

Pasantía

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Profundización en Neurociencias

***CONTRIBUCIÓN DE LA REORGANIZACIÓN DEL COLÁGENO EN LA PLASTICIDAD
DE LA INERVACIÓN SIMPÁTICA DEL ÚTERO***

- 2012-

Estudiante: Br. Gaby Fabiana Martínez

Tutora: Dra. M. Mónica Brauer

Laboratorio de Biología Celular

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

Montevideo-Uruguay

INDICE

Resumen.....	4
1) Antecedentes Generales.....	6
1.1 Anatomía del útero.....	6
1.2 La inervación del útero.....	7
1.3 Plasticidad en la inervación simpática del útero y papel del estrógeno.....	9
1.4 Papel del efector en la plasticidad de la inervación simpática uterina.....	10
1.5 Papel de moléculas difusibles con efectos negativos sobre el crecimiento de los nervios simpáticos.....	12
1.6 Papel del sustrato en el crecimiento neurítico.....	12
2) Antecedentes específicos.....	13
3) Resultados preliminares.....	15
4) Objetivos generales.....	16
5) Objetivos específicos.....	16
6) Materiales y Métodos.....	17
6.1 Animales y tratamientos.....	17
6.2 Ovariectomía.....	17
6.3 Tratamientos con estrógeno.....	17
6.4 Tratamiento con 5-hydroxydopamina (5-OHDA).....	18
7) Microscopía Electrónica de Transmisión.....	18
7.1 Principios generales.....	18
7.2 Preparación de tejidos.....	19
7.3 Obtención y tinción de cortes para MET.....	20
7.4 Método de cuantificación de la orientación del colágeno.....	22
7.5 Cultivo de ganglios simpáticos sobre cortes a congelación de miometrio y análisis ultraestructural del crecimiento neurítico.....	23

8) Inmunohistoquímica	24
8.1 Principios generales.....	24
8. 2 Demostración inmunohistoquímica de los nervios simpáticos e Histología.....	24
9) Resultados.....	26
9.1 Efectos del estrógeno sobre la orientación del colágeno en el miometrio de ratas adultas ovariectomizadas.....	26
9.2 Análisis ultraestructural del crecimiento neurítico en criocultivo.....	29
9.3 Estudio de la distribución de los nervios simpáticos en el miometrio uterino.....	31
10) Discusión.....	35
11) Referencias.....	39
12) Agradecimientos.....	43

RESUMEN

El músculo liso uterino (miometrio) está innervado por nervios simpáticos los cuales presentan una gran plasticidad que se asocia con fluctuaciones fisiológicas en los niveles de estrógeno. Esta hormona es capaz de inhibir el crecimiento y causar la degeneración de los nervios intrínsecos del útero. La plasticidad mostrada por la innervación uterina en respuesta al estrógeno se vincula con cambios en la capacidad del propio tejido uterino de sustentar su innervación. Más aún, existen evidencias de que bajo la influencia del estrógeno, el miometrio produce una variedad de señales moleculares difusibles con efectos inhibitorios e incluso repulsivos para los nervios simpáticos.

Además de las señales difusibles, es sabido que muchas moléculas intrínsecas de la matriz extracelular (MEC) son de vital importancia para el guiado y crecimiento axónico. En el útero, las hormonas sexuales promueven cambios relevantes en la composición y organización de la MEC, los cuales podrían afectar a sus nervios simpáticos. Utilizando ensayos de "criocultivo" nuestro grupo demostró que el sustrato uterino aporta señales que contribuyen a establecer el patrón organotípico de crecimiento de los nervios simpáticos en el miometrio uterino; y que el estrógeno induce cambios en las propiedades del sustrato uterino que limitan su capacidad de sustentar a su innervación simpática.

Estudios preliminares de microscopía electrónica de transmisión mostraron que las células musculares lisas del miometrio estaban rodeadas por fibrillas de colágeno cuya orientación parecía variar en respuesta al estrógeno. Considerando que el colágeno *in vivo* es clave para el crecimiento de los axones y que la orientación del colágeno afecta profundamente al crecimiento neurítico *in vitro*, se planteo como hipótesis que la orientación del colágeno presente en la MEC miometrial estrogenizada podría impactar negativamente sobre el crecimiento de las neuritas simpáticas. En este marco, los objetivos de este trabajo fueron: (a) confirmar y extender nuestras observaciones preliminares, y valorar cuantitativamente la remodelación que ocurre en el colágeno miometrial en respuesta al estrógeno mediante el empleo de microscopía electrónica asociada a métodos morfométricos; (b) determinar si en criocultivo, las neuritas utilizan como vía de crecimiento el colágeno presente en el corte de miometrio uterino utilizado como sustrato; y (c) valorar si *in situ*, los nervios simpáticos utilizan como vía de distribución las áreas del miometrio donde se detectan cambios en la orientación del colágeno.

Los principales resultados de esta investigación fueron los siguientes.

(1) En las ratas adultas ovariectomizadas (OVX), el 83% del colágeno intersticial que rodea a las células miometriales individuales estaba altamente alineado y orientado paralelamente con el eje mayor de las células musculares lisas (CML). Luego del tratamiento con estrógeno, las fibrillas de colágeno se encontraban envolviendo a las CML y presentaban una orientación que era perpendicular a su eje mayor. Consistentemente con estas observaciones, los estudios cuantitativos mostraron que en las

ratas OVX tratadas con estrógeno, sólo el 11% del área total ocupada por el colágeno estaba representada por fibrillas que seguían el eje mayor de las CML.

(2) En experimentos de criocultivo, se observaron numerosas neuritas las cuales establecían contactos estrechos con las fibrillas de colágeno altamente alineadas presentes en la superficie libre del corte de miometrio usado como sustrato. También se observaron numerosas células no-neuronales ganglionares que migraban sobre la superficie del corte de tejido.

(3) Utilizando ensayos de inmunohistoquímica asociados a técnicas histológicas, demostramos que en ratas prepuberes, el 96% de los axones simpáticos miometriales se encontraban asociados con los haces musculares, mientras que sólo un 4% cursaba por el tejido conjuntivo que separa dichos haces. En concordancia con estas observaciones, los estudios ultraestructurales de los nervios simpáticos marcados con el falso neurotransmisor 5-OHDA revelaron la presencia de delicados perfiles de axones terminales cursando por la matriz altamente alineada de colágeno que rodea a las CML del miometrio.

Tomados en su conjunto los resultados presentados en este trabajo apoyan la hipótesis de que la reorganización del colágeno podría ser uno de los factores que contribuyen a la regulación de la plasticidad mostrada por los nervios simpáticos en respuesta al estrógeno. Es posible que los cambios en la orientación del colágeno afecten la respuesta de los conos de crecimiento a la guía por contacto ofrecida por este sustrato. Finalmente, cabe resaltar que el colágeno constituye además el sitio de anclaje de otras moléculas de la MEC, tales como algunos proteoglicanos. Es posible que los cambios en la orientación del colágeno afecten la distribución espacial de estas moléculas, alterando así también el crecimiento de las neuritas. Trabajos futuros serán necesarios para evaluar estas posibilidades.

1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1. Anatomía del útero

En mamíferos, el tracto genital femenino está constituido por los ovarios, los oviductos, el útero y la vagina. En los roedores y otros mamíferos no-primates, el útero posee una anatomía bicorne; es decir, formada por dos cuernos uterinos los cuales convergen hacia la región caudal formando el cuerpo uterino, el cual se continúa con el cuello uterino (Figura 1A).

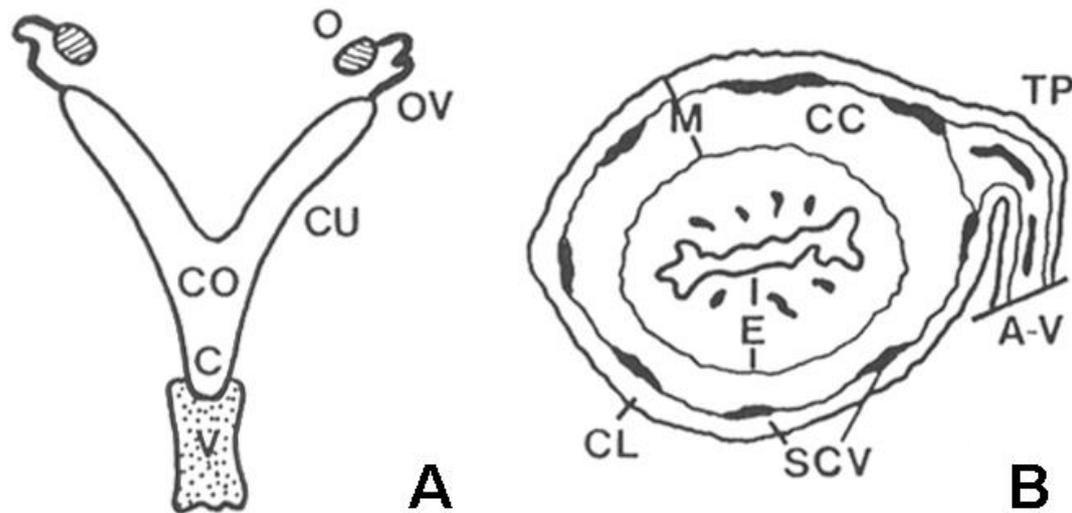


Figura 1. Anatomía del útero. (A) esquema representativo del útero bicorne de rata, O: ovario, OV: oviducto, CU: cuerno uterino, CO: cuerpo, C: cuello, V: vagina. (B) representación esquemática de un corte transversal de útero de rata. M: miometrio, CL: capa miometrial longitudinal, CC: capa miometrial circular, SCV: septo conjuntivo vascular, E: endometrio, TP: tejido parametrial, A-V: arteria

La histología (Figura 1B) ha evidenciado que el útero está compuesto por dos grandes compartimentos, el endometrio y el miometrio. El endometrio está formado por una mucosa bien desarrollada, limitada hacia la luz del órgano por un epitelio simple, a partir del cual se forman múltiples glándulas endometriales. En los úteros bicornes, el miometrio está constituido por dos capas musculares lisas que se encuentran separadas por un septo conjuntivo altamente vascularizado. La capa muscular externa (longitudinal), está formada por fibras musculares lisas que se orientan en forma paralela al eje mayor del cuerno uterino, mientras que en la capa interna (circular), las fibras se orientan concéntricamente y orientadas en forma perpendicular al eje mayor uterino. La capa muscular longitudinal se extiende lateralmente formando una extensión bilaminar que tapiza el peritoneo uterino y se conoce como mesometrio o tejido parametrial.

1.2 La inervación del útero

En todos los mamíferos, incluyendo a los humanos, el útero presenta una inervación autónoma, compuesta por nervios simpáticos y parasimpáticos. Estos nervios utilizan respectivamente, neurotransmisores como la noradrenalina y la acetilcolina, así como también varios neuropéptidos, tales como el neuropéptido Y (NPY) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP). Además, el útero presenta una inervación sensorial que utiliza neurotransmisores tales como, la sustancia P, la galanina y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). En su conjunto estos neurotransmisores y neuropéptidos modulan la contractilidad del miometrio uterino, actúan como agentes reguladores de la vasoconstricción o vasodilatación y regulan la secreción glandular endometrial. De esta forma, los nervios uterinos contribuyen a distintas funciones reproductivas, tales como el transporte de los espermatozoides hacia el sitio de fecundación, la distribución de los blastocistos, la retención del feto durante su desarrollo; y están involucrados en la regulación de las contracciones que conducen al parto (Papka y Traurig., 1993).

Las eferencias nerviosas que inervan al cuerno y cuerpo uterino llegan al útero por la vía de los nervios hipogástricos, nervios pélvicos, vagos y vías de nervios sensoriales que penetran al útero a través del mesometrio, acompañando a los vasos sanguíneos como fibras peri- y para-vasculares, así como también como haces nerviosos independientes (Papka y Traurig., 1993).

Estudios pioneros realizados en ratas, donde se midió la densidad de fibras noradrenérgicas mediante técnicas de inmunohistoquímica, evidenciaron diferencias significativas en la densidad de inervación simpática de las distintas regiones uterinas. Se observó que la región más cefálica de la capa miometrial longitudinal del cuerno uterino presenta una inervación noradrenérgica más desarrollada que la zona caudal. Contrariamente, la región caudal presenta la mayor densidad de fibras simpáticas asociadas a la capa muscular circular (Melo y Machado, 1993; Chávez-Genaro y col., 2002).

Estudios realizados en ratas utilizando trazadores retrógrados evidenciaron que un 26 % de la inervación simpática del útero proviene de ganglios prevertebrales, tales como los ganglios mesentérico superior (GMS), mesentérico inferior (GMI) y suprarrenal (GSR). El GMS aporta el 22% de esta inervación, siendo este ganglio el que da el mayor suministro simpático al útero (Vera y col., 1997).

Por otra parte, mucha de la inervación uterina proviene de la cadena simpática paravertebral tóraco-lumbar y se ha demostrado que existe una correlación somatotópica entre el origen de los nervios y el área del cuerno uterino inervada. Así, la inervación del útero difiere a lo largo de sus regiones,

presentando una innervación región-específica (Melo y Machado, 1993; Papka y Traurig, 1993; Houdeau y col., 1998).

En 1998, Houdeau y colaboradores, mediante la utilización de un trazador retrógrado, mostraron que las neuronas que inervan las regiones cefálicas y el cuello del útero de la rata, tienen orígenes diferentes. Las regiones más cefálicas del cuerno uterino poseen una innervación postganglionar que deriva en un 90% de ganglios ubicados en la región torácica, principalmente del T10 al L3. Contrariamente, las fibras simpáticas post-ganglionares de la cadena simpática que inervan la zona más caudal del cuerno y el cuello uterino reciben un 90% de eferencias de los ganglios paravertebrales T13 a S2, principalmente de ganglios L3-L4. Por otra parte, utilizando ensayos de inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo dirigido contra tiroxina hidroxilasa para revelar los nervios simpáticos, estos autores encontraron que tan solo un 3% de la innervación simpática del útero provenía del plexo pélvico, y observaron que muy pocas neuronas del GMI inervan la región caudal y cervical del útero (Figura 2).

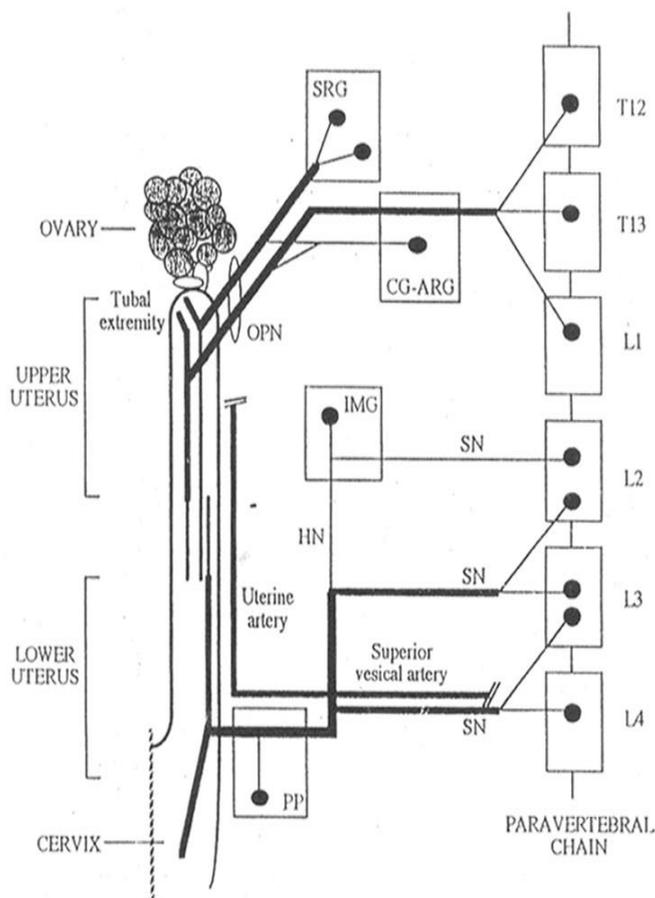


Figura 2. Esquema representativo de los orígenes y rutas de las fibras simpáticas post-ganglionares del útero y cuello uterino (lado izquierdo del tracto genital). El grosor de las líneas indica la contribución relativa de cada fuente. Sólo las fuentes principales de la cadena paravertebral están representadas. 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 (GSR), siendo el GSR el principalmente involucrado en el suministro de la innervación simpática del extremo tubárico de los cuernos. 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 paravertebral L2 a L4. La mayor parte de estos axones vienen de nervios espláncnicos (SN) y atraviesan el ganglio mesentérico inferior (IMG) para conectarse directamente con los nervios hipogástricos (HN). CG: ganglio celíaco, ARG: ganglio aórtico-renal. Modificado de Houdeau y col., 1998.

1.3 Plasticidad en la inervación simpática del útero y papel del estrógeno

La inervación simpática uterina muestra una gran plasticidad la cual es regulada por fluctuaciones fisiológicas en los niveles circulantes de las hormonas sexuales ovárico-placentarias, particularmente el estrógeno. Estos cambios se verifican en distintas condiciones, tales como la pubertad natural (Brauer y col., 1992) y el ciclo estral (Zoubina y col., 1998; Zoubina y Smith., 2000; Brauer, 2008). Más aún, durante el embarazo ocurre una degeneración de la inervación simpática del útero, la cual regenera luego del parto (revisado en Brauer., 2008).

Análisis inmunohistoquímicos e histológicos realizados en ratas (Brauer y col., 1992), evidenciaron que durante el desarrollo posnatal se produce un incremento progresivo de la inervación simpática miometrial, la cual alcanza su máximo desarrollo durante el período prepuberal; dicho aumento se acompaña por un aumento en la concentración de noradrenalina (NA) en el órgano. Luego del primer estro que ocurre en la pubertad y su concomitante incremento en los niveles de hormonas sexuales, se produce un descenso en la densidad de inervación miometrial, el cual se acompaña por una caída en la concentración tisular de NA. Este cambio fue interpretado como una inhibición del crecimiento de los nervios simpáticos uterinos en respuesta a las hormonas sexuales, que los hicieron incapaces de acompañar el crecimiento del órgano.

En 1995 Brauer y colaboradores evidenciaron el papel clave jugado por el estrógeno en esta plasticidad; y mostraron que distintos protocolos de administración de la hormona mimetizan los cambios observados en la inervación en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, el tratamiento agudo con estrógeno en ratas inmaduras produce un decrecimiento en la concentración de NA y una reducción en la densidad de inervación miometrial similar a la provocada por la pubertad natural. En cambio, la administración crónica de estrógeno a ratas prepúberes causa una pérdida completa de nervios simpáticos miometriales, similar a la observada al término del embarazo.

Estudios posteriores evidenciaron que los nervios simpáticos que inervan los vasos sanguíneos no son afectados por la transición de la pubertad ni por el tratamiento con estrógeno, reforzando así la idea de que los nervios simpáticos asociados al miometrio son más susceptibles a las hormonas sexuales que los nervios peri-vasculares (Corbacho y col., 1997).

Pasada la pubertad, los nervios simpáticos se enfrentan a constantes cambios en los niveles de las hormonas sexuales que ocurren durante el ciclo estral natural. Varios estudios evidenciaron la existencia de cambios cíclicos en el contenido de NA en el útero; donde los niveles del neurotransmisor son más altos en el diestro y decrecen durante el proestro y el estro, cuando se observa una predominancia del estrógeno (Thorbet y col., 1978; Van Orden y col., 1980). Estos

cambios en los niveles de NA se acompañaron por cambios en la densidad de inervación miometrial en ratas y ratones adultos (Zoubina y col., 1998; Zoubina y Smith., 2001).

En el año 2000, Zoubina y colaboradores investigaron la variación en la densidad de inervación simpática del cuerno uterino de la rata durante ciclo estral; demostrando que durante las fases de estro y proestro se reduce sustancialmente la densidad de la inervación simpática del útero en comparación con la fase de diestro, en la que se observa una mayor densidad de inervación. Asimismo, mediante observación ultraestructural, este grupo evidenció que los cambios en la inervación simpática del útero durante el ciclo estral de la rata se relacionaban con rápidas fases de degeneración y regeneración de los axones simpáticos (Zoubina y Smith., 2000). Posteriormente, estos investigadores confirmaron que experimentalmente ocurrían fenómenos similares, donde úteros provenientes de ratas adultas ovariectomizadas (OVX) y tratadas con estrógeno presentaban una marcada reducción de los nervios simpáticos miometriales, similarmente a lo observado en animales intactos en estadio de estro (Zoubina y Smith., 2001).

En su conjunto, estos resultados sugieren que el estrógeno juega un papel clave en la plasticidad de los nervios simpáticos que inervan el miometrio uterino, causando la inhibición del crecimiento y aún degeneración de los nervios intrínsecos del órgano.

Finalmente, los efectos inhibitorios del estrógeno sobre los nervios uterinos fueron evidenciados mediante la utilización de ratones *knockout* para el receptor alfa estrogénico (RE- α). En 2001, Zoubina y Smith demostraron que los efectos del estrógeno eran mediados a través del RE- α y mostraron que los ratones *knockout* para dicho receptor presentaban una hiperinervación simpática uterina y no respondían al estrógeno con una reducción en la inervación simpática. Dado que el receptor alfa es expresado tanto por las neuronas simpáticas (Zoubina y Smith., 2002) como por el miometrio uterino (Madekurozwa y col., 2009), el estrógeno podría afectar a la inervación uterina actuando directamente sobre las neuronas simpáticas o indirectamente, modificando la capacidad del miometrio uterino de sustentar su inervación. En base a esto, varios estudios han sido llevados a cabo con el fin de determinar el sitio de acción de la hormona.

1.4 Papel del efector en la plasticidad de la inervación simpática uterina

Durante mucho tiempo se creyó que el estrógeno causaba un efecto negativo sobre los nervios simpáticos uterinos actuando directamente sobre las neuronas simpáticas. Hallazgos más recientes, dieron sustento a la hipótesis de que el estrógeno y el embarazo causaban cambios en el propio tejido

uterino, los cuales indirectamente, afectaban su capacidad de sustentar a su inervación simpática (Brauer y col., 1998, 2000; revisado en Brauer, 2008).

Esta hipótesis alternativa fue comprobada en el año 2000, cuando Brauer y colaboradores trasplantaron fragmentos de miometrio provenientes de ratas prepúberes a la cámara anterior del ojo de ratas adultas OVX y tratadas con estrógeno. Dado que los tejidos transplantados a la cámara anterior del ojo son rápidamente revascularizados por los vasos sanguíneos del iris del hospedero, los trasplantes provenientes de ratas OVX tratados con estrógeno mostraron un incremento de tamaño y una maduración de sus células musculares similares a las observadas *in situ*. La evaluación de la inervación de los trasplantes mostró que en las ratas tratadas con vehículo, los trasplantes miometriales estaban rica y organotípicamente reinervados por fibras nerviosas simpáticas provenientes del ganglio cervical superior, el cual provee normalmente la inervación simpática del iris y ciertas estructuras cerebrales. Contrariamente, se pudo evidenciar que los trasplantes de las hembras hospederas tratadas con estrógeno presentaron una pobre reinervación, similar a la denervación provocada por el estrógeno en la inervación intrínseca del miometrio uterino *in situ*. Dado que la inervación del iris no sufrió modificaciones ni en su densidad de inervación ni en sus niveles tisulares de NA, los resultados brindados por los experimentos de trasplante fueron interpretados como una evidencia de que el estrógeno media sus efectos negativos a través de cambios en la capacidad neuritogénica del propio tejido uterino.

Los hallazgos anteriormente mencionados, fueron confirmados por ensayos de co-cultivo de explantos ganglionares simpáticos y explantos de miometrio (Krizsan-Agbas y Smith., 2002). En estos ensayos se observó que el miometrio de las hembras adultas castradas promovía el crecimiento neurítico desde los ganglios simpáticos, pero que este crecimiento estaba muy reducido cuando el explanto miometrial provenía de una hembra castrada tratada con estrógeno. Un resultado similar se observó tras la adición de estrógeno al medio donde se co-cultivaban explantos ganglionares y miometriales, pero no se observaron efectos inhibitorios del crecimiento neurítico cuando el estrógeno se adicionaba a cultivos que sólo contenían explantos ganglionares.

Es sabido que existe una variedad de moléculas difusibles que son secretadas por el órgano efector y que podrían ser de impacto negativo al crecimiento de los nervios, nuestro siguiente punto mencionará algunas evidencias de la contribución de estas señales.

1.5 Papel de moléculas difusibles con efectos negativos sobre el crecimiento de los nervios simpáticos

El miometrio uterino produce una variedad de señales moleculares difusibles con efectos inhibitorios para los nervios simpáticos. En 2005, Lobos y colaboradores evaluaron mediante análisis bioquímicos la expresión temporal y espacial de isoformas de pro-NGF (del inglés: *pro-nerve growth factor*) en el útero de rata durante el embarazo. Ellos evidenciaron que durante el embarazo y luego del parto existía una diferencia témporo-espacial de la relación NGF/pro-NGF, y que cambios en el procesamiento del NGF se relacionaban con la denervación simpática del útero.

También se ha demostrado que el útero estrogenizado produce otros tipos de señales difusibles de impacto negativo para los nervios simpáticos, tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; del inglés: *brain-derived neurotrophic factor*), (Krizsan-Agbas y col., 2003); la neurotrimina (Krizsan-Agbas y col., 2008), mediadores inflamatorios (Bianchimano y col., 2007) y varios miembros neuro-repulsivos de la familia de las semaforinas (Marzioni y col., 2004; Richeri y col., 2008, 2011). Recientemente, nuestro grupo de trabajo evidenció que la exposición crónica al estrógeno de ratas prepúberes induce la síntesis de semaforina 3F, la cual es fuertemente neuro-repulsiva para los nervios simpáticos y contribuye a convertir al miometrio estrogenizado en un ambiente inhóspito para los nervios simpáticos uterinos (Richeri y col., 2011).

1.6 Papel de la matriz extracelular en el crecimiento neurítico

Es sabido que además de la existencia de factores difusibles, el crecimiento de los nervios depende en buena medida de moléculas asociadas al sustrato, muchas de las cuales son componentes intrínsecos de la matriz extracelular (MEC). Durante el desarrollo embrionario y posnatal, la MEC es esencial para el guiado axónico (Porcianatto, 2006) y continúa actuando en la vida adulta, regulando procesos de regeneración y plasticidad (Huebner y Strittmatter., 2009).

Por ejemplo, la laminina, la fibronectina y el colágeno son generalmente sustratos permisivos que favorecen el crecimiento de las neuritas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Contrariamente, los proteoglicanos son generalmente inhibidores del crecimiento neurítico, mientras que otras moléculas como la tenascina pueden tener efectos promotores o inhibitorios del crecimiento de forma contexto-dependiente (Antón y col., 1994; Becker y Becker, 2002; Porcianatto, 2006).

Varias evidencias indican que luego de una injuria, el crecimiento de los axones se ve limitado en el sistema nervioso central y se ha demostrado que parte de este efecto, es mediado por cambios en la expresión de ciertas moléculas de la MEC, como por ejemplo los proteoglicanos (Kwok y col., 2008).

Contrariamente, en el sistema nervioso periférico (SNP) esta situación difiere, pudiéndose observar regeneración axonal, que dependerá en parte de señales extracelulares y en parte de la capacidad intrínseca de las neuronas (Huebner y Strittmatter, 2009). Por otra parte, es sabido que ciertos componentes de la MEC son esenciales para el mantenimiento de la inervación simpática de la pared de los vasos sanguíneos y serían responsables de ciertos fenómenos atróficos de esta inervación durante el envejecimiento (Gavazzi y col., 1996).

En el útero, las hormonas sexuales promueven cambios relevantes en la composición y organización de la matriz extracelular. Por ejemplo, algunos estudios han evidenciado que cambios en la expresión génica de componentes de la MEC, como colágeno, fibronectina y laminina contribuyen a la remodelación del miometrio durante el embarazo (Shynlova y col., 2004). La expresión de ciertos proteoglicanos también varía con las fluctuaciones de las hormonas sexuales durante el ciclo estral, así como también existe una expresión más fuerte de esta señal en el miometrio uterino de ratones en respuesta al estrógeno (Salgado y col., 2009). Teniendo en cuenta que los proteoglicanos poseen entre otras, la función de ensamblaje de moléculas de la MEC como por ejemplo el colágeno (Silvera y col., 2002), esta expresión diferencial de los mismos podría causar modificaciones en la MEC uterina que a la postre podrían modificar el crecimiento de su inervación.

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Con el fin de evaluar la contribución del sustrato a la remodelación iniciada por el estrógeno en la inervación uterina, nuestro grupo utilizó el modelo de “criocultivo” (Richeri y col., 2010). Este ensayo consiste en cultivar explantos ganglionares sobre cortes a congelación de tejido no fijado. En nuestro caso, se cultivaron explantos de ganglio cervical superior provenientes de ratas neonatales y adultas castradas. Como sustrato se usaron cortes a congelación de la capa muscular longitudinal del miometrio uterino, provenientes de ratas adultas castradas tratadas con vehículo o estrógeno (Figura 3).

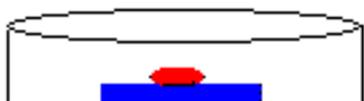


Figura 3. Esquema que representa el método de criocultivo. Se puede observar: en color azul el corte de tejido usado como sustrato (miometrio), y en rojo el explanto de ganglio simpático.

La primera observación brindada por estos estudios fue que en todos los casos, el crecimiento neurítico estaba profundamente influenciado por las características del tejido subyacente. Por ejemplo, se observó que las neuritas crecían sobre las regiones del corte ocupadas por músculo liso y

evitaban crecer en las zonas del corte ocupadas por el tejido conjuntivo que separa los haces musculares (Figura 4).

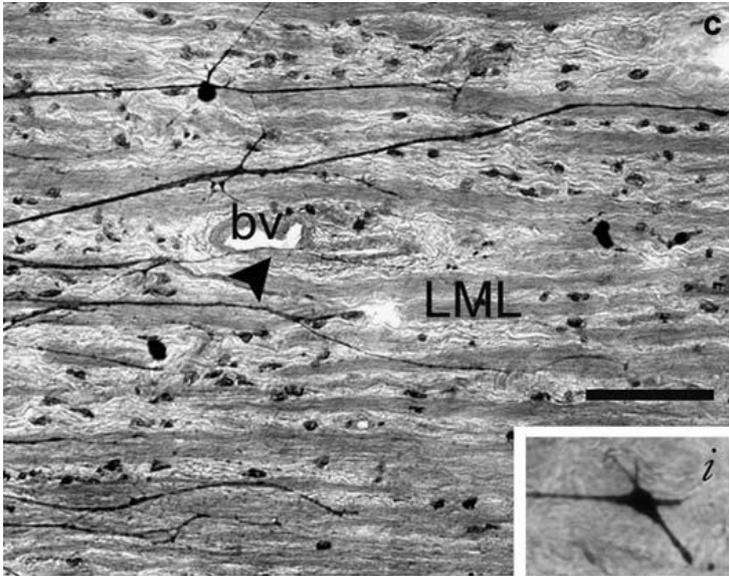


Figura 4. Corte de criocultivo teñido con azul de toluidina. Se observa el crecimiento neurítico asociado con los haces de células musculares lisas de la capa miometrial longitudinal (LML) y los vasos sanguíneos (bv) intrauterinos, evitando crecer por las áreas del corte ocupadas por el tejido conjuntivo que separa los haces musculares. Inset (i) se puede observar un cono de crecimiento.

Imágenes tomadas de Richeri y col., 2010.

Estos estudios también mostraron que las neuritas crecían preferentemente siguiendo el eje mayor de las células musculares lisas y no lograban crecer en forma perpendicular a ellas (Figura 5a). Más aún, se observó que las neuritas se curvaban en ángulos de hasta 90° para adaptar su curso a esta orientación particular (Figuras 5b y b').

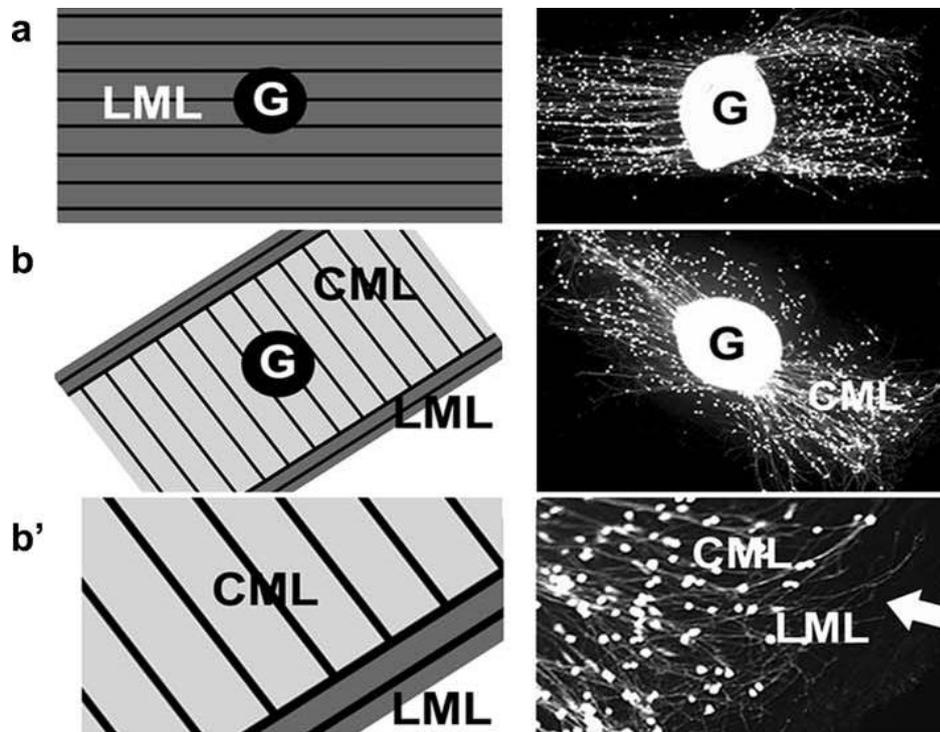


Figura 5. Influencia del sustrato en el crecimiento neurítico. Panel derecho: imágenes de criocultivos teñidos con colorante vital, panel izquierdo: esquemas representando la orientación de las fibras musculares en el corte de tejido subyacente (a: cortes longitudinales de capa miometrial longitudinal y b, b': circular). Nótese que el crecimiento neurítico sigue el eje axial mayor de las células musculares lisas (a, b, b'), y que las neuritas reorientan su crecimiento adaptándose a la orientación de las células musculares lisas (b', flecha). Imágenes tomadas de Richeri y col., 2010.

Finalmente, estos estudios mostraron que el crecimiento neurítico era sustancialmente menor sobre los cortes de miometrio de ratas tratadas con estrógeno (Figuras 6). En su conjunto, estos resultados indican que: (1) el sustrato miometrial provee señales para guiar a los axones simpáticos de manera organotípica y sin la aparente participación de señales difusibles; y (2) el estrógeno modifica las características del sustrato miometrial y lo hace menos capaz de promover el crecimiento neurítico.

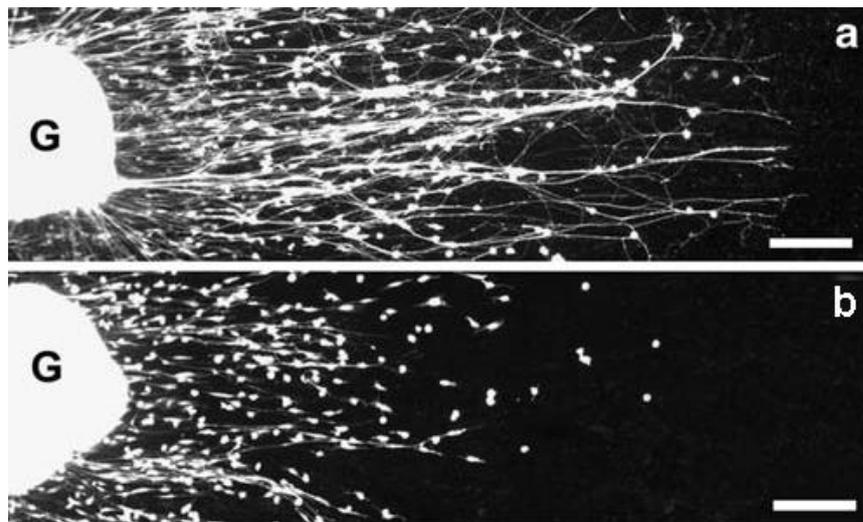


Figura 6. Explantos de ganglio simpático neonatal (G) emitiendo neuritas sobre un corte de capa longitudinal miometrial de una rata adulta castrada (a) y una tratada con estrógeno (b). Nótese que el crecimiento neurítico es marcadamente menor cuando el ganglio simpático es cultivado sobre secciones de miometrio estrogenizado. La migración de las células no-neuronales no se ve afectada por el estado hormonal del sustrato. Imágenes tomadas de Richeri y col., 2010.

3. RESULTADOS PRELIMINARES

Es sabido que el colágeno es clave para el crecimiento de los axones *in vivo*, siendo además una proteína de la MEC ampliamente utilizada como sustrato para cultivos neuronales. Más aún, existen evidencias de que la orientación del colágeno afecta profundamente la extensión del crecimiento neurítico, como lo demuestran los ensayos de cultivo que emplean colágeno hidratado (red) y colágeno alineado mediante el empleo de un campo magnético (Dubey y col., 1999; Ceballos y col., 1999). Además, estudios recientes mostraron que la utilización andamios de colágeno promueve la unión de factores de crecimiento en sitios que presentan injurias, mejorando así la regeneración de nervios periféricos (Madduri y Gander., 2011).

En este marco, es posible plantear como **hipótesis** que tanto en los ensayos de criocultivo como *in vivo*, la orientación del colágeno presente en la MEC miometrial podría contribuir a la orientación de las neuritas en crecimiento; y que el estrógeno podría inducir cambios en la orientación del colágeno que impactaran negativamente sobre el crecimiento de las neuritas simpáticas.

Basados en esta hipótesis, realizamos algunas observaciones preliminares usando microscopía electrónica de transmisión, las que mostraron que cada célula muscular lisa miometrial estaba rodeada por abundantes fibrillas de colágeno. En las ratas castradas tratadas con vehículo, estas fibrillas estaban altamente ordenadas y se orientaban siguiendo el eje mayor de las células musculares lisas. Contrariamente, en las ratas tratadas con estrógeno, el colágeno perimuscular presentaba una disposición diferente a la del control, siguiendo una orientación perpendicular al eje mayor de las células musculares. Estas observaciones, apuntan a apoyar la hipótesis planteada, pero es necesario corroborarlas utilizando métodos cuantitativos.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la orientación del colágeno presente en la matriz extracelular miometrial contribuye en la orientación de las neuritas en crecimiento, y si el estrógeno induce cambios en la orientación del colágeno que puedan ser responsables del menor crecimiento observado sobre cortes estrogenizados.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

(a) Confirmar y extender nuestras observaciones preliminares; y valorar cuantitativamente la remodelación que ocurre en el colágeno miometrial en respuesta al estrógeno, mediante el empleo de microscopía electrónica asociada a métodos morfométricos.

(b) Determinar si en criocultivo, las neuritas utilizan para su crecimiento el colágeno presente en el corte de miometrio uterino utilizado como sustrato.

(c) Analizar si *in situ*, los nervios simpáticos se distribuyen en las áreas del miometrio donde se detectan cambios en la orientación del colágeno.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Animales y Tratamientos

En el presente trabajo se utilizaron ratas hembras adultas 3 meses de edad de la cepa Wistar, pertenecientes a la colonia del IIBCE. Las ratas fueron sexadas al nacer y destetadas a los 20 días de edad. Los animales fueron criados en un ambiente constante de temperatura e iluminación, y mantenidos en grupos de seis hembras con libre acceso de alimento y agua. En ensayos puntuales se utilizaron hembras prepubescentes (27 días de edad) y neonatales (4-5 días de edad).

6.2 Ovariectomía

Inicialmente se determinó la fase del ciclo estral de las ratas mediante frotis vaginal y se escogieron para ser ovariectomizadas las hembras que se encontraban en diestro (etapa del ciclo de bajos niveles de estrógeno). Para la realización de la ovariectomía, las ratas fueron anestesiadas mediante una inyección intraperitoneal (IP) de 90mg/kg Ketamina (Unimedical, Uruguay) y 10mg/kg de Xilazina (Unimedical). La remoción de los ovarios se realizó a través de dos pequeñas incisiones laterales realizadas en la región lumbar, bajo condiciones de asepsia. Luego de exponer el ovario, se pinzó el oviducto y luego de realizar una ligadura por debajo de la zona de pinzado, se removieron los ovarios utilizando una hoja de afeitar estéril. Luego de verificar la ausencia de sangrado, se procedió a reintroducir los cuernos uterinos en la cavidad peritoneal y cada incisión fue suturada. Se permitió a los animales recuperarse de la anestesia en el laboratorio, bajo estricto monitoreo y posteriormente se los devolvió al bioterio, donde permanecieron en jaulas individuales hasta el momento de la eutanasia (Richeri y col., 2010). No se observaron signos de malestar o infecciones en los animales ovariectomizados. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con los protocolos de manejo de animales oportunamente aprobados por la Comisión de Bioética del IIBCE.

6.3 Tratamiento con Estrógeno

Las ratas ovariectomizadas fueron tratadas por vía subcutánea con tres dosis de 50 µg de 17-β-cipionato de estradiol (Laboratorio König, Argentina) diluido a dosis apropiada con aceite de maní (Sigma, EEUU). Las inyecciones fueron administradas en los días 5, 7 y 9 luego de la ovariectomía y las ratas fueron eutanizadas en el día 10 (Richeri y col., 2010). Los animales control se trataron con vehículo siguiendo el mismo protocolo de administración que los animales estrogenizados.

6.4 Tratamiento con 5-hydroxydopamina (5-OHDA)

Para realizar la visualización de los nervios simpáticos por microscopía electrónica de transmisión, animales prepúberes (n=2) fueron inyectados IP con 100 mg/kg de 5-OHDA (Sigma, EEUU) diluida en suero fisiológico suplementado con 0.2 % de ácido ascórbico (Sigma), y eutanizados 20 horas luego de la administración de la droga (Tranzer and Thoenen 1967; Knight 1980).

7. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

7.1 Principios Generales.

La microscopia electrónica de transmisión (MET) es una técnica que permite la evaluación de la ultraestructura de los componentes celulares y no-celulares presentes en los especímenes biológicos. La principal herramienta utilizada para esta técnica es el microscopio electrónico (Figura 7A), que es un tipo particular de microscopio que utiliza como fuente de iluminación un haz de electrones. Debido a su baja longitud de onda (λ), los electrones permiten obtener niveles de resolución y por ende magnificaciones que no son alcanzables por los microscopios ópticos. La longitud de onda de los electrones puede variarse en función de la diferencia de potencial con la que los mismos son acelerados. Así a 20KV la λ de los electrones es de 0.0859 Å, mientras que a 100kV λ es de aproximadamente 0.0370 Å. El microscopio electrónico presenta otras diferencias respecto de los microscopios ópticos; por ejemplo: (a) utiliza lentes electrónicas (magnéticas o electromagnéticas) en lugar de lentes de vidrio o cuarzo; (b) requiere trabajar en un medio de alto vacío, debido a que los electrones son fácilmente desviados de su trayectoria por las moléculas presentes en el aire; y (c) posee un foco eléctrico, a diferencia del foco mecánico utilizado por los microscopios ópticos. Dado que los electrones tienen un bajo poder de penetración, es necesario que el espécimen sea sumamente fino (aproximadamente 70 nm de espesor) para que los mismos puedan atravesar. Para obtener cortes ultrafinos se utiliza otra herramienta clave para la microscopía electrónica, el ultramicrotomo (Figura 7B), el cual utiliza cuchillas de vidrio (Figura 7C) o diamante, en lugar de las clásicas cuchillas metálicas utilizadas por los microtomos convencionales.

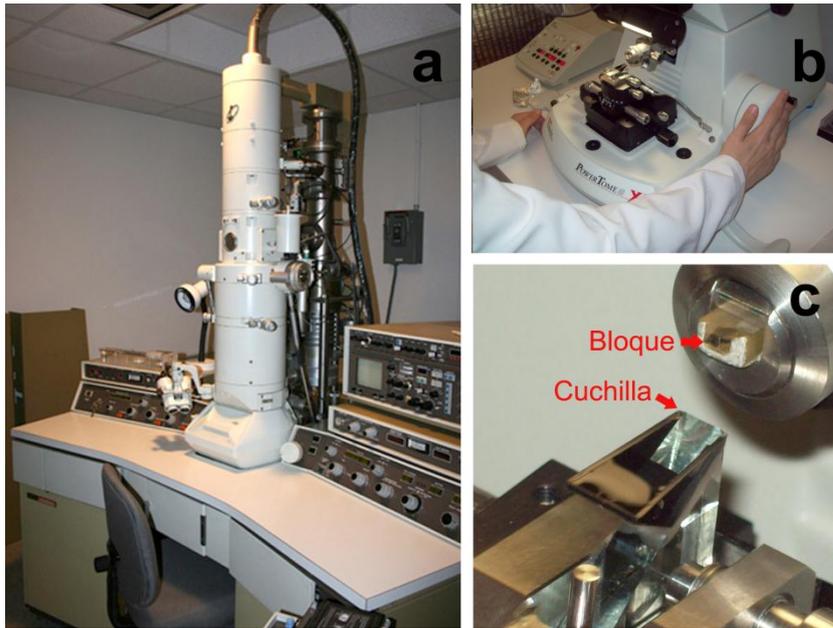


Figura 7. Ilustra imágenes de: (A) Microscopio Jeol 100CX II; (B); Ultramicrotomo Power Tome XL; y (C) Detalle de la cuchilla de vidrio usada para obtener cortes ultrafinos. Estos equipos forman parte de la Unidad de MET del IIBCE.

7.2 Preparación de los tejidos para MET

Las ratas fueron eutanizadas mediante una sobredosis IP de pentobarbital sódico (60 mg/kg; Sigma). Luego de comprobar que el animal no presentaba ningún signo vital, se abrió la cavidad peritoneal y se goteó sobre los cuernos uterinos el líquido fijador compuesto de glutaraldehído al 2,5% diluido en buffer fosfato (0.1M, pH: 7.2-7.4 a 4°C). No se utilizó perfusión para evitar que la torsión natural del útero impidiera obtener muestras alineadas del tejido. Los cuernos uterinos fueron removidos, liberados de grasa y tejido conjuntivo anexo, y bajo el fijador se tomaron muestras de la región medial del cuerno uterino de aproximadamente 2 mm de longitud (Figura 8). Estas muestras fueron fijadas por inmersión durante 24-48 horas adicionales a 4°C. Luego de cumplido ese período, se realizaron 6 lavados de 10 minutos cada uno en buffer fosfato, mantenido a 4°C y con agitación continua. Completado el lavado, se realizó una post-fijación con tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora a 4°C y protegido de la luz. Por ser un metal pesado, el tetróxido de osmio confiere contraste a la muestra, ya que favorece la dispersión elástica de los electrones bajo el MET. Por otra parte, debido a que esta molécula se une a las cabezas polares de los lípidos de membrana, permite la visualización de las membranas celulares.

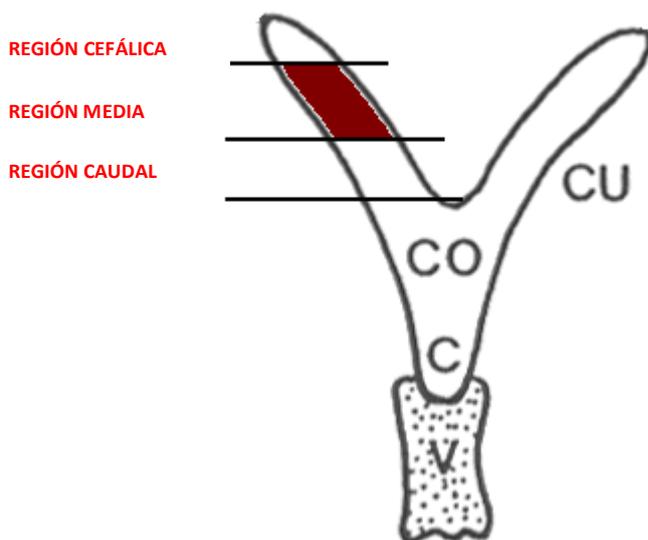


Figura 8. Esquema representativo de la parte inferior del tracto genital femenino de la ratona. En los cuernos uterinos se señala la región seleccionada para ser procesados para su estudio por MET. CU: cuerno uterino; CO: cuerpo uterino; C: cuello, V: vagina.

Cumplido el tiempo de post-fijación, los tejidos fueron lavados durante una hora con buffer fosfato en las mismas condiciones que las anteriormente descritas, para ser luego deshidratados en alcoholes de graduación creciente y acetona absoluta. Finalmente, los tejidos fueron incluidos en la resina epóxica araldita (Durcupan ACM; Fluka, EEUU). Para favorecer la penetración de la resina, los tejidos fueron incubados primero en una mezcla de partes iguales de araldita y acetona absoluta, y luego se realizaron dos pasajes por araldita pura. Posteriormente, los tejidos fueron colocados en moldes apropiados, teniendo especial cuidado en que la orientación del eje mayor del útero estuviera perfectamente alineada con el frente de corte del bloque. La araldita fue polimerizada a 60°C durante toda la noche.

7.3 Obtención y tinción de cortes para MET

Utilizando un ultramicrotomo Power Tome XL y cuchillas descartables de vidrio, se realizaron inicialmente cortes semifinos (250 nm), los cuales fueron montados sobre portaobjetos y coloreados con azul de toluidina borácico al 1%. Estos preparados fueron examinados bajo el microscopio de luz y utilizados para seleccionar las áreas de la capa miometrial longitudinal del útero que serían utilizadas para la posterior realización de cortes ultrafinos (Figura 9). Se realizaron cortes ultrafinos a dos profundidades de cada fragmento de cuerno uterino, para luego ser utilizados en los estudios cuantitativos.

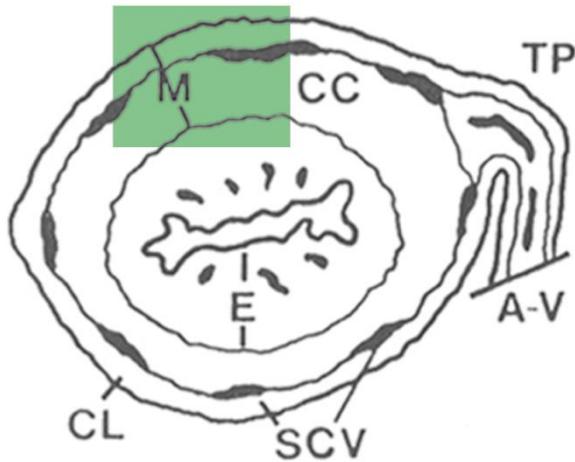


Figura 9. Representación esquemática de un corte transversal de útero de rata. El recuadro de color verde indica la región seleccionada para realizar los cortes ultrafinos para M.E.T. M: miometrio, CL: capa muscular longitudinal, CC: capa muscular circular, SCV: septo conjuntivo vascular, E: endometrio, TP: tejido parametrial, A: arteria uterina, V: vena uterina.

Una vez encontrada la zona de interés, se realizaron cortes ultrafinos de 70 nm de espesor, los cuales fueron montados en grillas de cobre de orificio único y colocados sobre un film de soporte de Formvar (Fluka), (Figura 10). Se tomaron las debidas precauciones al seleccionar la calidad de la cuchilla de vidrio a ser empleada así como la calidad del agua ultra-pura utilizada.



Figura 10. Grillas de cobre de orificio único conteniendo los cortes ultrafinos apoyados sobre el film de Formvar.

Con el fin de aumentar el contraste de las estructuras celulares, los cortes ultrafinos fueron inicialmente teñidos con acetato de uranilo al 2% durante 14-18 horas y protegidos de la luz. Cumplido este periodo, las grillas fueron lavadas con agua ultra-pura y posteriormente contrastadas con citrato de plomo al 1% por 5 minutos. Esta tinción se realizó en una caja de petri, en la cual se colocaron *pellets* de hidróxido de sodio, los que capturan el CO₂ presente en atmósfera y evitan el precipitado del plomo. Posteriormente, las grillas fueron lavadas con agua ultra-pura y guardadas en cajas apropiadas hasta ser observadas en el microscopio electrónico. Los cortes fueron examinados en un microscopio electrónico Jeol 100 CXII operado a 60 kV. Las imágenes digitales fueron capturadas a 14.000 y 19.000 aumentos.

7.4 Método de cuantificación de la orientación del colágeno

De cada corte ultrafino, se tomaron cinco micrografías representativas de las células musculares lisas de la capa miometrial longitudinal y su matriz extracelular circundante. Como se ilustra en la Figura 11 y utilizando el programa ImagePro Plus de Media Cybernetics (EEUU), se midieron los siguientes parámetros: (a) porcentaje de área ocupada por las células musculares lisas SMC (*del inglés: smooth muscle cells*) y su matriz extracelular circundante ECM (*del inglés: extracellular matrix*). Con estos valores se utilizaron además para calcular la relación ECM/SMC; (b) porcentaje de área de ECM perimuscular ocupada por colágeno; y (c) porcentaje de área ocupada por colágeno orientado paralela y no-paralelamente al eje mayor de las células musculares lisas. Los valores obtenidos de las imágenes pertenecientes a los cortes (n=6) de un mismo cuerno uterino fueron promediadas y posteriormente utilizadas en las comparaciones estadísticas. Los datos fueron comparados utilizando el test no-paramétrico de Mann-Whitney y los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

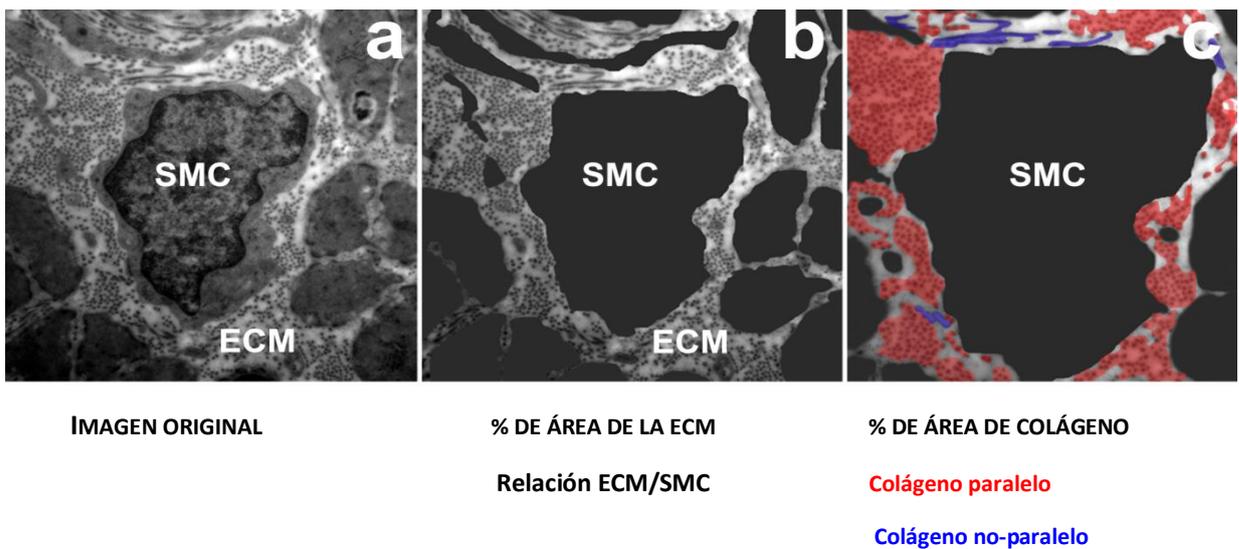


Figura 11. Esquema representativo del método utilizado para cuantificar los cambios en la orientación del colágeno en la matriz extracelular intersticial de la capa longitudinal del miometrio uterino. SMC: células musculares lisas; ECM: matriz extracelular.

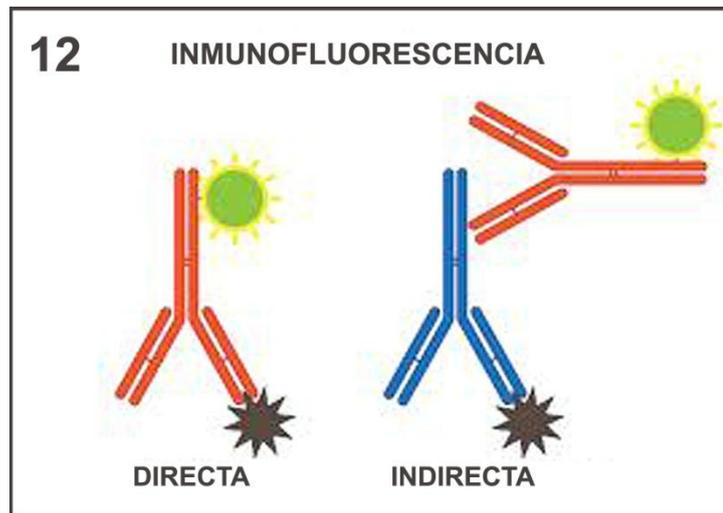
7.5 Cultivo de ganglios simpáticos sobre cortes a congelación de miometrio y análisis ultraestructural del crecimiento neurítico.

Los criocultivos fueron realizados como en estudios previos (Richeri y col., 2010) usando para ello cuernos uterinos de ratas castradas. Los cuernos uterinos fueron removidos en condiciones asépticas, liberados de grasa y tejido conjuntivo circundante, y abiertos longitudinalmente. Los fragmentos de tejido fueron rápidamente colocados sobre platinas pre-enfriadas del crióstato y congelados. Se realizaron cortes de 14 μm de espesor, los cuales fueron colocados con la ayuda de un pincel sobre la base de placas de cultivo plásticas de 35mm (Falcon BD, EEUU), que no presentaban ningún tipo de recubrimiento. Los ganglios cervicales superiores (GCS) fueron obtenidos de ratas hembra neonatales (4–5 días de edad) los cuales luego de ser liberados de la vaina conjuntiva que los rodea, fueron fragmentados en explantos de aproximadamente 500–600 μm de diámetro. Los cultivos fueron realizados utilizando medio Neurobasal desprovisto de suero (Gibco, Invitrogen, EEUU) suplementado con B-27 al 2% (Gibco, Invitrogen), 0.5 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich, EEUU), 1% de una solución de antibióticos (Gibco, Invitrogen) y 0.5 ng/ml de NGF (Harlan Bioproducts for Science, EEUU).

Luego de tres días, los cultivos fueron examinados bajo un microscopio de contraste de fase para evaluar el éxito del crecimiento neurítico, e inmediatamente fijados por 5 minutos a temperatura ambiente con glutaraldehído al 0,5% diluido en buffer fosfato (BF). Las condiciones de esta fijación inicial fueron diseñadas para evitar la retracción de las neutritas. Posteriormente, se continuó la fijación en glutaraldehído al 2,5% por 1 hora a 4°C. Los cultivos fueron posteriormente lavados en BF, post-fijados en tetróxido de osmio al 1%, lavados en BF y deshidratados en alcoholes de graduación creciente hasta alcohol absoluto. Finalmente, los cultivos fueron incluidos en resina Epon (Fluka, EEUU) y polimerizados a 60° por 24 horas. Los ensayos de criocultivo fueron realizados en colaboración con la Lic. Paola Bianchimano. Se realizaron cortes ultrafinos, transversales al eje mayor de las células musculares lisas presentes en el corte empleado como sustrato, los cuales fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo, y examinados bajo el microscopio electrónico.

8. INMUNOHISTOQUÍMICA

8.1 Principios generales. La técnica de inmunohistoquímica se basa en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo y es una técnica ampliamente utilizada para localizar moléculas de interés, principalmente proteínas. Existen dos métodos distintos de inmunohistoquímica, conocidos como métodos directo e indirecto (Figura 12).



El primer método consiste en la utilización de un anticuerpo primario que lleva asociada la marca que permitirá localizar el antígeno en la muestra en estudio. Esta técnica es ventajosa por su sencillez y rápida realización. En el método indirecto se utiliza un anticuerpo primario que reconoce el antígeno, y un anticuerpo secundario marcado que reconoce la región constante de la cadena pesada del anticuerpo primario. Este método, aunque más laborioso, permite amplificar la señal, siendo especialmente útil a la hora de valorar señales débiles presentes en el tejido. En ambos métodos, los anticuerpos son marcados con distintas moléculas, tales como fluorocromos, enzimas, elementos radioactivos u oro coloidal, el que se utiliza para la detección de antígenos en MET. Para nuestros estudios de inmunohistoquímica utilizamos el método de inmunofluorescencia indirecta, y microscopía de epifluorescencia.

8.2 Demostración inmunohistoquímica de los nervios simpáticos e histología

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (60 mg/kg) y perfundidas por vía transcardíaca con 50 ml de solución salina al 0.9% para eliminar la sangre que produce autofluorescencia. Los úteros fueron disecados bajo lupa, liberados de grasa y tejido conjuntivo, y luego extendidos rectos sobre planchas de "silgard" usando micro-agujas para asegurar que los cuernos uterinos se fijaran lo más rectamente posible. Finalizado este procedimiento, los tejidos fueron fijados por inmersión con paraformaldehído al 4% durante 1.30 horas a 4º C y con agitación. Posteriormente, las regiones

medias de los cuernos uterinos, fueron crio-protegidas en sacarosa al 12% a 4°C por 12 horas y congeladas encastradas en un medio apropiado para su congelación (Tissue Freezing Medium; Shandon, EEUU).

Utilizando un crióstato Leika, se realizaron cortes a congelación de 8 µm de espesor y transversales al eje mayor del cuerno uterino, los cuales fueron montados sobre portaobjetos previamente gelatinizados. Para demostrar los nervios simpáticos se utilizó un anticuerpo primario policlonal generado en conejo contra la tirosina hidroxilasa, enzima que regula la síntesis de noradrenalina (dilución 1:400; Pierce Biotechnology, EEUU). La incubación se realizó toda la noche a temperatura ambiente y en una cámara húmeda. Finalizado este periodo, los cortes fueron lavados en PBS (buffer fosfato salino) durante 1 hora e incubados en un anticuerpo secundario realizado en cabra y marcado con FICT (1:400, Chemicon, EEUU) durante 1.30 horas a temperatura ambiente. Luego de lavar el anticuerpo secundario en PBS, los cortes fueron teñidos con azul de toluidina borácico al 0,05% durante 30 segundos, lavados en PBS y montados en Citifluor (Reino Unido).

Los preparados se examinaron bajo un microscopio Nikon E800 equipado con epifluorescencia y usando el filtro B2E (EX 450-490; B 520-560) y la histología se evaluó en el mismo microscopio bajo campo claro. Las imágenes se capturaron utilizando una cámara digital monocroma refrigerada CoolSnap, asociada al programa ImagePro Plus, ambos de Media Cybernetics. De cada corte de cuerno uterino (2 cortes por cuerno), se tomaron pares de imágenes digitales de 4 regiones diferentes de la capa miometrial longitudinal: una imagen de epifluorescencia para visualizar los nervios simpáticos y una de campo claro para evaluar la histología. Utilizando el mismo programa, se superpusieron ambas imágenes y se procedió a contar manualmente el número de nervios simpáticos que se asociaban con los haces musculares miometriales y el número de axones que cursaban por las áreas de tejido conjuntivo que separaban dichos haces (Figura 13). Los datos obtenidos de cada cuerno uterino fueron promediados.

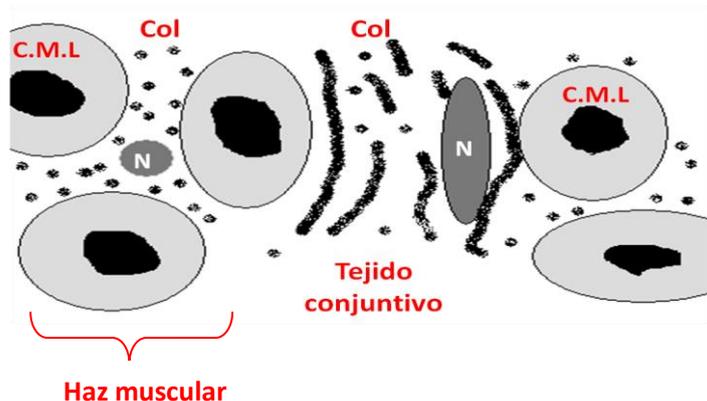


Figura 13. Esquema representativo de la región de la capa miometrial longitudinal de un corte transversal de útero. Col: Colágeno; C.M.L: Células musculares lisas; N: Nervios (ubicados en los haces musculares, como en el tejido conjuntivo que separa a los mismos).

9. RESULTADOS

9.1 Efectos del estrógeno sobre la orientación del colágeno en el miometrio de ratas adultas ovariectomizadas

En la capa miometrial longitudinal de las ratas adultas ovariectomizadas (OVX), las fibrillas de colágeno que ocupaban la MEC intersticial que rodeaba a las células musculares individuales estaban altamente alineadas y predominantemente orientadas en forma paralela al eje mayor de las células musculares lisas (CML), (Figuras 14a,b; asteriscos). Los estudios cuantitativos (Figura 15), mostraron que el colágeno paralelamente orientado representaba el 83% del área ocupada por el colágeno total en la MEC intersticial (Figura 15a).

Luego del tratamiento con estrógeno a las hembras OVX, las fibrillas de colágeno no se orientaban paralelamente al eje mayor de las CML, sino que las envolvían y presentaban una orientación que era perpendicular a ese eje mayor o presentaban una orientación azarosa, no atribuible al plano de corte (Figuras 14c,d; asteriscos). Las fibrillas de colágeno se mostraban generalmente altamente empaquetadas. Consistentemente con estas observaciones, los estudios cuantitativos (Figura 15a) mostraron que en las ratas OVX tratadas con estrógeno, sólo el 11% del área total ocupada por el colágeno estaba representada por fibrillas que seguían el eje mayor de las CML.

Los estudios cuantitativos también mostraron que el porcentaje de área ocupado por la MEC que rodea a las CML individuales estaba significativamente reducido en las ratas OVX tratadas con estrógeno (Figura 15b) y consistentemente, la relación MEC/CML estaba reducida en estos animales (Figura 15c). A pesar de estos cambios el área total ocupada por el colágeno en la MEC intersticial no sufrió cambios significativos (Figura 15 d).

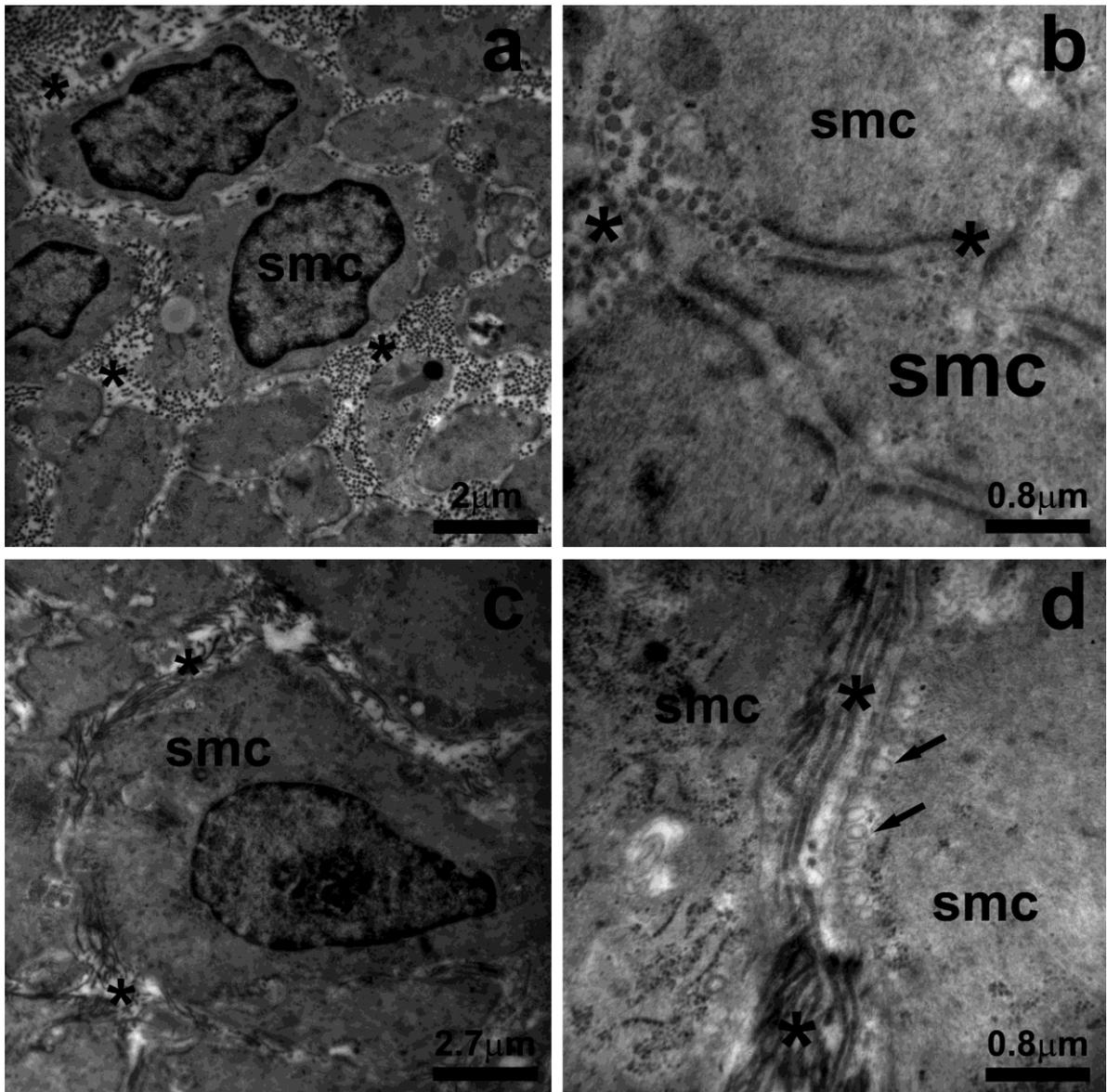


Figura 14. Ilustra imágenes ultraestructurales de cortes transversales del cuerno uterino de ratas ovariectomizadas tratadas con vehículo (a,b) o estrógeno (c,d). En ellas se ilustran los cambios inducidos por el estrógeno en el tamaño de las células musculares lisas (smc: *del inglés smooth muscle cells*) así como en la orientación del colágeno (*) que ocupa la matriz extracelular intersticial que las rodea. Note que en las hembras castradas las fibrillas de colágeno se encuentran cortadas transversalmente y por lo tanto orientadas siguiendo el eje mayor de las células musculares lisas. Luego del tratamiento con estrógeno, la fibrillas de colágeno se orientan perpendicularmente al eje mayor de las células musculares lisas. Las flechas señalan la presencia de numerosas cavéolas, propias de las células musculares lisas maduras.

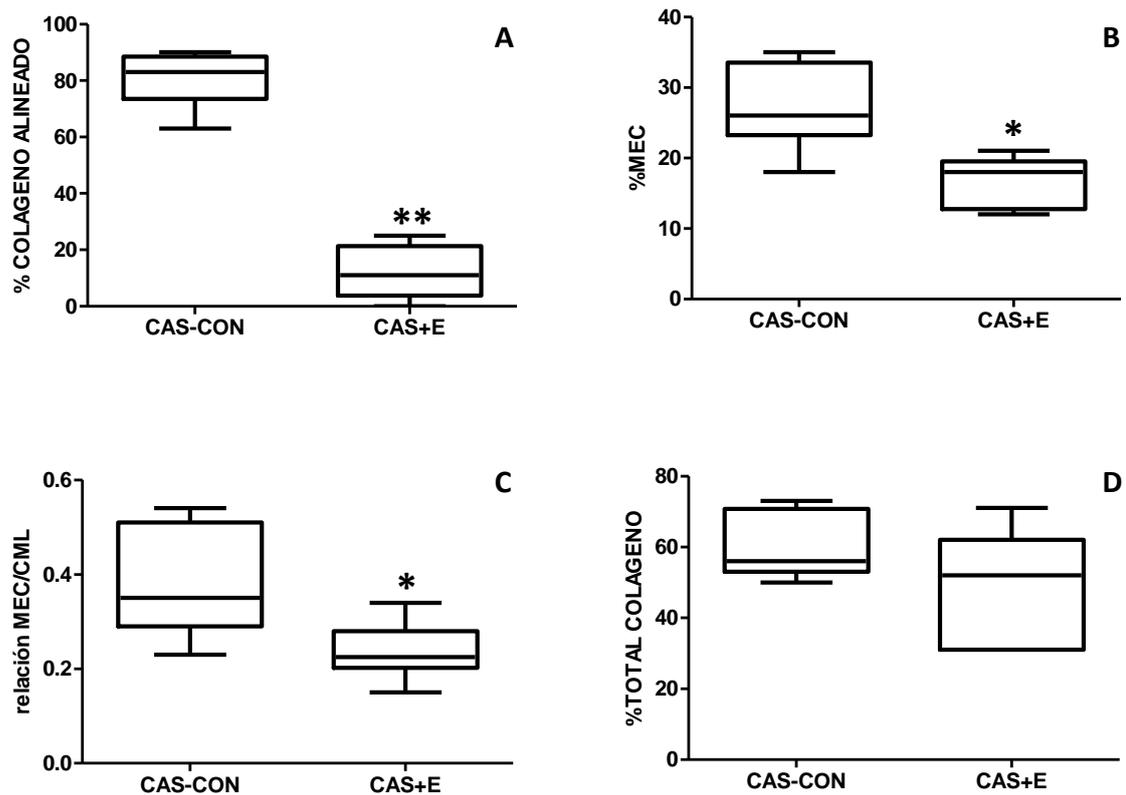


Figura 15. Ilustra los resultados brindados por los estudios morfométricos cuantitativos realizados sobre imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la capa miometrial longitudinal de hembras adultas castradas tratadas con vehículo (CAS-CON) o estrógeno (CAS+E). En ellas se observan los efectos del estrógeno sobre: (A) el porcentaje de área de colágeno total ocupado por colágeno orientado paralelamente al eje mayor de las células musculares lisas (colágeno alineado); (B) el porcentaje del área total de la imagen ocupada por la matriz extracelular (MEC) intersticial que rodea a las células musculares lisas; (C) la relación entre el áreas de la imagen ocupadas por la MEC intersticial y las células musculares lisas (CML); y (D) el porcentaje del área de la MEC intersticial ocupada por el colágeno. Las medianas fueron comparadas utilizando el test no-paramétrico de Mann-Whitney y los valores de $p < 0.05$ considerados estadísticamente significativos. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$.

En el tejido conjuntivo que separa los haces musculares miometriales, se observaron también grandes cantidades de colágeno fibrilar (Figuras 16 a, b; asteriscos), el cual sufrió cambios de orientación similares a los observados en la MEC intersticial luego del tratamiento con estrógeno. Más aún, en las ratas OVX tratadas con estrógeno, las fibrillas de colágeno estaban aparentemente más densamente empaquetadas que en las ratas OVX tratadas con vehículo.

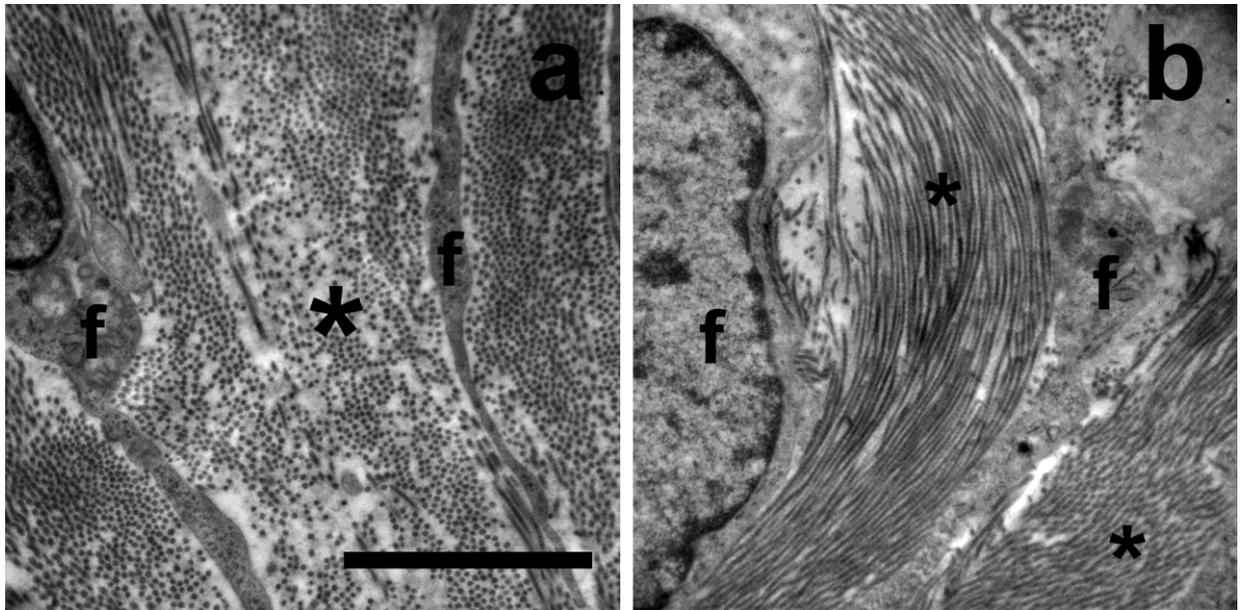


Figura 16. Ilustra imágenes ultraestructurales de cortes transversales del cuerno uterino de ratas ovariectomizadas tratadas con vehículo (a) y estrógeno (b). En ellas se observan regiones del tejido conjuntivo que separan los haces de miometriales. Nótese que en los controles, las fibrillas de colágeno (*) se encuentran orientadas siguiendo el eje mayor del cuerno uterino, mientras que la ratas estrogenizadas, el colágeno (*) tiene una orientación predominantemente perpendicular a dicho eje. f, fibroblastos. Barra de calibración 4 μ m.

9.2 Análisis ultraestructural del crecimiento neurítico en criocultivo

Al comienzo del cultivo, la superficie expuesta del corte a congelación usado como sustrato presentaba perfiles celulares cortados a diferentes profundidades, membranas celulares, áreas de MEC intersticial y tejido conjuntivo (datos no mostrados). Contrariamente, luego de tres días en cultivo, la mayor parte de los componentes celulares antes mencionados no eran ya identificables bajo el microscopio electrónico; y la mayor parte del corte estaba compuesto por un material amorfo en el que se observaban grandes cantidades de colágeno fibrilar (Figura 17a). Asociadas a la superficie libre del corte usado como sustrato (Figuras 17 b, c), se observaron numerosas neuritas, las cuales establecían contactos estrechos con las fibrillas altamente alineadas presentes en esa superficie. También, se observaron numerosas células no-neuronales ganglionares que migraban sobre la superficie del corte de tejido y en algunos casos presentaban incipientes procesos celulares que parecían comenzar a envolver a las neuritas en crecimiento (Figura 17c).

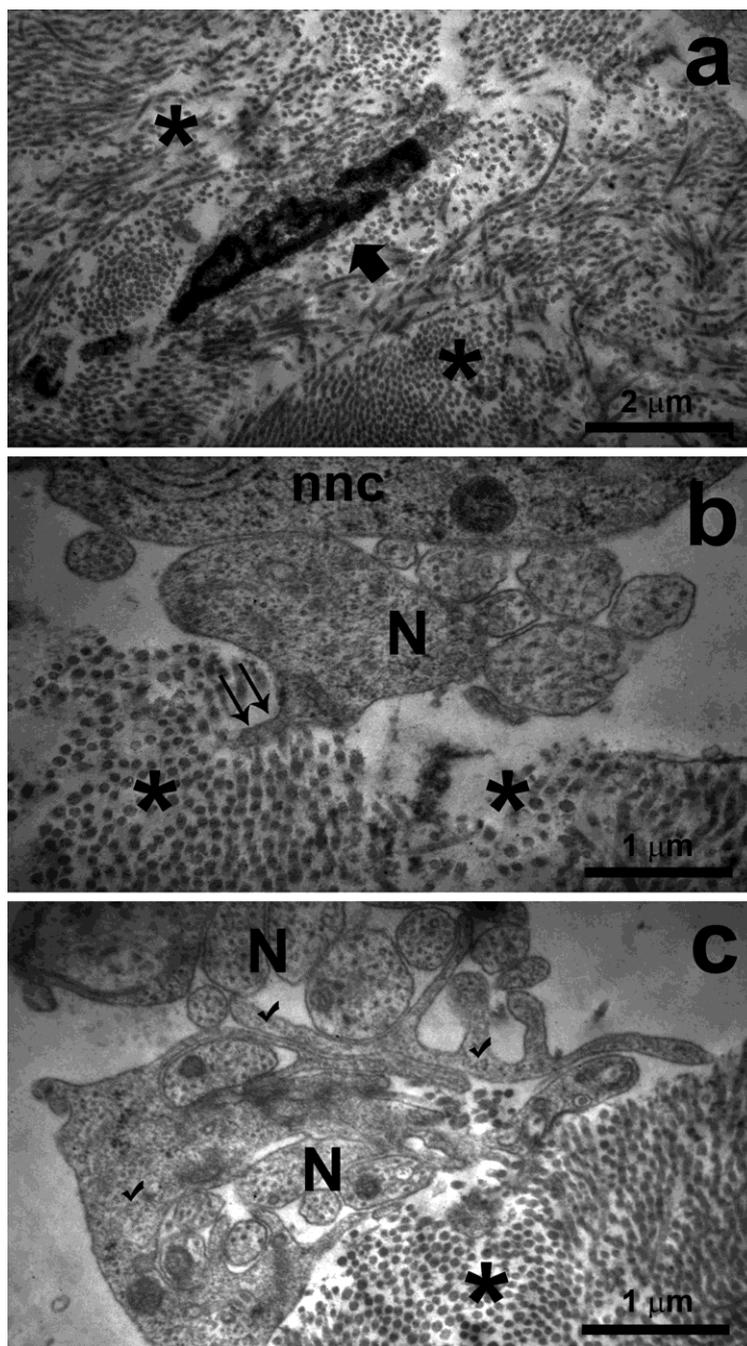


Figura 17. Ilustra imágenes ultraestructurales de los criocultivos sobre cortes a congelación de miometrio de ratas ovariectomizadas tratadas sólo con vehículo. En la figura a, se observa la apariencia del corte miometrio luego de 3 días en cultivo. Nótese que la mayor parte del mismo está compuesto por un material amorfo que contiene grandes cantidades de colágeno fibrilar (*) y sólo se observa el resto de un núcleo (flecha). En las figuras b y c, se observan neuritas (N) creciendo en contacto directo con los haces alineados de colágeno fibrilar (*). En la figura b, se observa una célula no-neuronal (nnc del inglés: *non-neuronal cells*) que ha migrado desde el ganglio. En la figura d, se observa que procesos celulares de estas células no-neuronales (posiblemente células de Schwann) forman delicados procesos celulares (V) que parecen envolver a las neuritas en crecimiento.

9.3 Estudio de la distribución de los nervios simpáticos en el miometrio uterino

Con el fin de avanzar en la interpretación de la relevancia funcional de los cambios en la orientación del colágeno antes descritos, analizamos si los nervios simpáticos asociados con el miometrio se distribuían en las áreas de la MEC donde se detectaron estos cambios. Aunque en nuestro proyecto inicial propusimos realizar este estudio sobre animales adultos OVX, el examen de su inervación simpática mediante inmunohistoquímica mostró que la mayor parte de estos nervios se distribuían alrededor de los grandes vasos sanguíneos que ocupan el plexo vascular que separa ambas capas miometriales (Figura 18 a), mientras que sólo unas pocas fibras se observaron en relación con el miometrio, estando las mismas mayormente concentradas en la región antimesometrial del cuerno uterino (Figura 18 b). Dado que esto limitaba nuestras posibilidades de realizar el estudio propuesto, utilizamos para las mismas ratas prepúberes de 27 días de edad. Esta elección fue considerada válida, ya que estudios recientes de nuestro grupo ([Martínez y col., 2011](#)) mostraron que la pubertad natural también provoca cambios sustanciales en la orientación del colágeno intersticial que rodea a las CML de la capa miometrial longitudinal.

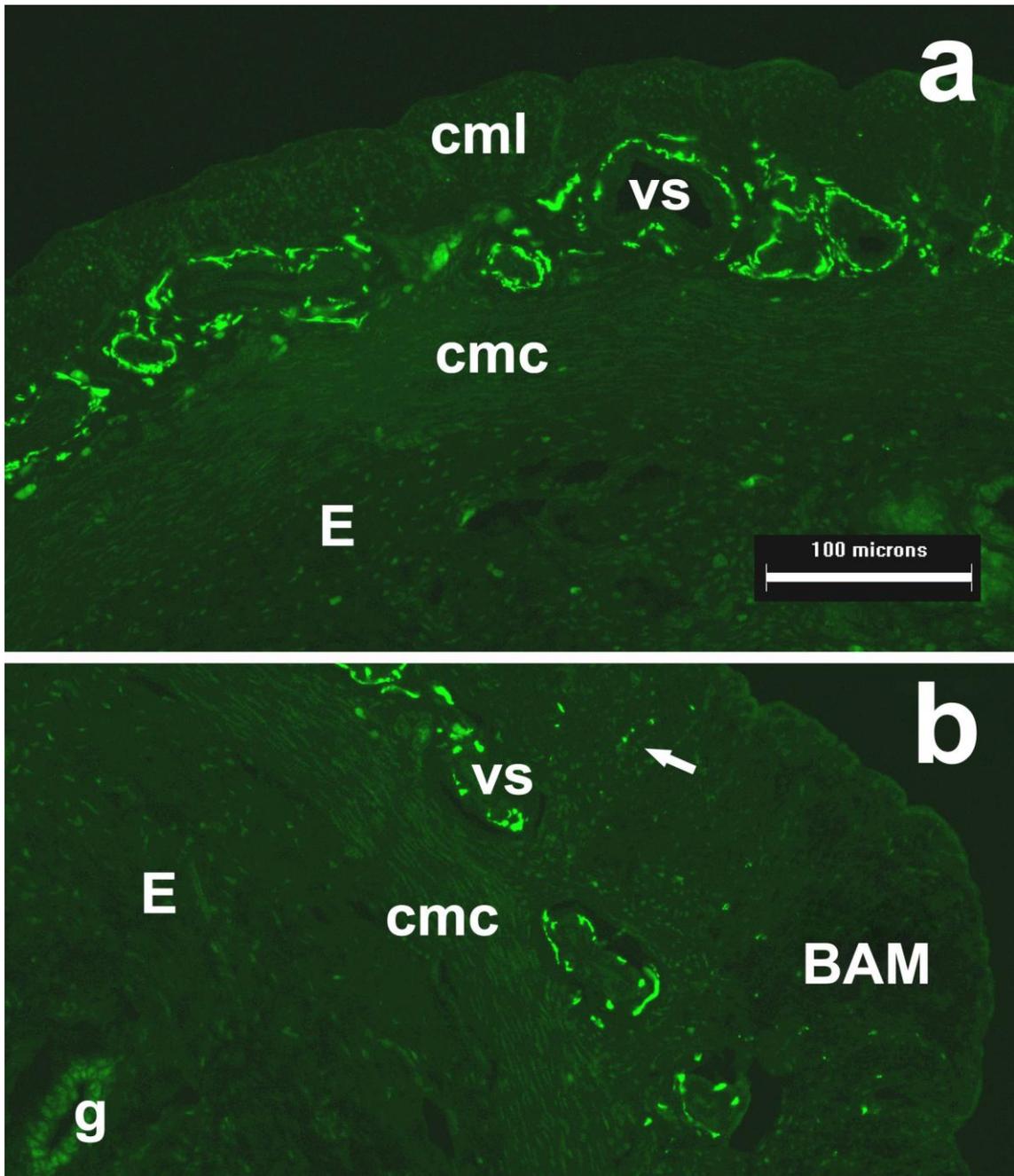


Figura 18. Se ilustran cortes a congelación transversales al eje mayor del cuerno uterino de ratas adultas, a 10 días luego de la ovariectomía. En ellos se observan fibras nerviosas simpáticas inmuno-marcadas con un anticuerpo contra la tirosina hidroxilasa. (a) Muestra un aspecto lateral del cuerno uterino, en donde se reconocen vasos sanguíneos (vs) que presentan una rica inervación simpática. No se ve que ni la capa miometrial longitudinal (cml), ni la capa miometrial circular (cmc) o el endometrio (E) presentan inervación simpática. (b) Muestra el borde antimesometrial (BAM) del cuerno uterino, donde se observan algunas delicadas fibras simpáticas asociadas con el músculo liso de esta región (flecha). g: glándula endometrial.

En las ratas prepúberes, se observó una rica inervación simpática asociada con la capa miometrial longitudinal y los vasos sanguíneos intra-miometriales (Figura 19a). Los estudios cuantitativos realizados luego de superponer la imagen de los nervios (Figura 19c) a las imágenes histológicas (Figura 19 b) mostraron que el 96% de los axones simpáticos miometriales se encontraban asociados con los haces musculares, mientras que sólo un 4% de los axones cursaba por el tejido conjuntivo que separaba dichos haces.

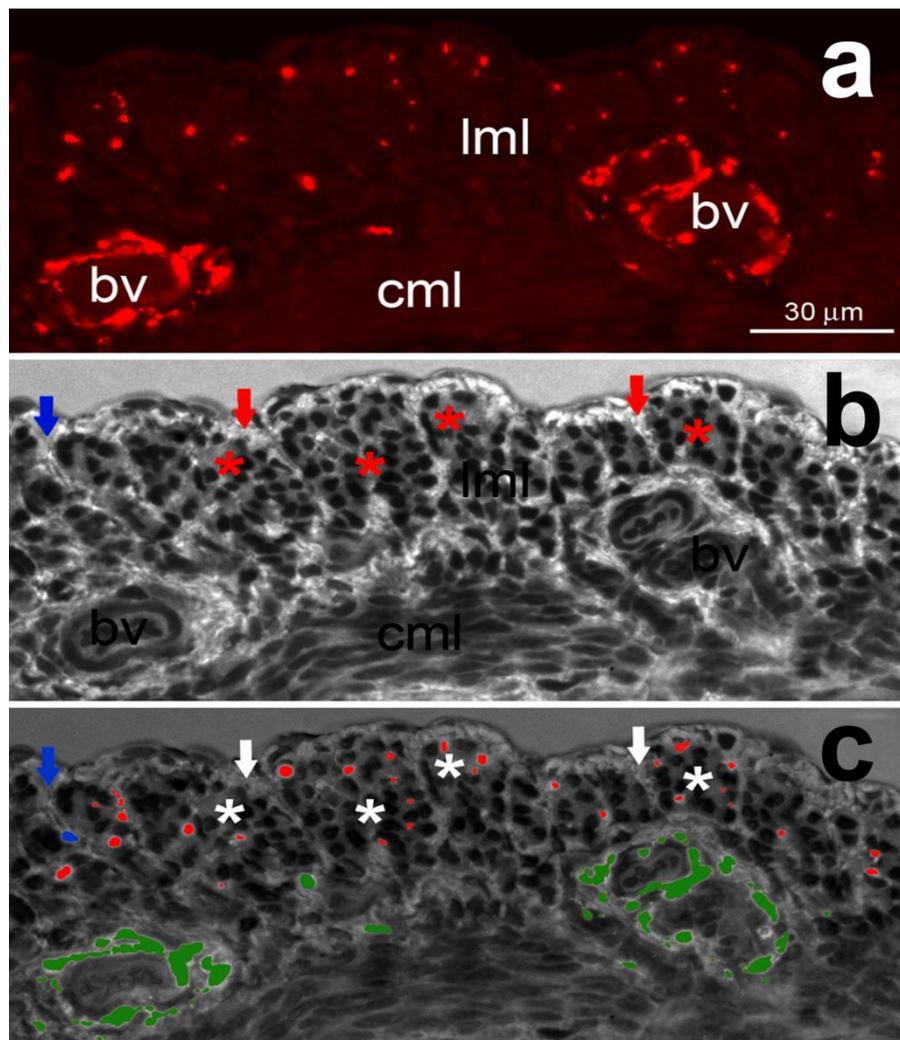


Figura 19. Las imágenes ilustran el método utilizado para cuantificar el número de axones asociados con los haces musculares y el tejido conjuntivo que los separa en la capa miometrial longitudinal de una rata prepuber. En la figura a, se muestra una imagen de inmunofluorescencia en la que se observa la inervación simpática del útero (anti-tirosina hidroxilasa). Se observan numerosas fibras nerviosas asociadas con la capa miometrial longitudinal (lml *del inglés: longitudinal muscle layer*) y los vasos sanguíneos (bv) que se localizan entre la lml y la capa miometrial circular (cml *del inglés: circular muscle layer*). En la figura b, se observa la misma región del corte, ahora visto en campo claro y luego de ser teñido con azul de toluidina. Los asteriscos señalan los haces musculares y las flechas el tejido conjuntivo que separa dichos haces. En la figura c, se ilustra la superposición de ambas imágenes. En rojo, se han coloreado las fibras nerviosas asociadas con los haces musculares lisos; en azul, las fibras nerviosas que cursan por el tejido conjuntivo y en verde, los nervios asociados a los vasos sanguíneos. Nótese que la gran mayoría de las fibras nerviosas están asociadas a los haces musculares (rojas).

En concordancia con estas observaciones, los estudios ultraestructurales de los nervios simpáticos marcados con el falso neurotransmisor 5-OHDA revelaron la presencia de delicados perfiles de axones terminales cursando por la matriz altamente alineada de colágeno que rodea a las células lisas inmaduras del miometrio uterino de las ratas prepuberes (Figura 20).

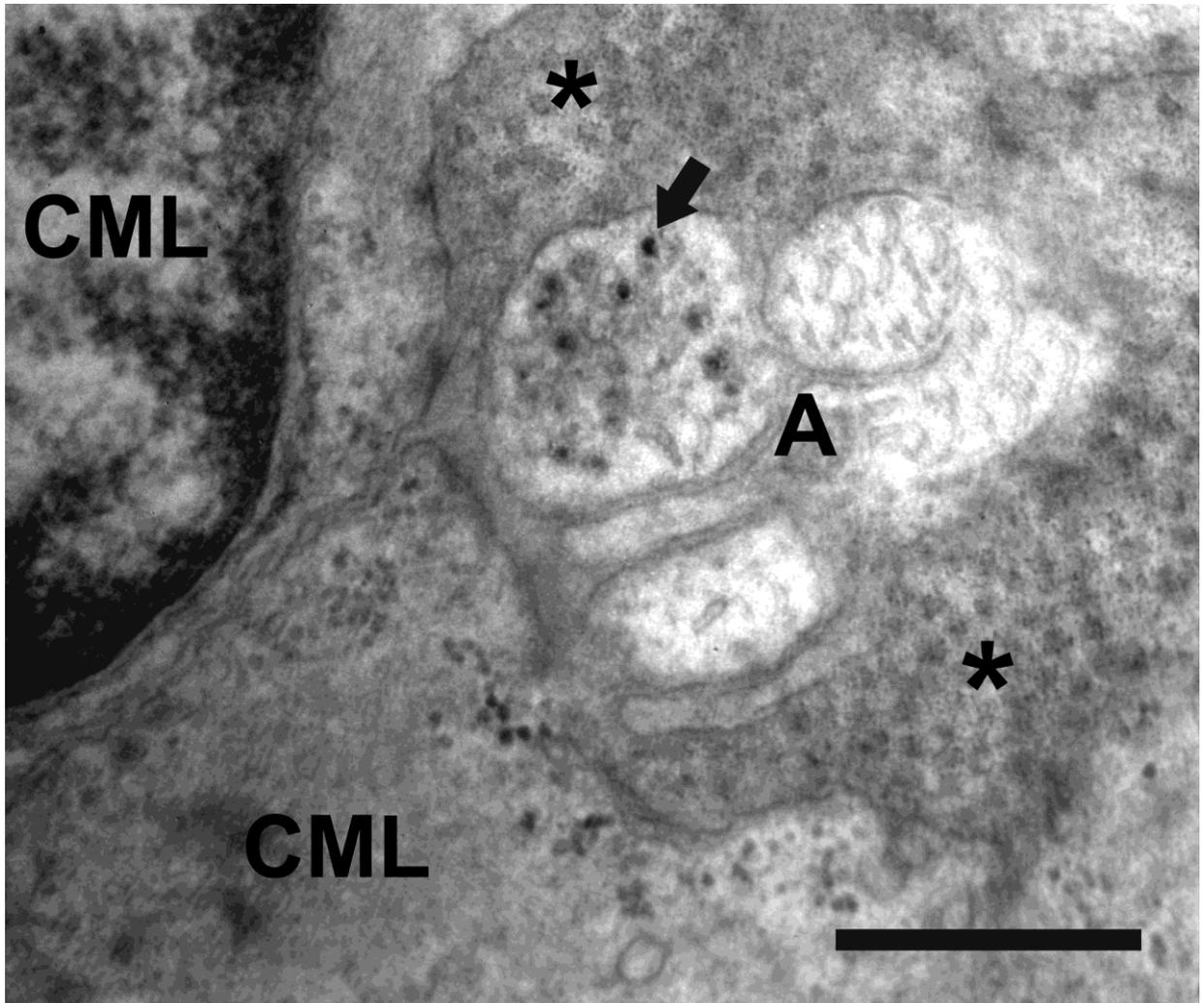


Figura 20. Ilustra una imagen ultraestructural de un grupo de axones nerviosos terminales en corte transversal (A), localizados en el miometrio de una rata prepuber. Uno de estos axones presenta vesículas con un contenido denso, que representa al falso neurotransmisor 5-hidroxidopamina (flecha), lo que permite caracterizar su naturaleza simpática. Note que estos axones cursan en una matriz altamente alineada de fibrillas de colágeno (*) y muy próximos a la superficie de las células musculares lisas inmaduras (CML).

10. DISCUSION

El comportamiento dinámico mostrado por los nervios simpáticos del miometrio uterino en respuesta a cambios fisiológicos y experimentales en los niveles de estrógeno ha sido ampliamente caracterizado ([revisado por Brauer 2008](#)). Sin embargo, nuestro conocimiento de los factores celulares y moleculares que regulan esta particular forma de plasticidad es aun fragmentario.

Estudios tempranos mostraron que alrededor del 70% del miometrio de los humanos y la rata se encuentra constituido por músculo liso, sin embargo, el miometrio también contiene grandes cantidades de matriz extracelular (MEC) ([Schwalm y Dubrauszky, 1966](#); [Shynlova y col., 2004](#)). La MEC uterina contiene moléculas con la capacidad de promover el crecimiento neurítico, tales como la laminina, la fibronectina y el colágeno; así como señales con efectos inhibitorios para el crecimiento nervioso, tales como ciertos proteoglicanos ([Hynds y Snow, 2001](#); [Li y col., 2008](#); [Giger y col., 2010](#)).

Teniendo en cuenta que en el útero, tanto el estrógeno como el embarazo provocan cambios sustantivos en la composición y arquitectura de la MEC ([Ross y Klebanoff, 1971](#); [Munakata y col., 1984](#); [Cidadão y col., 1990](#); [Borel, 1991](#); [Stewart y col., 1995](#); [Slater y Murphy 1999](#); [Shynlova y col., 2004](#)), se planteó la posibilidad de que estos cambios pudieran contribuir a regular la plasticidad mostrada por la innervación uterina. En ese contexto, un estudio previo ([Richeri y col., 2010](#)) dio apoyo inicial a la hipótesis de que las señales presentes en el sustrato uterino afectan profundamente el patrón de crecimiento de los nervios simpáticos; y mostro que el estrógeno modifica ciertas propiedades del sustrato uterino haciéndolo menos capaz de sustentar el crecimiento de estos nervios.

Considerando la relevancia del colágeno en la extensión y orientación del crecimiento neurítico y basados en observaciones preliminares ([Martínez y col., 2009](#); [Richeri y col., 2010](#)), en el presente estudio analizamos los efectos del estrógeno sobre la orientación del colágeno, usando como modelo ratas adultas ovariectomizadas. Los resultados cuantitativos obtenidos confirmaron y extendieron las observaciones preliminares, y mostraron que el estrógeno provoca cambios dramáticos en la orientación del colágeno que rodea a las células musculares miometriales. Estos resultados apuntan a confirmar la hipótesis planteada y sugieren que cambios en la orientación del colágeno podrían contribuir a la reducción en la extensión del crecimiento neurítico que observamos en los ensayos de criocultivo ([Richeri y col., 2010](#)).

Los factores que determinan los cambios de orientación en el colágeno miometrial luego de la exposición al estrógeno no son claros todavía. Dado que las células miometriales crecen marcadamente en respuesta al estrógeno, es posible que este crecimiento “comprima” la MEC que las rodea y de esta forma provoque los cambios observados en la orientación del colágeno. Esta posibilidad se ve apoyada por la observación de que el estrógeno reduce significativamente el tamaño de la MEC intersticial y la relación MEC/células musculares lisas. Sin embargo, no se observaron cambios en el área total ocupada por el colágeno, sugiriendo que la reducción observada en la proporción de la MEC intersticial se realice a expensas de la matriz amorfa en la que se encuentra embebido el colágeno.

La remodelación del colágeno no es un evento inusual en la vida del útero. El colágeno es la proteína más abundante del cuello uterino y el colágeno fibrilar (tipo I) es la mayor proteína estructural encargada de brindar la fuerza de tensión que requiere el órgano para mantener al feto durante su desarrollo. Sin embargo, al acercarse el parto, el cuello uterino debe hacerse más laxo para permitir el pasaje del feto. La pérdida de fuerza de tensión que ocurre en el cuello uterino (ablandamiento) se asocia con profundos cambios estructurales en el colágeno cervical (Timmons y col., 2010). Cambios en el alineamiento del colágeno también han sido demostrados en ciertas condiciones patológicas. Por ejemplo, en la diabetes experimental provocada en ratones por la administración de haloxano, se observó un marcado aumento del tamaño de los espacios intercelulares en la capa longitudinal del miometrio uterino, el cual se asociaba con una desorganización del colágeno fibrilar, que dejaba de presentar su orientación paralela al eje mayor de las células musculares lisas (Favaro y col., 2010). En los leiomiomas uterinos, que son tumores benignos de músculo liso comúnmente conocidos como fibromas, se detectan cambios marcados en la estructura y orientación del colágeno que difiere de la organizada orientación observada en el miometrio normal circundante (Leppert y col., 2004). También en el endometrio, se observan cambios mayores en la organización del colágeno que rodea a las células deciduales durante las etapas tempranas de la gestación (Carbone y col., 2006).

Con el fin, de avanzar en el significado funcional de los cambios observados en la orientación del colágeno miometrial en respuesta al estrógeno, analizamos si en los criocultivos las neuritas en crecimiento utilizaban el colágeno presente en el corte de miometrio uterino de ratas adultas OVX usado como sustrato. Utilizando microscopía electrónica, observamos que luego de tres días en cultivo, un gran número de neuritas crecían próximas a las altamente alineadas fibrillas de colágeno presentes en la superficie expuesta del corte usado como sustrato; y en algunos casos, formaban asociaciones estrechas con estas estructuras. Como se mencionara anteriormente, en experimentos

de criocultivo se observó que las neuritas crecían sobre las regiones del corte ocupada por musculo liso evitando el tejido conjuntivo; y que lo hacían preferentemente siguiendo el eje mayor de las células musculares lisas, siendo capaces de cambiar su curso de crecimiento para adaptarse a esta orientación (Figura 21). Los resultados actuales proporcionan una interpretación para estas observaciones, y sugieren que en las hembras adultas castradas, las neuritas crecen utilizando como guía las fibrillas de colágeno.

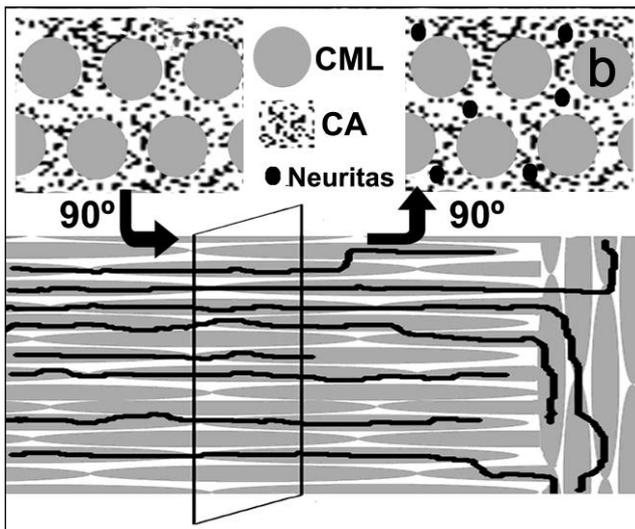


Figura 21. Esquema representando la concordancia existente entre la orientación del eje mayor de las células musculares lisas (CML), las fibrillas de colágeno en alineado (CA) y las neuritas en crecimiento en las ratas adultas ovariectomizadas.

Imagen tomada de Richeri y col., 2010.

Finalmente, analizamos si *in situ*, los nervios simpáticos utilizaban como área de distribución las regiones del miometrio donde se detectaron cambios en la orientación del colágeno. Sorprendentemente, las hembras adultas ovariectomizadas no presentaron incrementos notorios en la densidad de los nervios simpáticos asociados al miometrio, incluso a 10 días luego de la castración. Esto contrasta claramente con los efectos de la ovariectomía en animales prepúberes, la cual provoca un aumento sustantivo en la densidad de la inervación miometrial (Chávez-genaro y col., 2002). De manera similar, en ensayos de criocultivos se observó que los ganglios provenientes de ratas neonatales presentaban un crecimiento neurítico muy superior al mostrado por las neuronas adultas (Richeri y col., 2010). Es posible que la diferente capacidad de crecimiento de las neuronas juveniles y adultas pueda explicar las diferencias observadas tanto *in vivo* como *in vitro*.

Sin embargo, en los ensayos llevados a cabo en ratas prepúberes se pudo observar que, la gran mayoría de los nervios simpáticos miometriales se presentaban asociados con los haces musculares lisos y una pequeña proporción de nervios cursaba por los tabiques de tejido conjuntivo que

separaban estos haces musculares. Observaciones similares fueron realizadas en los ensayos de criocultivo (Richeri y col., 2010).

Nuestros estudios ultraestructurales mostraron que el tejido conjuntivo que separa los haces miometriales presenta grandes cantidades de colágeno fibrilar, el cual al igual que el colágeno intersticial, presentaba cambios de orientación en respuesta al estrógeno. Aunque los factores que impiden la distribución de los nervios simpáticos en los espacios conjuntivos inter-musculares no son claros aún, algunas explicaciones podrían ser postuladas. Por ejemplo, análisis de hibridización *in situ* realizado en ratas prepuberes (Richeri y col., 2011), mostraron la presencia de transcritos de Semaforina 3F en el tejido conjuntivo que separa los haces musculares y demostró que su expresión es aumentada por el estrógeno. Dado que Sema3F es una señal neuro-repulsiva para los nervios simpáticos, es posible postular que la misma contribuya a repeler a los nervios simpáticos del tejido conjuntivo, y de esta forma guiarlos hacia su efector definitivo que es el músculo liso miometrial.

Tomados en su conjunto, los resultados presentados en este trabajo apoyan la hipótesis que la reorganización del colágeno en respuesta al estrógeno podría ser uno de los factores que contribuyen a la compleja regulación de la plasticidad mostrada por los nervios simpáticos en respuesta al estrógeno. Esta posibilidad se ve apoyada por experimentos que muestran que *in vitro*, el colágeno alineado magnéticamente promueve un crecimiento neurítico mayor que el colágeno hidratado con configuración de gel (orientación aleatoria). Este aumento ha sido atribuido a una respuesta de los conos de crecimiento a la guía por contacto ofrecida por el colágeno alineado (Dubey et al. 1999). Finalmente, cabe resaltar que el colágeno constituye el sitio de anclaje de otras moléculas de la matriz extracelular, tales como algunos proteoglicanos, especialmente la decorina (Pins y col., 1997; Berto y col., 2003; Orgel y col., 2009; Sanches y col., 2010). Es posible que los cambios en la orientación del colágeno afecten la distribución espacial de estas moléculas, afectando así también el crecimiento de las neuritas. Trabajos futuros serán necesarios para evaluar estas interesantes posibilidades.

11. REFERENCIAS

- Anton E.S., Sandrock A.W., Matthew W.D., (1994). Merosin promotes neurite outgrowth and Schwann cell migration in vitro and nerve regeneration in vivo. *Dev. Biol.* 164: 133.
- Becker C.G., Becker T.T., (2002). Repellent guidance of regenerating optic axons by chondroitin sulphate glycosaminoglycans in Zebrafish. *J. Neurosci.* 22: 842.
- Berto A.G.A., Sampaio L.O., Franco., C.R.C., Cesar R. M., Michelacci Y.M., (2003). A comparative analysis of structure and spatial distribution of decorin in human leiomyoma and normal myometrium. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1619: 98-112.
- Bianchimano P., Frías A.I., Richeri A., Brauer M.M., (2007). Effects of dexamethasone on estrogen- and pregnancy-induced plasticity in rat uterine sympathetic nerves. *Tissue Res.* 330(3): 413-25.
- Borel J.P., (1991). Uterine collagens. General review. *Rev Fr Gynecol Obstet.* 86(12): 715-22.
- Brauer M.M., (2008). Cellular and molecular mechanisms underlying plasticity in uterine sympathetic nerves. *Auton Neurosci.* 140: 1-16.
- Brauer M.M., 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.
- Brauer M.M., Chávez-Genaro 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 M.M., Corbacho A.M., Burnstock G., (1995). Effects of chronic and acute oestrogen treatment on the developing noradrenaline-containing nerves of the rat uterus. *Int J Dev Neurosci.* 13: 791-8.
- Brauer M.M., Lilcoln J., Blundell D., Corbacho A., (1992). Postnatal development of noradrenaline-containing nerves of the rat uterus. *J. Anaton Nerv Syst.* 39: 37-49.
- Carbone K., Pinto N.M.P., Abrahamsohn P.A., Zorn T.M.T., (2006). Arrangement and fine structure of collagen fibrils in the decidualized mouse endometrium. *Microscopy research and technique.* 69: 36-45.
- Ceballos D., Navarro X., Dubey N., Gwen W.C., Kennedy W.R., Tranquillo R.T., (1999). Magnetically Aligned Collagen Gel Filling a Collagen Nerve Guide Improves Peripheral Nerve Regeneration. *Experimental Neurology.* 158: 290-300.
- Chávez-Genaro R., Crutcher K., Viettro L., Richeri A., Coirolo N., Burnstock G., Cowen T., Brauer M.M., (2002). Differential effects of oestrogen on developing and mature uterine sympathetic nerves. *Cell Tissue Res.* 308: 61-73.
- Cidadao A.J., Thorsteinsdottir S., David-Ferreira J.F., (1990). Immunocytochemical study of tissue distribution and hormonal control of chondroitin-, dermatan- and keratan sulfates from rodent uterus. *Eur. J. Cell Biol.* 52: 105.
- Corbacho A.M., Brauer M.M., Pérez T., (1997). Development and maturation of noradrenaline-containing nerves of the rat uterine artery. Effects of acute and chronic oestrogen treatment. *Int J Dev Neurosci.* 15: 363-371.
- Dubey N., Letourneau P.C., Tranquillo R.T., (1999). Guide neurite elongation and Schwann cell invasion into magnetically aligned in simulated peripheral nerve regeneration. *Experimental Neurology.* 158: 338-350.
- Favaro R. R., Salgado R. M., Raspantini P. R., Fortes Z. B., Zorn T. M. T., (2010). Effects of long-term diabetes on the structure and cell proliferation of myometrium in the early pregnancy of mice. *Int. J. Exp. Path.* 91: 426-435.

- Gavazzi I., Boyle KS, Cowen T., (1996). Extracellular matrix molecules influence innervation density in rat cerebral blood vessels. *Brain Res.* 743: 167.
- Giger R.J., Hollis E.R., Tuszynski M.H., (2010). Guidance molecules in axon regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2(7): a001867.
- Houdeau E., Rosseau A., Meusnier C., Prud'Homme M.J., Rousseau J.P., (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.
- Huebner E.A., Strittmatter S.M., (2009). Axon regeneration in the peripheral and central nervous systems. *Probl Cell Differ.* 48: 339-351.
- Hynds D.L., Snow D.M., (2001). Fibronectin and laminin elicit differential behaviors from SH-SY5Y growth cones contacting inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans. *J. Neurosci. Res.* 66: 630.
- Knight D.S., (1980). A light and electron microscopic study of feline intrapulmonary ganglia. *J. Anat.* 131: 413-428.
- 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.
- Krizsan-Agbas D., Pedchenko T, Smith P.G., (2008). Neurotrimin is an estrogen-regulated determinant of peripheral sympathetic innervation. *J Neurosci Res.* 86: 3086.
- Krizsan-Agbas D., Smith PG., (2002). Estrogen modulates myometrium-induced sympathetic neurite formation through actions on target and ganglion. *Neuroscience.* 114: 339.
- Kwok J.C.F., fardad A., Garcia-Alías G., Fawcett J.W., (2008). Proteoglycans in the central nervous system: Plasticity, regeneration and their stimulation with chondroitinase ABC. *Restorative Neurology and Neuroscience.* 26: 131-145.
- Leppert P.C., Thomas Baginski M.S., Cara Prupas B.A., William, H:C., Susan Pletcher, B.S and James H. Segars., (2004). Comparative ultrastructure of collagen fibrils in uterine leiomyomas and normal myometrium. *Fertility and Sterility.* 3: 3
- Li X., Gao, X., Liu, G., Xiong W., Wu J., Rao Y., (2008). Netrin signal transduction and the guanine nucleotide exchange factor DOCK180 in attractive signaling. *Nat Neurosci.* 11(1): 28-35.
- 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.
- Madduri S., Gander B., (2011). Growth factor delivery system and repair strategies for damaged peripheral nerves. Elsevier B.V.
- Madekurozwa M.C., Oke B.O., Akinloye A.K., (2009). Immunohistochemical localization of the progesterone and oestrogen alpha receptors in the uterine horns of the African giant rat (*Cricetomys gambianus*). *Anat Histol Embryol.* 38: 419-423.
- 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. *Sextas Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular, Montevideo, Uruguay, p75 (Abstract)*
- Martínez G., Brauer M.M., (2011). Papel de la orientación del colágeno en la denervación simpática miometrial inducida por el estrógeno en la pubertad. *Septima Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular, Montevideo, Uruguay.*

- 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.
- Melo C.N. y Machado R.S., (1993). Noradrenergic and acetylcholinesterase-positive nerve fibres of the uterus in sexually immature and cycling rats. *Histochemical Journal.* 25: 113-218.
- Munakata H., Isemura M., Yosizawa Z., (1984). Sulfated proteoglycans synthesized in myometrium of the estrogen-treated rabbit. *Tohoku J Exp Med.* 144(3): 291-7.
- Orgel J.P.R.O., Eid A., Antipova O., Bella J., Scott J. E., (2009). Decorin Core Protein (Decoron) Shape Complements Collagen Fibril Surface Structure and Mediates Its Binding. *Plos one.* 4(9): e7028.
- Papka R.E, Traurig H.H., (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.
- Pins G.D., Christiansen D.L., Patel R., Silver F.H., (1997). Self-Assembly of Collagen Fibers. Influence of Fibrillar Alignment and Decorin on Mechanical Properties. *Biophysical Journal.* 73: 2164-2172.
- Porcionatto M.A., (2006). The extracellular matrix provides directional cues for neuronal migration during cerebellar development. *Brazilian Journal of Medical and Biological research.* 39: 313-320.
- 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.
- Richeri A., Chalar C., Bianchimano P., Greif G., Brauer M.M., (2008). Estrogen regulation of semaphorin expression in the rat uterus. EMBO Workshop "Semaphorin Function and Mechanisms of Action". Abbaye des Vaux de Cernay, France (Resumen presentado en Congreso).
- Richeri A., Chalar C., Martínez, G., Greif G., Bianchimano P., Brauer M.M., (2011). Estrogen up-regulation of semaphorin 3F correlates with sympathetic denervation of the rat uterus. *Auton Neurosci.* 164: 43-50.
- Ross R., Klebanoff S.J., (1971) The smooth muscle cell. 1. In vivo synthesis of connective tissue proteins. *J Cell Biol.* 50: 159–171.
- Salgado R.M., Favaro R.R., San Martin S., Zorn T.M.T., (2009). The Estrous Cycle Modulates Small Leucine-Rich Proteoglycans Expression in Mouse Uterin Tissues. *The Anatomical Record.* 292: 138-153.
- Sanches J. C. T., Jones, C.J. P., Aplin J.D., Lozzo R. V., Zorn, T.T.M. Zorn., Oliveira S.F., (2010). Collagen fibril organization in the pregnant endometrium of decorin-deficient mice. *J. Anat.* 216: 144–155.
- Schwalm H., Dubrauszky V., (1966). The structure of the musculature of the human uterus – muscles and connective tissue. *Am. J. Obstet Gynecol.* 94: 391.
- Shynlova, O., Mitchell, J.A., Tsampalieros, A., Lowell Langile, B., Lye, S.J., (2004). Progesterone and gravidity differentially regulate expression of extracellular matrix components in the pregnant rat myometrium. *Biology of Reproduction.* 70: 986-992.
- Silvera, L.A., Zurbarán de Barrios, C., (2002). La matriz extracelular. El ecosistema de la célula. *Salud Uninorte. Barranquilla (Col).* 16: 9-18.
- Slater M. y Murphy C.R., (1999). Thrombospondin is sequentially expressed and then de-expressed during early pregnancy in the rat uterus. *Histochem J.* 31(7):471-5.
- Stewart E.A., Floor A.E., Jain P., Nowak R.A., (1995). Increased expression of messenger RNA for collagen type I, collagen type II, and fibronectin in myometrium of pregnancy. *Obstet Gynecol.* 86: 417.

- Thorbert G, Alm P, Rosengren E., (1978). Cyclic and steroid-induced changes in adrenergic neurotransmitter level of guinea-pig uterus. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 57: 45-48.
- Timmons, B., Akins, M., Mahendroo, M., (2010). Cervical Remodeling during Pregnancy and Parturition. *Cervical Remodeling during Pregnancy and Parturition.* 21(6): 353-361.
- Tranzer, J.P y Thoenen, H., (1967). Electronmicroscopic localization of 5-hydroxydopamine (3,4,5-trihydroxy-phenyl-ethylamine), a new 'false' sympathetic transmitter. *Experientia.* 23(9): 743-5.
- Van Orden D.E, Goodale D.B, Baker H.A, Farley DB, Bhatnagar R.K (1980). Uterine catecholamines and prostaglandins during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology.* 106: 1650-1654.
- Vera P.L, Haase E.B, Schramm L.P., (1997). Origins of the sympathetic innervation of the cervical end of the uterus in the rat. *Brain Res.* 747: 140-143.
- Zoubina EV, Smith P.G., (2002). Distributions of estrogen receptors alpha and beta in sympathetic neurons of female rats: enriched expression by uterine innervation. *J Neurobiol.* 52: 14-23.
- Zoubina EV, Fan Q, Smith P.G., (1998). Variation in uterine innervation during the estrous cycle. *The Journal of Comparative Neurology.* 397: 561-571.
- Zoubina EV, Mize AL, Alper RH, Smith P.G., (2001). Acute and chronic oestrogen supplementation decreases uterine sympathetic innervation in ovariectomised adult virgin rats. *Histol Histopathol.* 16: 989-996.
- 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 P.G., (2001). Sympathetic hyperinnervation of the uterus in the estrogen receptor alpha knock-out mouse. *Neuroscience.* 103:237-244.

12. AGRADECIMIENTO

Un especial agradecimiento a la Dra. Mónica Brauer por abrirme las puertas de su Laboratorio, por su confianza en mí y su incondicional apoyo.

A mis compañeros y ya amigos del Laboratorio de Biología Celular (IIBCE), de los cuales aprendo día a día mucho de todos ellos, gracias por su tiempo a la hora de enseñar y por su apoyo tanto profesional como personal.

A los miembros del tribunal Alejandra Kun y Gabriela Casanova, por su tiempo y correcciones.

A mi familia, Jeannette y María Eugenia por el apoyo incondicional en este camino.

A Marisol por ser la persona que me motivo a retomar los estudios, cuando el estudio para mí no era una opción y Román por haber compartido gran parte de su vida conmigo.

A mis hermanos de la vida (que más decir), Vero, Ale, Ceci, Ana y Luis.

A los amigos que siempre estuvieron, y más de una vez se colgaron a hablar de biología y compartieron esta pasión.

Por último, a mis grandes compañeros de camino, los amigos de la Facultad sin ellos las cosas hubiesen costado el triple.