non-neuronal cell.

rabbit anti-tyrosine hydroxylase (anti-TH, final dilution 1:400; Pierce Biotechnology, USA). At the end of the incubation period, sections were washed in PBS and incubated for 1.5 h at room temperature with goat anti-rabbit IgG conjugated with FITC (final dilution 1:400; Chemicon, USA), washed in PBS, counterstained with 0.05% basic toluidine blue (Sigma), washed in PBS and mounted in antifade mountant (Citifluor, UK). Paired images of 4 different regions of each section of each uterine horn (2 per animal) were captured digitally: (a) fluorescence to visualize sympathetic nerves, and (b) bright field to assess histology. Images of sympathetic nerves were digitally over-imposed on histological images; and the number and diameter of axons associated with the muscle bundles or running in the inter-bundle connective tissue were assessed.

2.5. Statistics

Median values were compared using the Mann-Whitney non-parametric test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Neurite-substrate interactions in myometrial cryocultures

Electron microscopic examination of myometrial cryosections from adult OVX rats after three days in culture revealed large amounts of

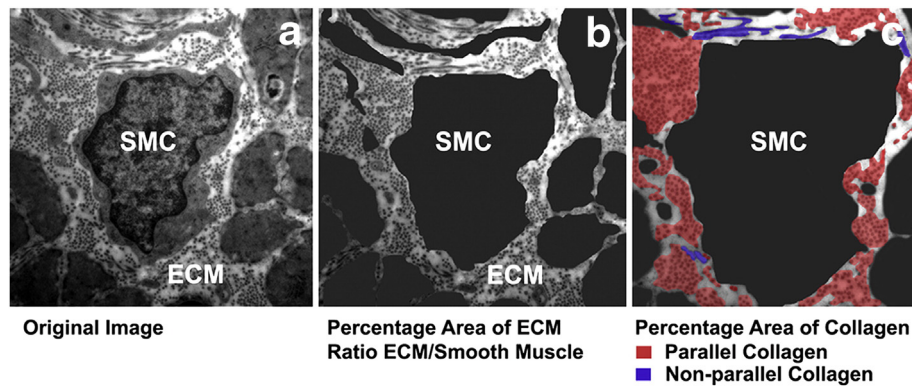


Fig. 2. Schematic representation of the quantitative morphometric method employed to assess: (a–b) the percentage area occupied by the smooth muscle cells (SMC) and the interstitial extracellular matrix (ECM), and to further calculate the ratio ECM/smooth muscle; and (c) the percentage area of the interstitial ECM occupied by total collagen, and the percentage area of total collagen represented by fibrils oriented parallel and non-parallel to the smooth muscle long axis.

collagen fibrils. These fibrils were highly aligned and mostly oriented perpendicularly to the plane of sectioning and parallel to the myometrial long axis. Only scattered nuclear profiles were observed, while other cellular components were not recognized (Fig. 1d). Growing neurites were seen in close contact and oriented in parallel with the collagen fibrils present in the surface of the underlying myometrial cryosection. Scattered non-neuronal cells were also recognized (Fig. 1e). Attempts to assess neurite-substrate interactions on

estrogen-primed myometrial substrates were unsuccessful due to the short length of neurites and the retraction provoked by fixation.

3.2. Effects of estrogen on collagen orientation in situ

3.2.1. Adult ovariectomized rats

In the longitudinal myometrial layer, collagen fibrils in the interstitial ECM surrounding individual SMCs were highly aligned and predominantly oriented parallel to their main axis (Fig. 3a). Quantitative studies showed that parallel-oriented collagen represented 83% of the area occupied by total collagen in the interstitial ECM (Fig. 3c). Following estrogen treatment, most collagen fibrils encircled SMCs and presented an orientation which was perpendicular to their long axis (Fig. 3b).

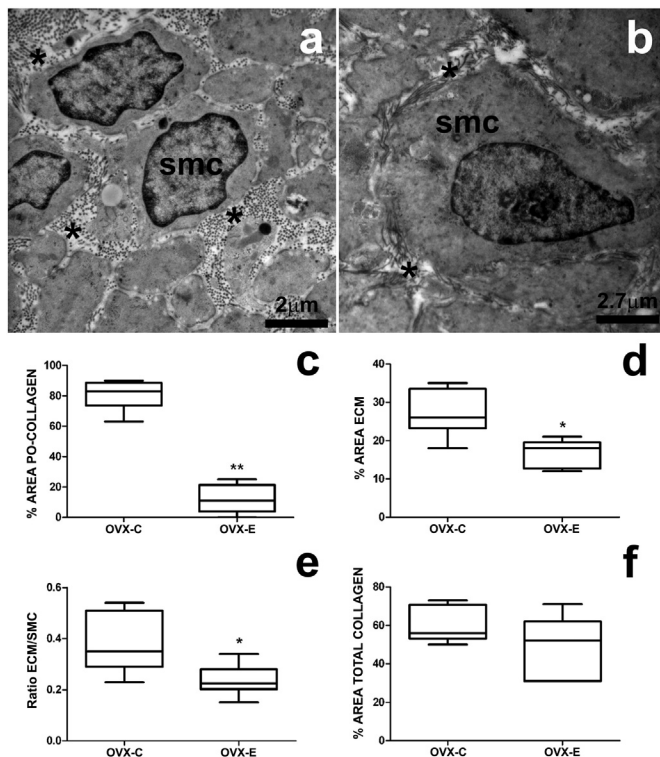


Fig. 3. Representative transmission electron-microscopic images of transverse sections of the longitudinal myometrial layer of the uterine horn from adult ovariectomized (OVX) rats treated with vehicle (a) or estrogen (b). Note that in OVX controls, collagen fibrils (asterisks) in the interstitial extracellular matrix surrounding individual myometrial smooth muscle cells (smc) are highly aligned and predominantly oriented following the direction of the muscle main axis. In estrogen-treated animals, collagen fibrils (asterisks) encircle smc, and are mainly oriented perpendicularly to the muscle long axis. Panels c–f summarize quantitative morphometric studies in OVX rats treated with vehicle (OVX-C) or estrogen (OVX-E). (c) Percentage area of total collagen occupied by fibrils oriented parallel to the smooth muscle long axis (PO-Collagen); (d) percentage area occupied by interstitial extracellular matrix (ECM); (e) ratio ECM/smooth muscle cells (ECM/SMC); and (f) percentage area occupied by total collagen. Median values were compared by the Mann-Whitney non-parametric test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

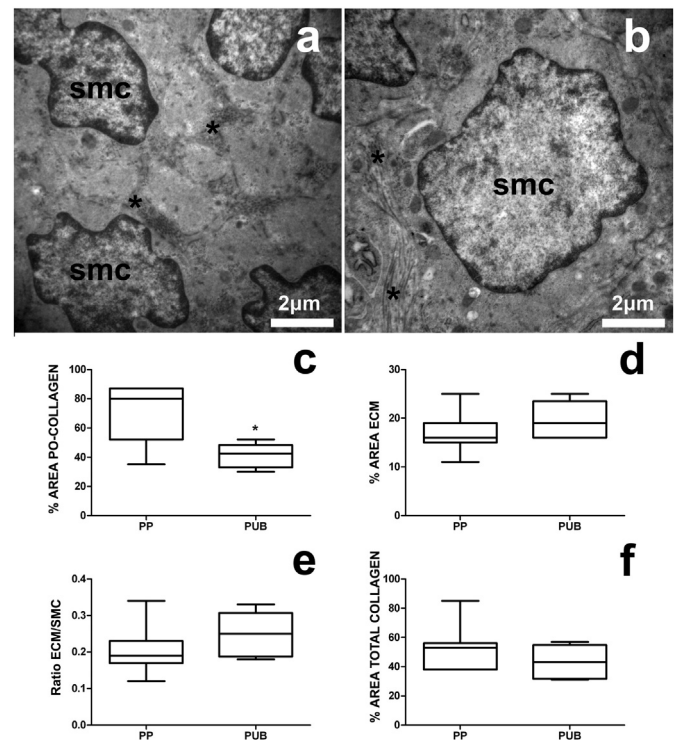


Fig. 4. Representative transmission electron-microscopic images of transverse sections of the longitudinal myometrial layer of the uterine horn from immature rats before (a) and after puberty (b). Asterisks, collagen fibrils. Panels c–f show respectively, quantitative data of: (c) percentage area of total collagen occupied by fibrils oriented parallel to the smooth muscle long axis (PO-Collagen); (d) percentage area occupied by interstitial extracellular matrix (ECM); (e) ratio ECM/smooth muscle cells (ECM/SMC); and (f) percentage area occupied by total collagen. Median values were compared by the Mann-Whitney non-parametric test; * $p < 0.05$.

Consistently, quantitative studies revealed that in estrogen-treated animals, only 11% of the total area occupied by collagen was represented by perpendicularly-oriented fibrils (Fig. 3c). Quantitative studies also showed that both the percentage area of interstitial ECM (Fig. 3d) and the ratio ECM/SMC (Fig. 3e) were significantly reduced in estrogen-treated rats. In contrast, the percentage area occupied by total collagen showed no-significant changes (Fig. 3f).

3.2.2. Puberty

In prepubertal animals, SMCs were densely packed and presented small intercellular spaces which were largely filled by highly aligned collagen fibrils (Fig. 4a). Quantitative assessment of collagen orientation showed that 85% of the area occupied by interstitial collagen was represented by fibrils which followed the orientation of the main axis of the SMCs (Fig. 4c). At the first estrous following puberty (Fig. 4b, c), this percentage was reduced to 43% while the remaining 57% was represented by collagen fibrils oriented perpendicularly to the muscle cell long axis or randomly arranged. No significant changes were elicited by puberty in the percentage area occupied by the interstitial ECM (Fig. 4d), the ECM/SMC ratio (Fig. 4e) or the percentage area occupied by total collagen (Fig. 4f).

3.3. Distribution of sympathetic nerves in the longitudinal myometrial layer of prepubertal rats

In prepubertal controls, a profuse sympathetic innervation was seen in the LML and associated to major intra-myometrial blood vessels (Fig. 5a). Quantitative studies showed that in the LML, an average of 96% of sympathetic axons were associated to the muscle bundles, and only 4% distributed in the connective tissue separating bundles (Fig. 5b, c). Within the connective tissue, the mean diameter of nerves was $2.99 \pm 0.4 \mu\text{m}$ (Mean $\pm$ SEM; $n = 6$ sections). Within the muscle bundles, an average of 65% of axons measured $<1.5 \mu\text{m}$ ($1 \pm 0.20 \mu\text{m}$); 29% ranged between 1.5 and $3 \mu\text{m}$ ($2.3 \pm 0.4 \mu\text{m}$) and 6% were over $3 \mu\text{m}$ ($3.9 \pm 1.1 \mu\text{m}$). Electron microscopy confirmed the presence of axon profiles presenting vesicles labeled by 5-OHDA running among highly aligned collagen fibrils surrounding cross-sectioned individual smooth muscle cells (Fig. 6).

3.4. Sympathetic nerve growth in cryocultures of rat-tail tendon

Sympathetic ganglion explants extended long neurites on longitudinal cryosections of rat-tail tendon. Neurites grew following the direction of the tendon main axis and did not grow perpendicularly to this

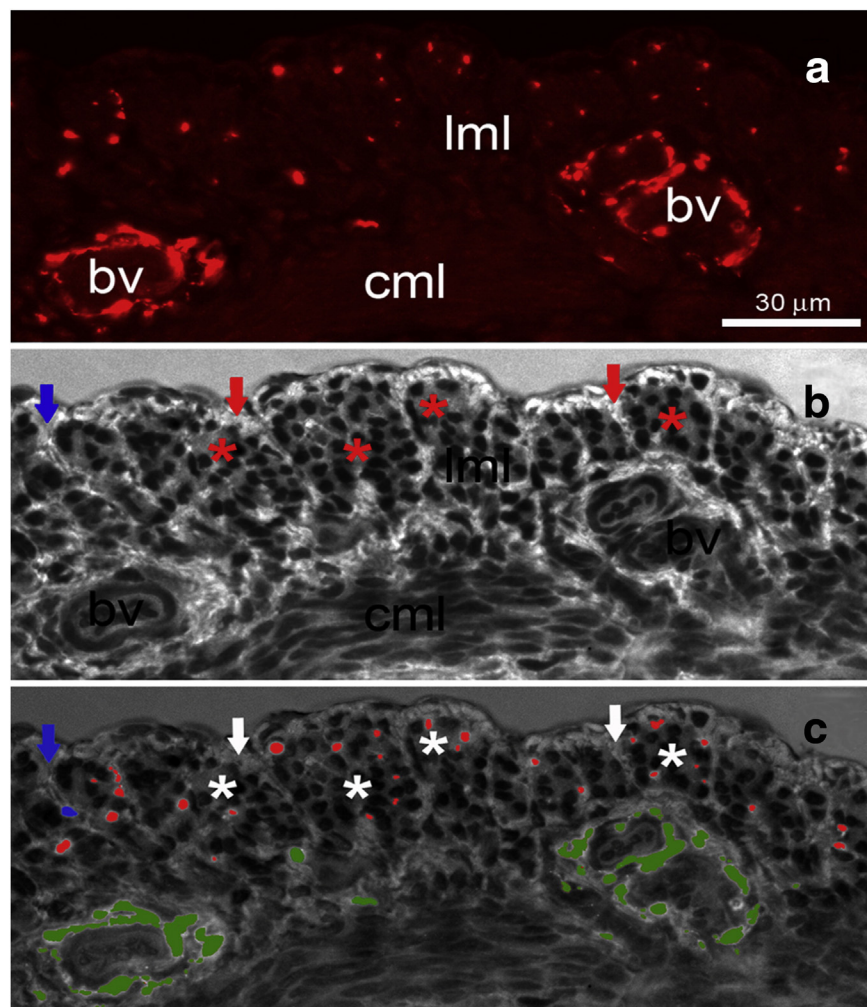


Fig. 5. Panel (a) illustrates a transverse cryostat tissue section of a prepubertal rat uterine horn immuno-labeled with anti-tyrosine hydroxylase for the demonstration of sympathetic nerves. Several nerve fibers are seen associated with the longitudinal myometrial layer (lml) and blood vessels (bv). cml, circular myometrial layer. Panel (b) shows a bright field image of the same area of the uterine tissue section stained with toluidine blue to assess the histology. Panel (c) shows the over-imposed image of panels a and b to assess the distribution of the sympathetic innervation. Note that most of sympathetic nerve fibers (red) distributes in the ECM surrounding muscle cells (asterisks) and only occasional fibers (blue) localize in the connective tissue spaces (arrows) separating muscle bundles. Perivascular sympathetic nerve bundles are shown in green. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

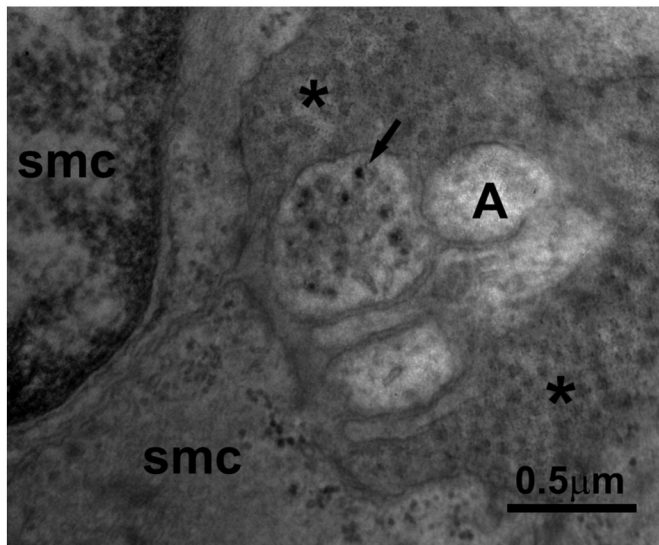


Fig. 6. Illustrates an electron microscopic image of sympathetic axons (A) labeled with the “false” neurotransmitter 5-hydroxydopamine (arrow) running in an aligned matrix of collagen fibrils (asterisks) and in close contact with two immature myometrial smooth muscle cells (smc) of the longitudinal myometrial layer of a prepubertal rat.

axis (Fig. 7a, b, b'). Moreover, when two adjacent tendon sections were placed at right angles, neurites were consistently unable to further progress their growth on the transversely-opposed tendon sections although they showed an extensive growth on the contralateral side (Fig. 7c). The scattered neurites that grew along the boundary between sections turned 90° to adapt their course to the new direction of collagen fibrils (Fig. 7c). On transversally-sectioned tendon, neurites grew following a meandering orientation (Fig. 7d, d') and occasionally, they bridged the space separating two adjacent tendon bundles (Fig. 7d, inset).

4. Discussion

Results from the current study showed that in situ, collagen fibrils in the interstitial extracellular matrix surrounding SMCs of prepubertal and adult OVX rats are highly aligned and predominantly oriented parallel to the muscle main axis. Physiological and experimental elevations in estrogen levels elicit the reorientation of collagen fibrils which become predominantly oriented perpendicular to the muscle long axis. The extent of changes observed following puberty was less prominent than that seen after estrogen supplementation to adult OVX rats. It is possible that differences in estrogen levels (physiological vs. supra-physiological) as well as in the length of exposure to the hormone (hours vs. days) may explain the different degree of changes observed.

Factors determining the reorientation of collagen fibrils are not clear at present. In the uterus, biosynthesis of type I collagen is under the positive control of estrogen, and collagen is synthesized and secreted by the estrogen-stimulated non-pregnant myometrial SMC (Ross and Klebanoff, 1971). Our current quantitative studies showed that neither estrogen treatment nor natural puberty affect the percentage area occupied by collagen fibrils in the interstitial ECM surrounding the individual SMCs. Since relative area occupied by collagen remains unchanged, a rise in collagen deposition would imply an increase in the number of collagen fibrils packed in a similar or even smaller extracellular space. If this were the case, this change might create mechanical forces leading to changes in collagen fibrils orientation. Additional mechanical forces could arise from the increase in size of myometrial SMCs which might “compress” the surrounding ECM and indirectly affect collagen orientation. This explanation seems to apply to adult OVX rats, which after estrogen treatment present significant reductions in the percentage area occupied by the interstitial ECM and the ECM/SMC ratio. However,

this possibility does not appear to explain changes in pubertal rats, where no alterations in these parameters are observed.

Changes in collagen alignment occur in some pathological conditions. For example, an electron microscopic study showed that in early pregnant aloxan-induced type 1 diabetic mice, the organization of collagen fibrils in the longitudinal myometrial layer is disturbed (Favaro et al., 2010). More recently, immunohistochemical studies revealed that as diabetes progresses, alterations in myometrial collagen organization are accompanied by changes in the deposition of specific fibril-forming collagens and some proteoglycans (Favaro et al., 2015). It remains to be elucidated whether similar changes occur during the realignment of the myometrial collagen fibrils in response to estrogen.

Results from the current study showed that in situ, the vast majority of fine sympathetic nerve fibers supplying the myometrium courses within the areas where collagen realignment occurs. Changes in collagen orientation correlate temporally and spatially with the depletion of myometrial sympathetic nerves elicited by puberty (Brauer et al., 1992) and chronic exposure to estrogen of adult OVX rats (Zoubina et al., 2001). Interestingly, both events also coincide with the reduced neuritic growth observed in cryoculture, when myometrial tissue sections from estrogen-treated rat donors were used as substrate (Richeri et al., 2010). The potential involvement of collagen reorientation in the growth-inhibition of sympathetic neurites observed in cryoculture is further supported by our current electron microscopic results showing that neurites grow closely associated to collagen fibrils present in the surface of the myometrial tissue section. The observation that puberty alters collagen orientation raises the possibility that similar changes may also occur along the estrous cycle, when cyclic variations in levels of estrogen provoke phases of degeneration and regeneration of sympathetic nerve terminal fibers supplying the rat myometrium (Zoubina et al., 1998; Zoubina and Smith, 2000). Taken together, our results support the hypothesis that changes in collagen orientation may contribute to diminish the ability of the myometrial substrate to support neuritic growth.

Although the relevance of geometry/alignment of collagen fibrils to neurite outgrowth is well-known; to our knowledge, current results represent the first physiological example where mis-alignment of collagen fibrils could account for neurite growth-inhibition and/or degeneration. Collagen fibrils play crucial roles in neurite guidance and growth, both during development and in nerve regeneration (De Luca et al., 2014). In addition to its biochemical properties, topographical alignment of collagen fibrils influences the pattern and extent of neurite outgrowth both in vitro and in vivo. Indeed, in gel matrices, alignment of collagen fibrils increases neuritic growth rate in comparison with randomly oriented collagen fibrils (Dubey et al. 1999; Ceballos et al., 1999; Phillips et al., 2005; Lanfer et al., 2010; de Luca et al., 2014).

In line with this concept, our current studies in tendon cryocultures showed that neurites grow following the direction of collagen fibrils in the tendon main axis but they do not grow perpendicularly to this axis. These results support similar studies employing tissue cryosections of decellularized tendon produced by bioskiving as substrate (Alberti et al., 2014). Interestingly, neurites were capable of growing on transversely-cut tendon sections although on this substrate, they follow meandering courses. In contrast, neurite outgrowth was sharply inhibited at the boundary between two tendon sections placed opposed at right angles. Moreover, the few neurites that managed to grow along this boundary turn 90° to adapt their course to the new direction of collagen fibrils. This picture closely resembles our previous observations on myometrial cryocultures (Richeri et al., 2010), showing that neurites reaching the boundary between muscle layers oriented perpendicularly, made sharp turns to adapt their course to the main axis of the muscle bundle, and presumably collagen fibrils.

It must be considered however, that since geometrical features of the substrate are known to affect the pattern and growth of different neuron types (Crutcher et al., 2009), it is likely that the estrogen-induced realignment of collagen fibrils may also affect other nerve

fiber populations supplying the myometrium. Studies in immature rats evidenced that following chronic estrogen treatment, sensory nerves are inhibited from growing as the myometrium enlarges (Chalar et al., 2003); and a significant reduction in the density of the finest terminal cholinergic fibers occurs at the end of treatment (Richeri et al., 2002). Similar changes, however, are no longer detected in the mature female (Zoubina et al., 1998, 2001). Further studies are necessary to assess the comparative responsiveness of the different populations of uterine-projecting neurons to estrogen-induced changes in collagen orientation as well as the impact of this realignment in the concert of the multiple molecular signals conferring specificity to the remodeling of uterine innervation in response to estrogen.

Several studies showed that Schwann cells (i.e., Dubey et al., 1999; Phillips et al., 2005), astrocytes (East et al., 2010) and differentiated adipose-derived stem cells (Georgiou et al., 2015) increase neurite outgrowth in aligned three-dimensional collagen gels and may even lead

neurite elongation. In these examples, the enhancement of neurite outgrowth provoked by aligned collagen seems to rely on the alignment of the accompanying cells. In contrast, studies on adult white matter stem cell-derived neurons and glial cells showed that guidance cues provided by collagen type I mostly influence the orientation of neurites rather than glial cell processes (Lanfer et al., 2010). This supports the idea that collagen alignment has a direct effect on growing neurites. In line with this observation, our previous cryoculture studies on myometrial tissue sections showed that sympathetic neurites grow ahead of migrating non-neural cells; and that inhibition of cell migration affected neither the amount nor the orientation of neuritic outgrowth (Richeri et al., 2010). Moreover, on myometrial cryosections of estrogenized myometrial donors, only neurite outgrowth but not non-neuronal cell migration was inhibited. These results suggest not only that neurites directly sense and follow cues present in the substrate, but also that these cues, whichever their nature is, are specific to growing neurites.

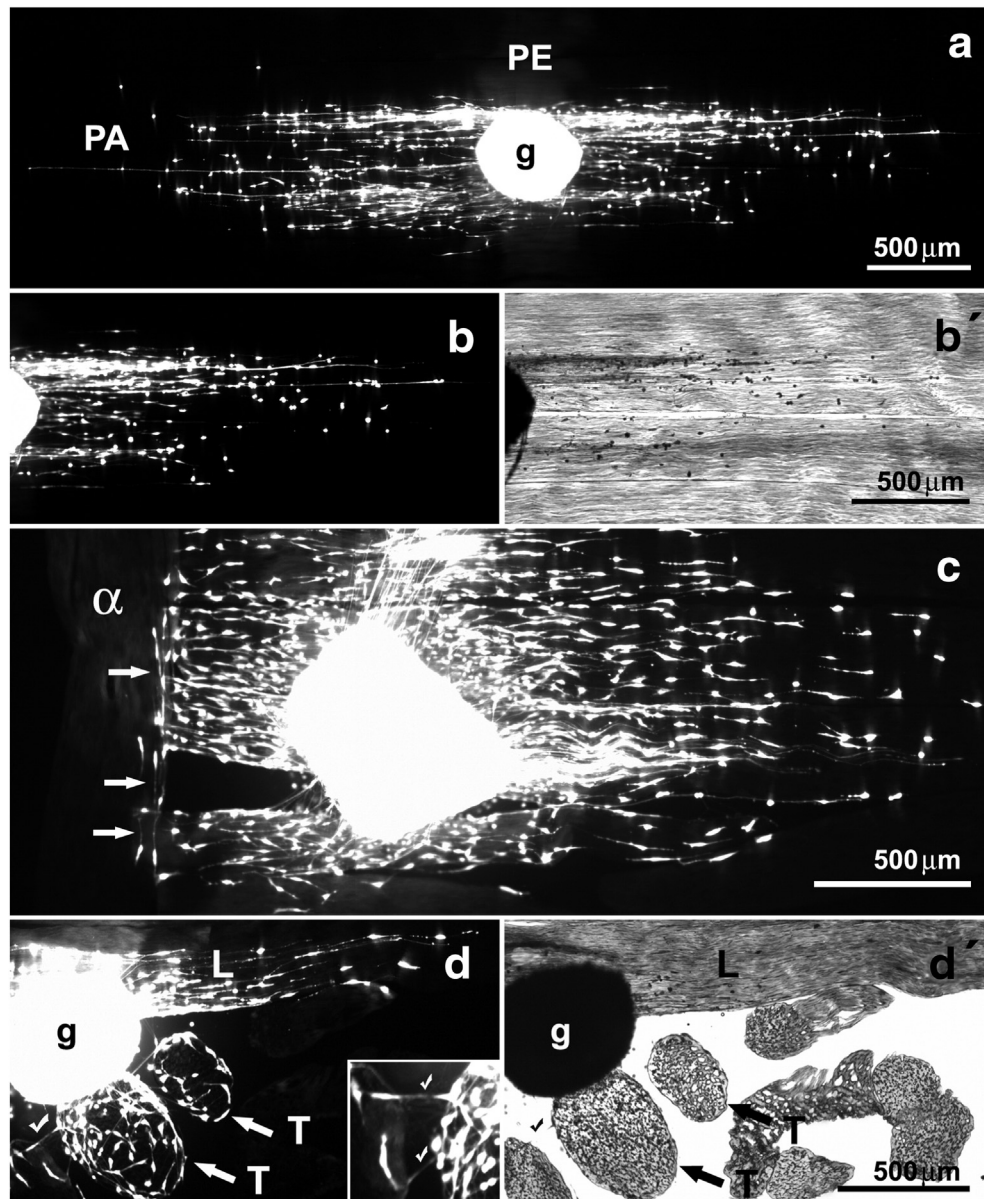


Fig. 7. Representative fluorescein-labeled (a, b) and toluidine blue-stained (b') neonatal sympathetic ganglion explants (g) cultured for 3 days on unfixed sections of rat-tail tendon. Note that neurites grow in parallel (PA) arrays following the orientation of the main axis of the longitudinally sectioned tendon. Neurites do not grow perpendicularly (PE) to the tendon main axis, although sections cover the entire field. Panel (c) illustrates a fluorescein-labeled cryoculture where longitudinal tendon sections were placed at right angles (α). Only scattered neurites grow along the boundary between sections and adapt their course to the new direction of collagen fibrils (arrow). Note the extensive neurite outgrowth on the contra-lateral side. Panels d and d' show respectively, fluorescein-labeled and toluidine blue-stained cryocultures where sympathetic neurites are seen growing on longitudinally- (L) and transversally-sectioned (T, arrows) tendon profiles. The inset in panel d shows neurites which bridge the space separating two tendon profiles (v).

Taken together, results from this study provided quantitative data indicating that estrogen elicits a major reorientation of collagen fibrils in the rat myometrium. In addition, this work presents correlative evidences supporting the hypothesis that changes in the geometric orientation of collagen fibrils may affect the neuritogenic capacity of the estrogenized myometrial substrate. Although the contribution of other ECM signals with negative effects on sympathetic nerves, such as proteoglycans (Gardner and Habecker, 2013), cannot be ruled out at present; collagen emerges from the present study as an interesting candidate within the complex array of molecular signals already known to play a role in the regulation of uterine sympathetic innervation plasticity (Brauer and Smith, 2015; Brauer, 2016).

Conflict of interest

The authors state no conflict of interests.

Acknowledgements

Gaby Martínez and Paola Bianchimano are postgraduate students of PEDECIBA, Uruguay. This work was partially supported by postgraduate fellowships from ANII (PB) and CAP-CSIC-UdelaR (GM and PB).

References

- Alberti, K.A., Hopkins, A.M., Tang-Schomer, M.D., Kaplan, D.L., Qiaobing, X., 2014. The behavior of neuronal cells on tendon-derived collagen sheets as potential substrates for nerve regeneration. *Biomaterials* 35, 3551–3557.
- Brauer, M.M., Lincoln, J., Blundell, D., Corbacho, A., 1992. Postnatal development of nor-adrenaline-containing nerves of the rat uterus. *J. Auton. Nerv. Syst.* 39, 37–50.
- Brauer, M.M., Smith, P.G., 2015. Estrogen and female reproductive tract innervation: cellular and molecular mechanisms of autonomic neuroplasticity. *Auton. Neurosci.* 187, 1–17.
- Brauer, M.M., 2016. Plasticity in uterine innervation: state of the art. *Curr. Protein Pept. Sci.* (Mar 22., Epub ahead of print).
- Ceballos, D., Navarro, X., Dubey, N., Wendelschafer-Crabb, G., William, W.R., Kennedy, R., Tranquillo, R.T., 1999. Magnetically aligned collagen gel filling a collagen nerve guide improves peripheral nerve regeneration. *Exp. Neurol.* 158, 290–300.
- Chalar, C., Richeri, A., Viettro, L., Chávez-Genaro, R., Bianchimano, P., Marmol, N.M., Crutcher, K., Burnstock, G., Cowen, T., Brauer, M.M., 2003. Plasticity in developing rat uterine sensory nerves: the role of NGF and TrkA. *Cell Tissue Res.* 314, 191–205.
- Crutcher, K.A., 1993. Tissue sections as culture substrates: overview and critique. *Hippocampus* 3, 157–164.
- Crutcher, K.A., Jayasinghe, C., Yun, Y.H., Shanov, V.N., 2009. Progress in the Use of Aligned Carbon Nanotubes to Support Neuronal Attachment and Directional Neurite Growth. *Nanomedicine Materials, Devices, and Systems*. Artech House, Boston London, pp. 187–207.
- De Luca, A.C., Lacour, S.P., Raffout, W., di Summa, P.G., 2014. Extracellular matrix components in peripheral nerve repair: how to affect neural cellular responses and nerve regeneration? *Neural. Reg. Res.* 9, 1943–1948.
- Dubey, N., Letourneau, P.C., Tranquillo, R.T., 1999. Guided neurite elongation and Schwann cell invasion into magnetically aligned collagen in simulated peripheral nerve regeneration. *Exp. Neurol.* 269, 338–350.
- East, E., Blum de Oliveira, D., Golding, J.P., Phillips, J.B., 2010. Alignment of astrocytes increases neuronal growth in three-dimensional collagen gels and is maintained following plastic compression to form a spinal cord repair conduit. *Tissue Eng. Part A* 16, 3173–3184.
- Favaro, R.R., Salgado, R.M., Rasputini, P.R., Fortes, Z.B., Zorn, T.M., 2010. Effects of long-term diabetes on the structure and cell proliferation of the myometrium in the early pregnancy of mice. *Int. J. Exp. Pathol.* 91, 426–435.
- Favaro, R.R., Rasputini, P.R., Salgado, R.M., Fortes, Z.B., Zorn, T.M., 2015. Long-term type 1 diabetes alters the deposition of collagens and proteoglycans in the early pregnant myometrium of mice. *Histol. Histopathol.* 30, 435–444.
- Gardner, R.T., Habecker, B.A., 2013. Infarct-derived chondroitin sulfate proteoglycans prevent sympathetic reinnervation after cardiac ischemia-reperfusion injury. *J. Neurosci.* 33, 7175–7183.
- Georgiou, M., Golding, J.P., Loughlin, A.J., Kingham, P.J., Phillips, J.B., 2015. Engineered neural tissue with aligned, differentiated adipose-derived stem cells promotes peripheral nerve regeneration across a critical sized defect in rat sciatic nerve. *Biomaterials* 37, 242–251.
- Knight, D.S., 1980. A light and electron microscopic study of feline intrapulmonary ganglia. *J. Anat.* 131, 413–428.
- Lanfer, B., Herman, A., Kirsch, M., Freudenberg, U., Reuner, U., Werner, C., Storch, A., 2010. Direct growth of adult human white matter stem cell-derived neurons on aligned fibrillar collagen. *Tissue Eng.* 16, 1103–1113.
- Martínez, G., Silveira, P., Bianchimano, P., Richeri, A., Brauer, M.M., 2009. El estrógeno reduce la capacidad neuritogénica del sustrato uterino. Papel de la geometría del colágeno. VI Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular, Montevideo, Uruguay, p75 (Abstract).
- Phillips, J.B., Bunting, S.C.J., Hall, S.H., Brown, R.A., 2005. Neural tissue engineering: a self-organizing collagen guidance conduit. *Tissue Eng.* 11, 1611–1617.
- Richeri, A., Viettro, L., Chávez-Genaro, R., Burnstock, G., Cowen, T., Brauer, M.M., 2002. Effects of infantile/prepubertal chronic estrogen treatment and chemical sympathectomy with guanethidine on developing cholinergic nerves of the rat uterus. *J. Histochem. Cytochem.* 50, 839–850.
- Richeri, A., Bianchimano, P., Crutcher, K.A., Brauer, M.M., 2010. Reduced sympathetic neurite outgrowth on uterine tissue sections from rats treated with estrogen. *Cell Tissue Res.* 340, 287–301.
- Ross, R., Klebanoff, S.J., 1971. The smooth muscle cell. 1. In vivo synthesis of connective tissue proteins. *J. Cell Biol.* 50, 159–171.
- Tranzer, J.P., Thoenen, H., 1967. Electronmicroscopic localization of 5-hydroxydopamine (3,4,5-trihydroxy-phenyl-ethylamine), a new 'false' sympathetic transmitter. *Experientia* 23, 743–745.
- Zoubina, E., Fan, Q., Smith, P., 1998. Variation in uterine innervation during the estrous cycle. *J. Comp. Neurol.* 397, 561–571.
- Zoubina, E.V., Smith, P.G., 2000. Axonal degeneration and regeneration in rat uterus 1693 during the estrous cycle. *Auton. Neurosci.* 84, 176–185.
- Zoubina, E.V., Mize, A.L., Alper, R.H., Smith, P.G., 2001. Acute and chronic estrogen supplementation decreases uterine sympathetic innervation in ovariectomized adult virgin rats. *Histol. Histopathol.* 16, 989–996.