



PROGRAMA DE DESARROLLO EN CIENCIAS BÁSICAS PEDECIBA

**Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
Opción Biología Celular y Molecular**

Papel de la orientación y rigidez del colágeno Tipo I en la denervación simpática inducida por el estrógeno en el miometrio uterino

Lic. Gaby Fabiana Martínez

**Laboratorio de Biología Celular
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Montevideo, Uruguay**

Orientadora: Dra. M. Mónica Brauer.

Tribunal

**Dra. Alejandra Kun (Presidente)
Dra. Mercedes Rodríguez – Teja (Vocal)
Dr. Flavio Zolessi (Vocal)**

Quiero agradecer a...

Mónica Brauer, por todo lo que me enseñó y me enseña !

Los miembros del tribunal: Alejandra Kun, Mercedes Rodríguez-Teja y Flavio Zolessi.
Por el tiempo dedicado a la lectura de la tesis, por sus correcciones y sugerencias.

Biología Celular - IIBCE: Analía, Jess, Pao Bianchimano, Cecilia, Xime, Josepe, Martín, Pao Bacigalupo, Mica, Maria Paula, Maria Noel y Patito. **Gracias por todo !!**

Depto. Neuroquímica – IIBCE

UMET de Facultad de Ciencias: Gaby Casanova, Marcie, Mage, Fefa y Cami. Por el aguante !

IIBCE

Bioterio: Hector, Carmen y Martín

Laboratorio de Neurobiología de Córdoba: Alfredo Cáceres, Nicolás Unsain, Mariano Bisbal, Las Monis, Cecilia Conde, Gonzalo, Seba, Coty y Favio

Familia: Jeannette y Maru por acompañarme en este camino y por su paciencia

Vero, Ale, Ceci, Ana, Luisito y Juanito

AMIGOS !

Paco y Simón por el aguante en las largas noches de escritura

Marisol y Román

Deportivo L.C.V

Abreviaturas

BDNF = Brain - derived neurotrophic factor

bv = Vasos sanguíneos

CC = Cono de crecimiento

CML = Capa miometrial circular

CNNs (o nnc) = Células No Neurales

E = Estrógeno

EEM = Error estándar de la media

F-Actina = Actina fibrilar

G = Explanto de ganglio simpático

GCS = Ganglio Cervical Superior

LML (o cml) = Capa miometrial longitudinal

MEC = Matriz extracelular

MET = Microscopia electrónica de transmisión

N = Neuritas

NGF = Nerve Growth Factor

OVX = Ovariectomizadas

PA = Paralelo

PE = Perpendicular

PP = Prepúber

PUB = Púber

Tir-Tub = Tubulina tiosinada

v = Vaso sanguíneo

ϕ = Diámetro

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES GENERALES	3
1. PAPEL DEL COLÁGENO EN EL CRECIMIENTO NEURÍTICO.....	3
1.1 Aspectos generales del guiado de los axones.....	3
1.2 Matriz extracelular y su papel en el crecimiento neurítico.....	4
1.3 Colágeno y crecimiento neurítico.....	5
1.4 Influencia del alineamiento del colágeno sobre el crecimiento axónico.....	7
1.5 Efectos de la rigidez del colágeno en el crecimiento neurítico.....	7
1.6 Efectos de la rigidez del colágeno sobre el cono de crecimiento.....	8
2. PLASTICIDAD EN LA INERVACIÓN SIMPÁTICA DEL ÚTERO.....	10
2.1 Efectos del estrógeno.....	10
2.2 Efectos del estrógeno sobre la capacidad neuritogénica del miometrio.....	11
2.3 Señales difusibles con efectos negativos para los nervios simpáticos.....	13
2.4 Papel de las señales asociadas al sustrato.....	13
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	17
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
MATERIALES Y MÉTODOS	24
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	51
PERSPECTIVAS	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

El miometrio está innervado por nervios simpáticos que sufren ciclos de degeneración y regeneración en respuesta al estrógeno. Esta plasticidad es iniciada por cambios en la capacidad neuritogénica del miometrio e involucra la producción de varias moléculas con efectos inhibitorios para los nervios simpáticos. En 2010, nuestro grupo demostró que el estrógeno limita la capacidad del miometrio de sustentar el crecimiento de los nervios simpáticos a través de la modificación de moléculas no-difusibles, posiblemente componentes intrínsecos de la matriz extracelular.

Varias líneas de evidencia indican que la orientación y la rigidez del colágeno Tipo I afectan profundamente el crecimiento de los axones. Por esta razón, decidimos explorar si la existencia de cambios en el alineamiento y la rigidez de las fibrillas de colágeno I miometriales podrían explicar la inhibición del crecimiento neurítico que el estrógeno provoca en su innervación simpática. En este marco, los objetivos de esta tesis son: (a) analizar los efectos del estrógeno sobre la orientación del colágeno Tipo I miometrial *in situ*; (b) explorar la relevancia de la orientación del colágeno sobre el patrón y la extensión del crecimiento neurítico simpático; (c) determinar los efectos de rigidez de las matrices de colágeno I sobre el crecimiento neurítico; y (d) investigar si los cambios en la rigidez de las matrices de colágeno impactan sobre la morfología del citoesqueleto de actina de los conos de crecimiento. Utilizando microscopía electrónica asociada a métodos morfométricos cuantitativos observamos que durante la pubertad natural (momento donde los niveles fisiológicos de estrógeno son elevados) ocurre un realineamiento de 90° en las fibrillas de colágeno I que rodean individualmente a las células musculares lisas del miometrio. Esto es relevante porque esta es el área por donde transcurren las fibras nerviosas. Estos resultados apoyarían la hipótesis de que cambios en el alineamiento de las fibrillas de colágeno podrían ser uno de los factores inhibitorios para los nervios simpáticos en el miometrio estrogenizado. Con el fin de avanzar en esta posibilidad, utilizamos ensayos de cultivo de ganglios simpáticos sembrados sobre cortes a congelación de tendón, tejido rico en colágeno I. Demostramos que el crecimiento neurítico sólo ocurre en la dirección de las fibrillas de colágeno y es inhibido por las fibrillas posicionadas transversalmente. Posteriormente, con el fin de valorar la influencia de la rigidez, se realizaron cultivos de explantos de ganglios simpáticos en matrices tridimensionales de colágeno Tipo I rígidas (provocada por el aumento del entrecruzamiento de las fibrillas de colágeno), observándose que las neuritas simpáticas que crecieron en geles rígidos presentaban un menor crecimiento comparadas con las que lo hacían en un gel control (menos rígido). Asimismo, encontramos que la rigidez de las matrices de colágeno afecta también la morfología de los conos de crecimiento. En las matrices más rígidas, los conos presentaron baja marcación para la actina y estaban colapsados, indicando que las matrices de colágeno rígidas no favorecen el crecimiento neurítico. En suma, los resultados obtenidos dan apoyo a la hipótesis en estudio y sugieren que los efectos inhibitorios que el estrógeno provoca en la innervación simpática del miometrio podrían estar parcialmente regulados por cambios en el alineamiento y rigidez del colágeno Tipo I.

1. PAPEL DEL COLÁGENO EN EL CRECIMIENTO NEURÍTICO

1.1 Aspectos generales del guiado de los axones

Muchos aspectos del desarrollo del sistema nervioso así como los procesos de regeneración del sistema nervioso adulto son regulados por señales extracelulares. El guiado de los axones hacia sus efectores depende en gran medida del justo balance entre moléculas con efectos atractivos o repulsivos, las cuales pueden ser difusibles o no-difusibles (Fig. 1). La presencia de receptores apropiados en los axones en crecimiento, les permite sentir estas señales y transitar los caminos que los conducen a su efector final (un tejido en particular u otra célula neuronal) y formar así conexiones correctas neurona-efector. Algunas de estas moléculas pueden ser re-expresadas en la vida adulta para promover o inhibir la regeneración de los axones (Sanes, 2006; Bouquet y Nothias, 2007; McCornick y Leipzig, 2012).

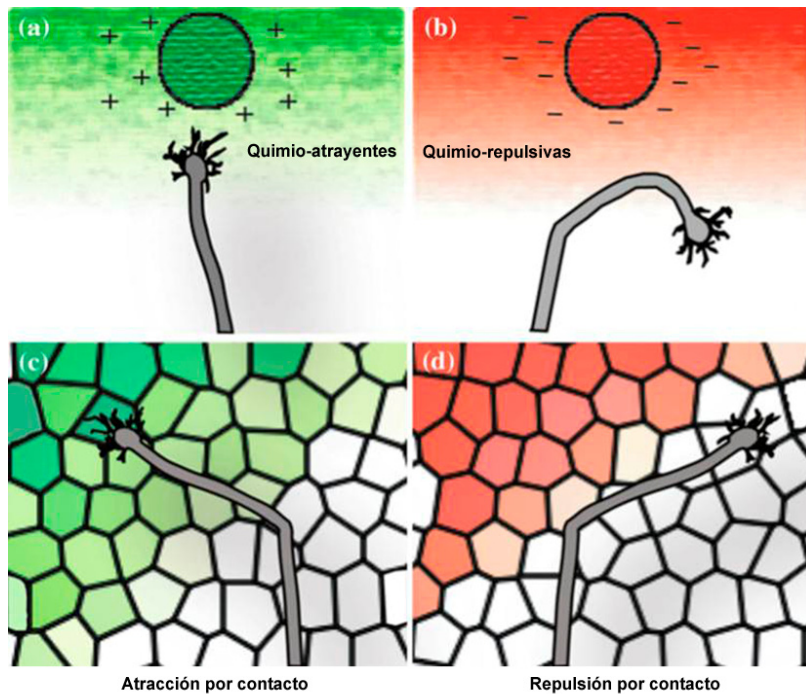


Figura 1. Esquema representativo del guiado de los axones hacia sus efectores. a y b, señales difusibles positivas y negativas. c y d, señales no-difusibles positivas y negativas.

1.2 Matriz extracelular y su papel en el crecimiento neurítico

Durante el desarrollo embrionario y posnatal, varios componentes intrínsecos de la matriz extracelular (MEC) juegan un papel esencial en el guiado de los axones en crecimiento hacia sus efectores (Porcionatto, 2006). Muchos de los componentes de la MEC continúan siendo relevantes en la vida adulta, promoviendo o limitando la regeneración de los axones luego de una lesión. Estas moléculas también regulan procesos de remodelación (plasticidad) que ocurren en condiciones fisiológicas y patológicas (Huebner y Strittmatter, 2009).

Algunos de los componentes de la MEC constituyen sustratos permisivos que favorecen el crecimiento de las neuritas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Entre este tipo de moléculas se incluyen la laminina, la fibronectina y algunas variedades de colágeno (I, III y IV); (Stang y col., 2005). Contrariamente, otros componentes de la MEC como algunas clases de proteoglicanos (PGs), por ejemplo los condroitín sulfato PGs, son inhibidores del crecimiento neurítico (Becker y Becker, 2002). Otras moléculas de la MEC como la tenascina pueden tener efectos promotores o inhibitorios del crecimiento neurítico de forma dependiente del contexto ambiental en la que se expresan (Anton y col., 1994; Becker y Becker, 2002; Porcionatto, 2006).

Los axones perciben el efecto de estas moléculas a través de las integrinas. Estos receptores de superficie se unen a moléculas como la laminina, fibronectina y el colágeno mediante uniones de adhesión que inician cascadas de señalización intracelulares que favorecen o desfavorecen la extensión axonal (Myers y Gómez, 2011).

Es bien sabido que la regeneración en el sistema nervioso central (SNC) maduro es limitada comparada con la del sistema nervioso periférico (SNP). Se conoce además que esta limitación se vincula con alteraciones en el ambiente que rodea a los axones e involucra cambios en la expresión e incluso la re-expresión de ciertas señales moleculares que fueron relevantes durante el desarrollo del sistema nervioso. Por ejemplo; algunas clases de PGs tienen impacto negativo para la regeneración en el SNC adulto (Kwok y col., 2008, García-Alias y col., 2011; revisado en Siqueira-Mietto y col., 2015).

Contrariamente, la regeneración axonal ocurre en el SNP y depende en parte de señales extracelulares que se expresan en las zonas donde transitan estos nervios (Huebner y Strittmatter, 2009). Algunas de estas señales permisivas son producidas por las células de Schwann. De hecho, se ha demostrado que el trasplante de células de Schwann a zonas

lesionadas del SNC produce cambios en el ambiente que favorecen la regeneración de los axones. Esto pone de manifiesto que estas células aportan al ambiente moléculas que no están presentes naturalmente en el SNC y que favorecen así la regeneración (Zaminy y col., 2013).

También en el sistema nervioso autónomo, 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). De manera similar, se ha observado que la expresión de PGs en la cicatriz provocada en el miocardio por un infarto impide la reinervación simpática de la región afectada (Gardner y Habecker, 2013).

1.3 Colágeno y crecimiento neurítico

Los colágenos constituyen una gran familia de proteínas fibrosas presente en mamíferos. Está conformada por 28 miembros siendo las proteínas más abundantes de la MEC. Si bien cumplen diferentes funciones, están principalmente vinculados con el soporte estructural, organización celular y contribuyen a las propiedades mecánicas de los tejidos. También intervienen en la proliferación, migración y diferenciación celular. Dichas proteínas están formadas por cadenas polipeptídicas (cadenas α) que se enrollan entre sí formando una super-hélice. Los colágenos pueden dividirse en subfamilias y según el ensamblaje de sus cadenas α forman diferentes estructuras.

Por ejemplo, las fibrillas que forman el colágeno Tipo IV se ensamblan formando una red que se encuentra en las láminas basales de las células (Fig. 2). Por otro lado, el colágeno Tipo I presente por ejemplo en el tendón y el músculo tiene una estructura fibrilar (Fig. 3); (Alberts y col., 2002; Richard-Blum, 2011).

Es sabido que algunas clases de colágeno (por ejemplo; I, III y IV) son permisivos para el crecimiento de los nervios y esto ha hecho que sean usados frecuentemente como sustratos para cultivos neuronales. También algunos de estos tipos de colágeno son ampliamente utilizados en ingeniería de tejidos para promover la extensión de nervios periféricos (Argiro y Johnson., 1982; Fox y col., 2007; Kijenska y col., 2012; Georgiou y col., 2013).

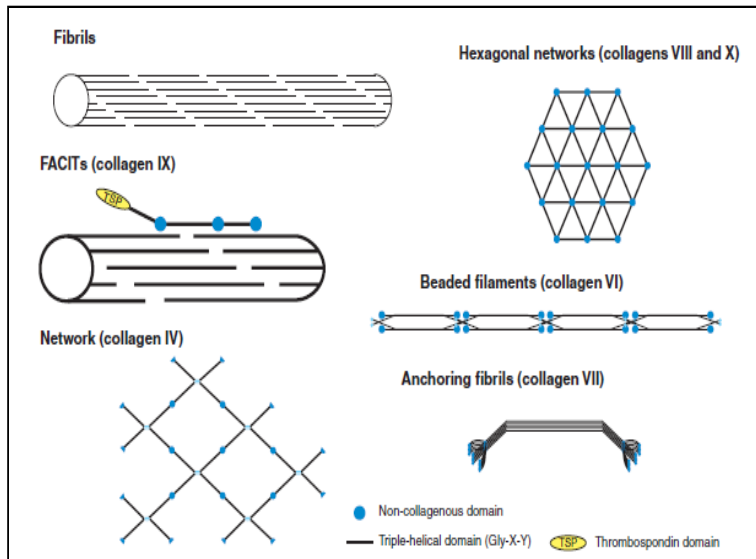


Figura 2. Representación de estructuras adoptadas por diferentes tipos de colágeno. Tomado de Richard-Blum, 2011.

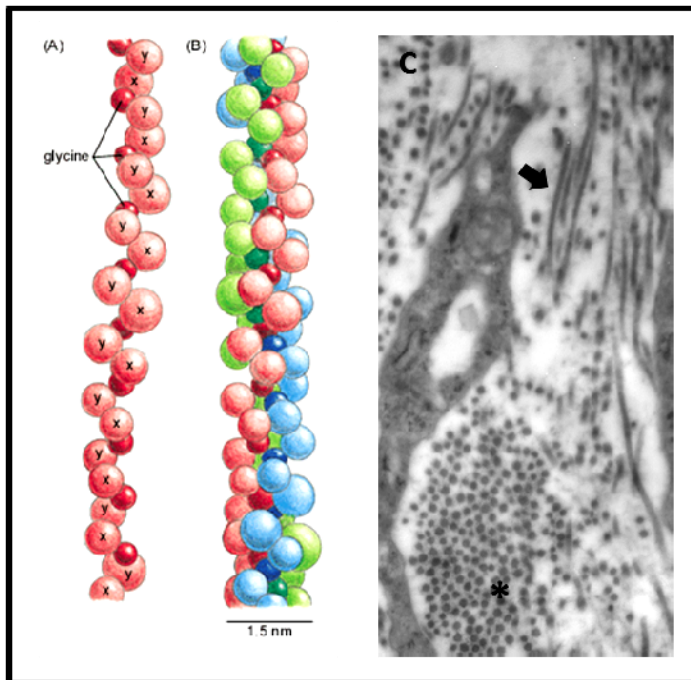


Figura 3. El esquema de la izquierda representa una cadena α de colágeno (A) y la triple-hélice de la molécula de colágeno (B). Tomado de Alberts y col., 2002.

(C) Imagen ultraestructural de fibrillas de colágeno. Nótese, que las mismas se encuentran en diferentes orientaciones, perpendiculares (*) y longitudinales (flecha negra) al plano de corte. Imagen tomada de Martínez, 2012. <http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/pasan/uy24-15647.pdf>

1.4 Influencia del alineamiento del colágeno Tipo I en el crecimiento axónico

Distintos estudios han mostrado que *in vitro*, el colágeno Tipo I tiene efectos promotores del crecimiento neurítico. Más aún, se ha demostrado que los cambios en la orientación espacial de las fibrillas de colágeno afectan profundamente la orientación y magnitud de este crecimiento (Dubey y col., 1999; Ceballos y col., 1999).

Así 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 de afectar la extensión neurítica, se ha demostrado que las células madres nerviosas presentan un mayor crecimiento celular cuando son cultivadas en andamios que contienen colágeno Tipo I alineado (Kijenska y col., 2012).

En suma, el colágeno Tipo I promueve el crecimiento neurítico, pero ha sido revelado que los cambios en la orientación espacial de esta molécula estructural son capaces de afectar tanto la extensión axonal como la dirección del crecimiento nervioso.

1.5 Efectos de la rigidez del colágeno en el crecimiento neurítico

Es sabido que cambios en la rigidez de la MEC afectan la morfología, la migración y la diferenciación celular (Kuzuya y col., 1996; Pelham y Wang, 1997; Frey y col., 2009); y las neuronas no son ajenas a este fenómeno. En este contexto, en los últimos años varias líneas de investigación se han enfocado en el estudio del impacto de la rigidez de la MEC en el crecimiento de los nervios.

Varias evidencias indican que modificaciones en la rigidez de diferentes matrices utilizadas en cultivos neuronales provocan cambios en el comportamiento de estas células. Pero esto es ambiguo, ya que algunas neuronas aumentan el crecimiento neurítico cuando están embebidas en una matriz rígida (ej. neuronas periféricas) mientras que otras lo disminuyen (ej. neuronas hipocampales, Koch y col., 2012).

Los cambios en la rigidez de matrices de colágeno modifican el crecimiento y la expresión génica neuronal *in vitro* (Li y col., 2007). Ha sido reportado que el incremento de la concentración de colágeno en una matriz aumenta la rigidez de la misma y las neuronas periféricas desafiadas a crecer en este tipo de matrices muestran un menor crecimiento neurítico (Skornia y Willits, 2004). Observaciones similares se obtuvieron cuando se utilizan

agentes que promueven el entrecruzamiento de las fibrillas de colágeno y que por ende lo hacen más rígido (Sundararaghavan y col., 2008).

Si bien las evidencias indican que los cambios en la rigidez de la MEC y el colágeno afectan al crecimiento neurítico, la influencia de esta propiedad física en el crecimiento de los nervios simpáticos no ha sido aun caracterizada.

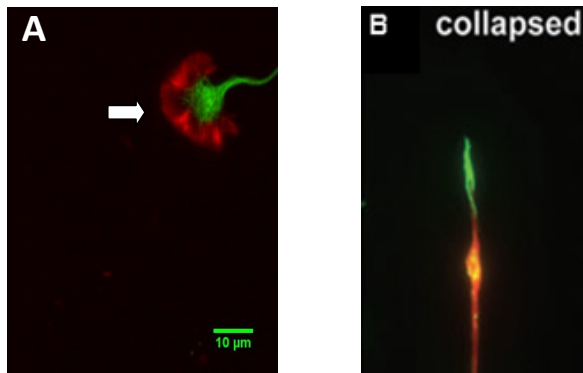
1.6 Efectos de la rigidez del colágeno sobre el cono de crecimiento

Cabe señalar que los cambios en la rigidez de la MEC influyen directa o indirectamente en la dinámica del citoesqueleto celular, afectando la proliferación y la migración celular (revisado en Peyton y col., 2007). Los axones en crecimiento presentan una estructura en su extremo llamada cono de crecimiento (Fig. 4). Durante el proceso de extensión axonal, estas estructuras neuronales sufren cambios dinámicos en su citoesqueleto y esto puede ser influenciado por su interacción con las moléculas de la MEC y por cambios en la rigidez de la misma (Myers y Gómez, 2011). Se desconoce también cómo los cambios en las matrices de colágeno influyen sobre los conos de crecimiento de las neuronas simpáticas.

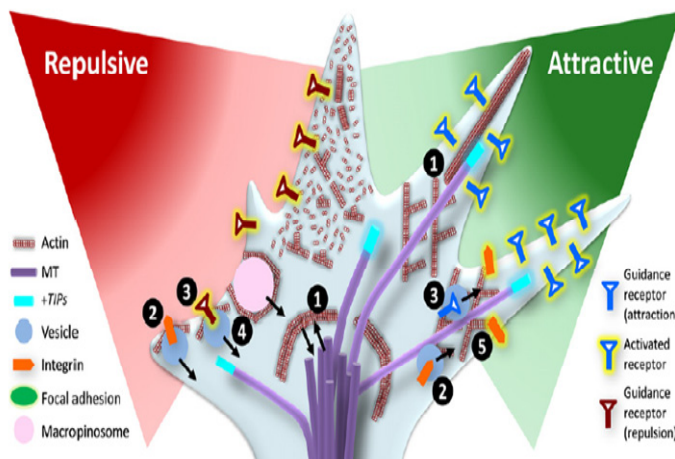
Figura 4. Cono de crecimiento

El cono de crecimiento (CC) es una estructura dinámica que se encuentra en los extremos de los axones en crecimiento. Esta estructura permite a los axones “sensar” el ambiente que los rodea y responder frente a señales difusibles y no difusibles, como las aportadas por ciertas moléculas intrínsecas de la matriz extracelular.

Toda esta información percibida por el CC converge en la remodelación del citoesqueleto de Actina (F-Actina) y Tubulina. Este comportamiento depende en gran medida de cambios en la organización de los filamentos de F-actina que se encuentran en la periferia del cono de crecimiento. Extensiones de la F-Actina llamadas filopodios son las encargadas de sensar el ambiente que los rodea y de responder frente a diferentes señales. La dinámica de la remodelación de la F-actina permite al cono de crecimiento neuronal avanzar, girar y en ocasiones, retraerse (colapsar) frente a señales negativas. La presencia de receptores específicos para moléculas de la MEC permite esta comunicación entre el citoesqueleto del CC y el ambiente. (Dent y col., 2011; Vitriol y Zheng, 2012).



(A) Imagen de un cono de crecimiento de neurita simpática creciendo en un cultivo 2D. El mismo fue marcado para evidenciar Tubulina tiosinada (Tir-Tubulina, Verde) y F-Actina (Rojo). La flecha blanca indica la red de actina llamada lamela. (B) Imagen de un cono de crecimiento colapsado pero en este caso, en color verde (Actina) y rojo (Tubulina). Nótese, la retracción de los filamentos de actina, morfología típica de un cono colapsado.



Esquema representativo de un cono de crecimiento con expresión de receptores frente a señales atractivas y repulsivas. Tomado de Vitriol y Zheng, 2012.

Imagen (A) tomada durante mi pasantía en el Laboratorio de Neurobiología del Instituto de Investigaciones Médica Mercedes y Martín Ferreyra, Córdoba, Argentina, 2014. Imagen (B) tomada de Nangle y Keast, 2011.

2. PLASTICIDAD EN LA INERVACIÓN SIMPÁTICA DEL ÚTERO

2.1 Efectos del estrógeno

El útero está inervado por nervios simpáticos que se asocian con el músculo liso uterino (miometrio) y los vasos sanguíneos (Fig. 5). La inervación asociada con el miometrio muestra procesos de remodelación, sufriendo cambios degenerativos transitorios en respuesta a aumentos fisiológicos en los niveles sistémicos de estrógeno (Fig. 6). Estos fenómenos de plasticidad se observan durante la pubertad y el ciclo estral/menstrual, siendo mimetizados por la administración exógena de estradiol (Brauer y col., 1992; Zoubina y col., 1998; Zoubina y Smith, 2000; Brauer, 2008; Brauer y Smith, 2015).

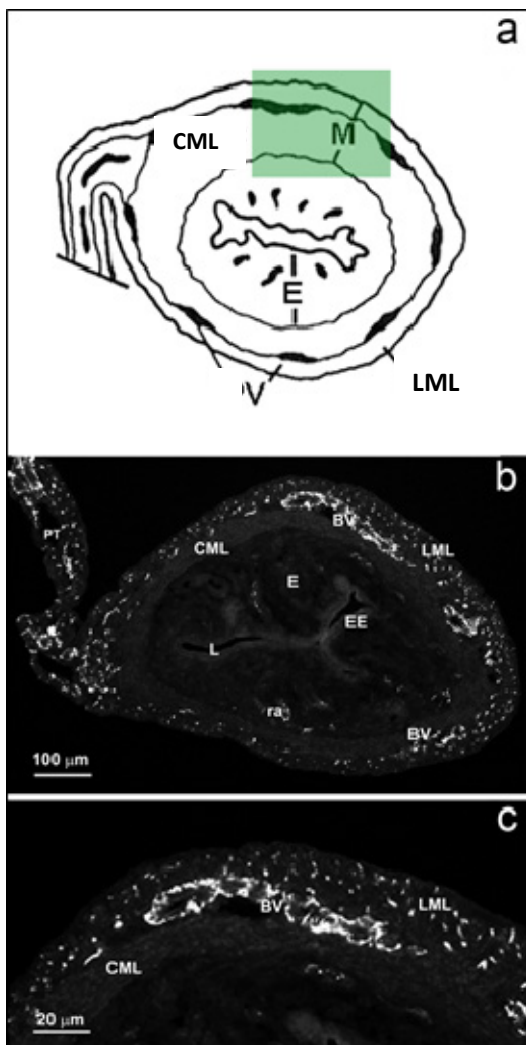


Figura 5. (a) Esquema representativo de un corte transversal del cuerno uterino de la rata en donde se reconocen: el endometrio (E) y el miometrio (M), el cual está formado por la capa muscular circular (CMC) y capa muscular longitudinal (LML) separadas por un plexo conjuntivo vascular (V). El recuadro verde marca la región que se muestra a mayor aumento en la figura c. (b) Corte transversal de la región cefálica del cuerno uterino una rata prepúber inmunomarcado para tirosina hidroxilasa para la demostración de nervios simpáticos. Nótese que los nervios están presentes en la capa miometrial longitudinal (CML) y en asociación con los vasos sanguíneos (BV). La capa muscular circular (CMC) y el endometrio (E) están pobremente inervados. En la figura c se muestra un detalle de la superficie uterina. EE, epitelio endometrial. Tomado de Brauer, 2008.

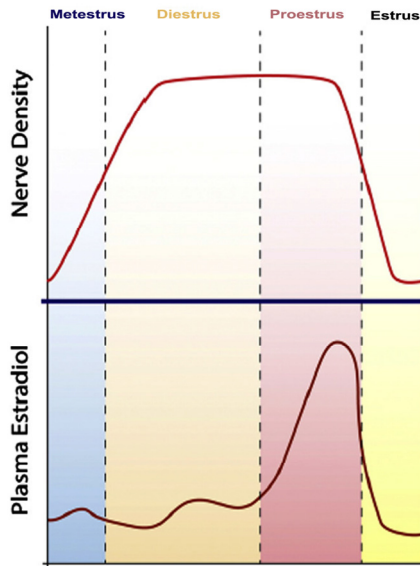


Figura 6. Esquema que representa los efectos del ciclo estral de la rata en los nervios simpáticos uterinos. La densidad de los axones simpáticos varía en función de las fluctuaciones de los niveles de estrógeno que se producen en el ciclo estral de la rata. Tomado de Brauer y Smith, 2015.

Los efectos inhibitorios/degenerativos iniciados por el estrógeno son mediados por el receptor a estrógeno alfa. Se ha observado que los ratones *knockout* para este receptor presentan una hiperinervación simpática uterina y no responden al estrógeno con una reducción en la densidad de inervación miometrial (Zoubina y Smith, 2002). Dado que el receptor a estrógeno alfa es expresado tanto por las neuronas simpáticas (Zoubina y Smith, 2002) como por el miometrio (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 de sustentar su inervación. En este contexto, se han desarrollado varios estudios con el fin de determinar el sitio de acción de la hormona (Krizsan-Agbas y Smith, 2002; Richeri y col., 2005; Brauer y Smith, 2015).

2.2 Efectos del estrógeno sobre la capacidad neuritogénica del miometrio

Numerosas evidencias han llevado a postular que el estrógeno causa cambios en el miometrio los cuales afectan su capacidad de sustentar su inervación simpática (Revisado en Brauer, 2008; Brauer y Smith, 2015).

Esta hipótesis fue apoyada por experimentos realizados el año 2000, cuando Brauer y colaboradores trasplantaron fragmentos de miometrio provenientes de ratas prepúberes a la cámara anterior del ojo de ratas adultas ovariectomizadas (OVX) y tratadas con estrógeno. La evaluación de la inervación mostró que en las ratas tratadas con vehículo, los trasplantes miometriales estaban rica y organotípicamente re-inervados por fibras nerviosas simpáticas provenientes del ganglio cervical superior (GCS), el cual provee

normalmente la innervación simpática del iris y ciertas estructuras cerebrales. Contrariamente, los trasplantes de las hembras hospederas tratadas con estrógeno presentaron una pobre re-inervación, similar a la denervación provocada por el estrógeno en la innervación intrínseca del miometrio *in situ*. Dado que la innervación del iris no sufrió modificaciones ni en su densidad de innervación ni en sus niveles tisulares de noradrenalina, los resultados brindados por estos experimentos 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.

Estos hallazgos, fueron confirmados por ensayos de co-cultivo de explantos GCS y de miometrio (Krizsan-Agbas y Smith, 2002). En estos ensayos se observó que el miometrio de las hembras adultas ovariectomizadas promovía el crecimiento neurítico desde los ganglios simpáticos, pero que este crecimiento estaba muy reducido cuando los explantos miometriales provenían de hembras castradas tratadas con estrógeno (Fig. 7). 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. Estos resultados indican que bajo la influencia del estrógeno el miometrio uterino produce señales negativas, de naturaleza potencialmente difusible, que inhiben el crecimiento de las neuritas simpáticas.

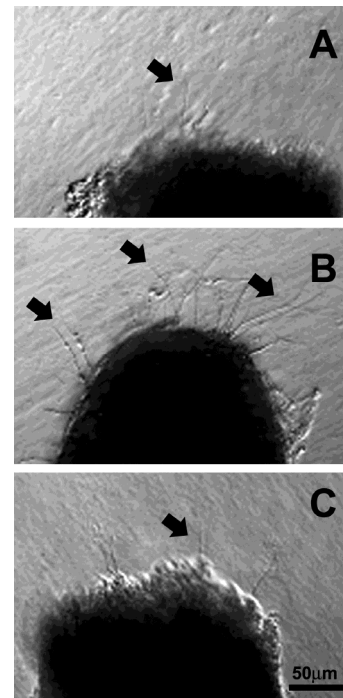


Figura 7. Explantos de ganglio cervical superior (GCS) crecidos en geles 3D de colágeno. A) GCS de una rata ovariectomizada (OVX) que creció en ausencia de estradiol en el medio de cultivo. **B)** GCS de una rata OVX crecido en presencia de un explanto de miometrio proveniente de una rata OVX **C)** GCS proveniente de una rata OVX cultivado en presencia de un explanto de miometrio proveniente de una rata OVX que recibió tratamiento con estradiol 24 hs antes de realizar el cultivo (los explantos de miometrio no se observan en las micro-fotografías). Las flechas negras señalan neuritas que crecen desde el explanto de GCS. Imágenes tomadas de Krizsan-Agbas y Smith, 2002.

2.3 Señales difusibles con efectos negativos para los nervios simpáticos

Estudios realizados por distintos grupos mostraron que bajo la influencia del estrógeno, el miometrio produce una variedad de señales moleculares difusibles con efectos inhibitorios para los nervios simpáticos (revisado en Brauer, 2008; Brauer y Smith, 2015). Se ha demostrado que en respuesta al estrógeno el miometrio aumenta la síntesis del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; *del inglés*: brain-derived neurotrophic factor). Esta neurotrofina, actuando a través del receptor p75, ejerce efectos negativos sobre los nervios simpáticos. Más aún, el efecto negativo que produce el estrógeno no es evidenciado en ratones *knockout* para la síntesis de BDNF. Reforzando esta idea, estudios en ratones deficientes para el receptor p75 mostraron que la inervación simpática miometrial no presenta la remodelación clásica causada por el estrógeno (Selfridg y col., 2010).

Además del BDNF, existen evidencias de que el miometrio estrogenizado produce otras señales inhibitorias/repulsivas para los nervios simpáticos, incluyendo la molécula de adhesión celular neurotrimina (Krizsan-Agbas y col., 2008), mediadores inflamatorios (Bianchimano y col., 2007) y varios miembros de la familia de las semaforinas, incluyendo a la Semaforina 3F que es selectivamente neurorepulsiva para los nervios simpáticos (Richeri y col., 2011). Este fenómeno también ha sido descrito en humanos, por ejemplo, durante la mitad y al final del embarazo la expresión de Semaforina 3A en el útero aumenta y esto se correlaciona con la denervación simpática que acompaña a la gestación en los mamíferos (Marzioni y col., 2004).

2.4 Papel de las señales asociadas al sustrato

Es sabido que tanto durante el desarrollo como en la vida adulta, el crecimiento y guiado de los axones es influenciado por señales no-difusibles asociadas al sustrato, algunas de las cuales son componentes intrínsecos de la matriz extracelular.

Distintos estudios han mostrado que las hormonas sexuales producen cambios en la composición y organización estructural de la MEC uterina. Por ejemplo, se ha 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).

Con el fin de evaluar la contribución de las señales asociadas al sustrato en la remodelación iniciada por el estrógeno en la inervación uterina, nuestro grupo utilizó el método de “crio-cultivo” (Richeri y col., 2010). En nuestro caso, el crio-cultivo consistió en cultivar explantos de ganglios simpáticos de ratas neonatales y adultas sobre cortes a congelación de miometrio uterino de ratas adultas castradas y tratadas con estrógeno.

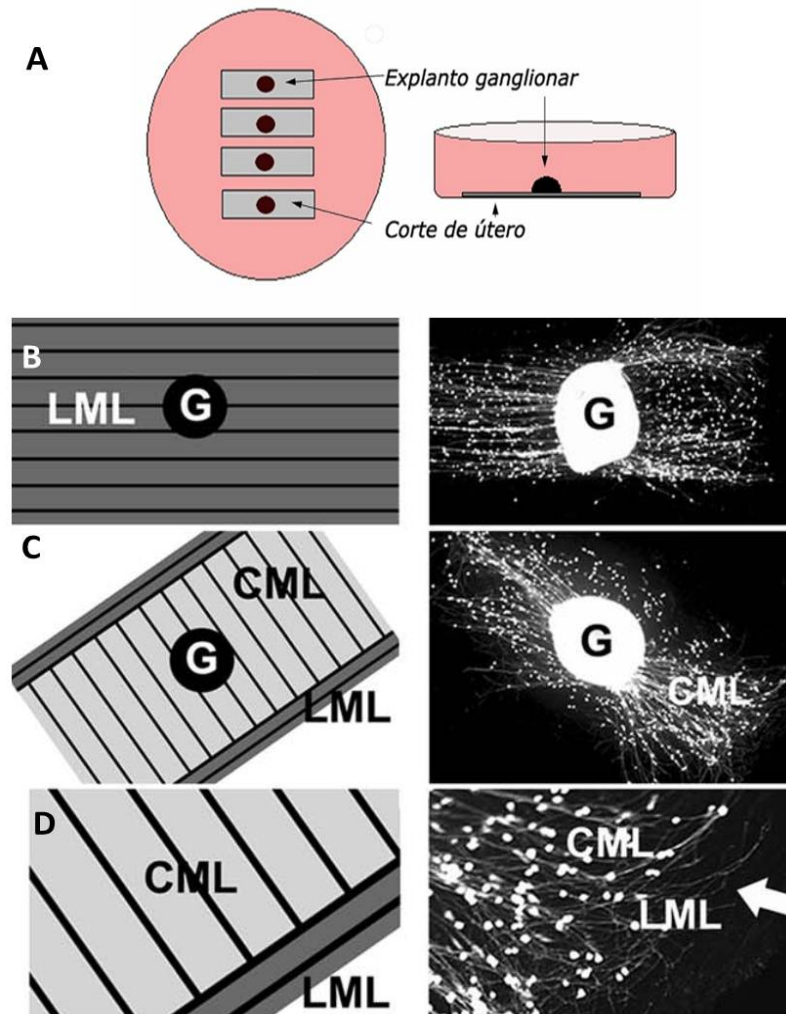


Figura 8. (A) Esquema que representa el método de crio-cultivo. Se representa en color gris el corte de tejido usado como sustrato (miometrio) y en negro el explanto de ganglio simpático. (B-D) Influencia del sustrato en el crecimiento neurítico. A la derecha: imágenes de crio-cultivos teñidos con colorante vital, paneles izquierdos: esquemas representando la orientación de las fibras musculares en el corte de tejido subyacente (B): cortes longitudinales de capa miometrial longitudinal. C y D: Capa muscular longitudinal y circular. Nótese que las neuritas crecen siguiendo el eje axial mayor de las células musculares lisas (B, C, D), y cómo reorientan su crecimiento adaptándose a la orientación de las células musculares lisas (D, flecha). Ganglio (G), capa miometrial longitudinal (LML) y capa muscular circular (CML). Imágenes tomadas de Richeri y col., 2010.

Cuando el sustrato miometrial consistía de cortes longitudinales de la capa miometrial longitudinal, lo primero que se observó fue que el crecimiento neurítico se encontraba profundamente influenciado por las características del tejido subyacente. Por ejemplo, se observó que las neuritas crecían siguiendo la orientación del eje mayor del miometrio y no lo hacían perpendicularmente a este eje. Más aún, se detectó que las neuritas modificaban su curso de crecimiento para adaptarse a la orientación del tejido utilizado como sustrato (Fig. 8).

Finalmente, 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 separaba los haces musculares (Fig. 9).

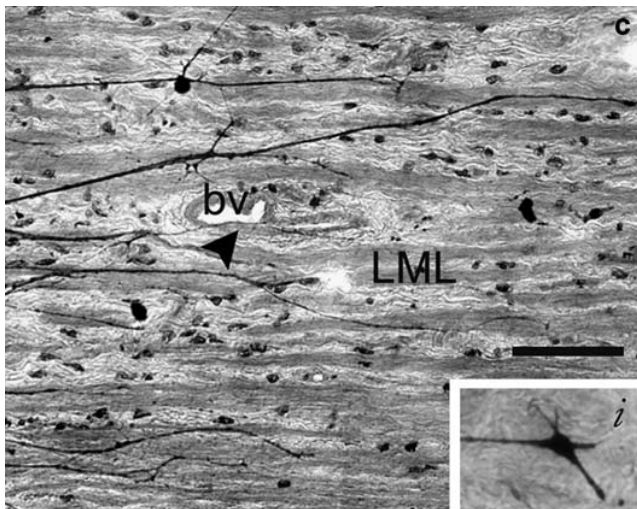


Figura 9. Crio-cultivo teñido con azul de toluidina. Se observa el crecimiento neurítico asociado con las células musculares lisas, LML (*del inglés: layer muscle longitudinal cells*) y los vasos sanguíneos (bv) intrauterinos. Recuadro (i) se puede observar un cono de crecimiento.

Imágenes tomadas de Richeri y col., 2010.

Sin embargo, el hallazgo más relevante de estos estudios fue que el crecimiento de las neuritas simpáticas era menor sobre los cortes de miometrio de ratas tratadas con estrógeno (Fig. 10). 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.

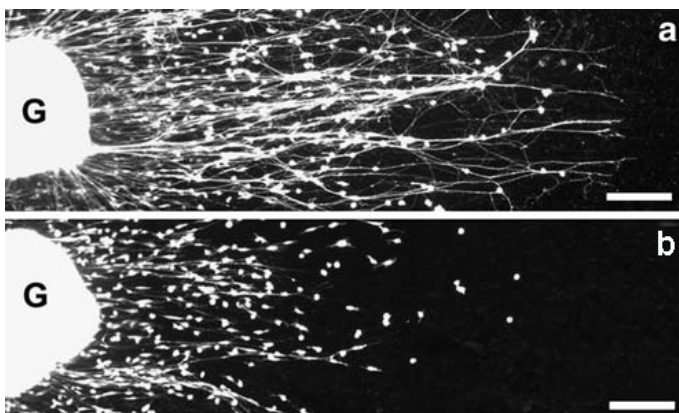


Figura 10. Explantos de ganglio simpático (G) emitiendo neuritas sobre una sección de capa longitudinal miometrial de una rata adulta castrada (a) y una tratada con estrógeno (b). Nótese, que el crecimiento neurítico es marcadamente menor cuando el ganglio simpático es cultivado sobre secciones de miometrio estrogenizado. Imágenes tomadas de Richeri y col., 2010.

Tomados en conjunto, los estudios antes presentados indican que el control de los procesos de plasticidad regulados por el estrógeno en la innervación uterina implica múltiples señales con impacto negativo y selectivo para los nervios simpáticos. La naturaleza multifactorial de esta regulación señala la relevancia de este proceso neurodegenerativo (Fig. 11).

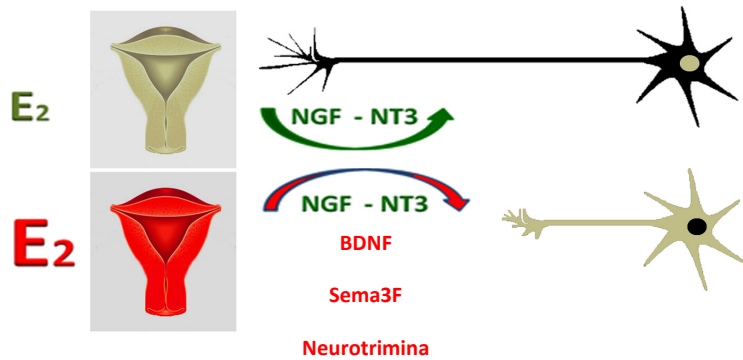


Figura 11. Esquema que representa los efectos del estrógeno en la capacidad neurotrófica del tejido uterino. Bajo la influencia del estrógeno el miometrio uterino se vuelve un ambiente inhóspito para el mantenimiento de los nervios simpáticos, causando cambios, en la expresión de señales difusibles y moléculas asociadas al sustrato que impactan negativamente en el crecimiento de los nervios simpáticos. Note que los factores neurotróficos (NGF, NT3) no cambian su expresión frente a la presencia de estrógeno. Tomado de Brauer, 2015.

Con el fin de comenzar a explorar la naturaleza de las señales asociadas al sustrato que promovían la orientación alineada de las neuritas simpáticas sobre los crio-cortes de miometrio, durante mi Pasantía de Grado analicé los crio-cultivos por microscopía electrónica de transmisión (MET).

Se observó que luego de tres días en cultivo, perduraba en el crio-corte de miometrio de las ratas adultas castradas una gran cantidad de colágeno fibrilar orientado paralelamente al eje mayor del miometrio. Se detectó también que las neuritas simpáticas crecían selectivamente asociadas a esta fibrillas y que lo hacían siguiendo la dirección de las mismas (Fig. 12).

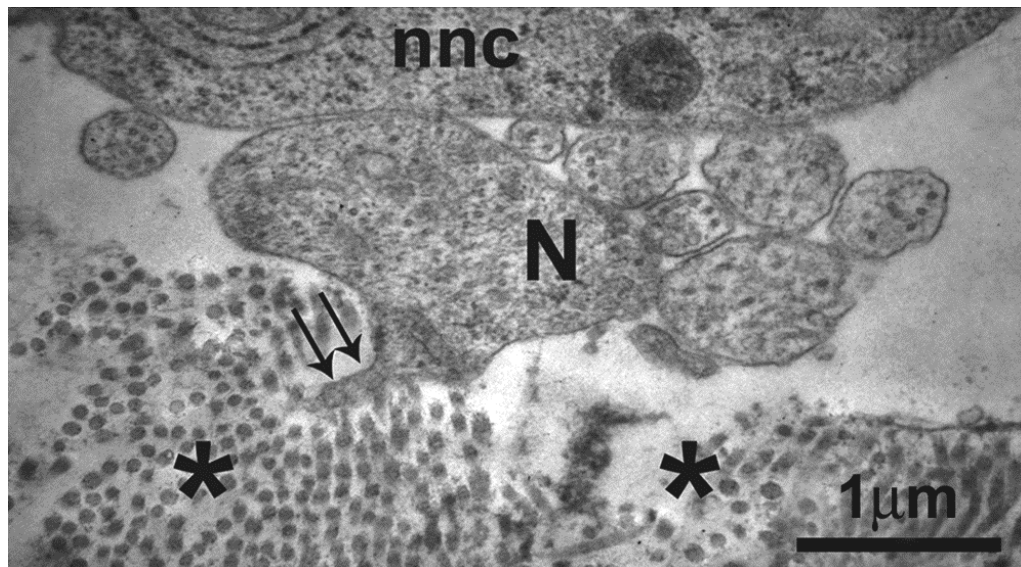


Figura 12. Imagen ultraestructural de un corte transversal de crio-cultivo. Luego de tres días en cultivo se pudieron observar prolongaciones neuríticas asociadas a las fibrillas de colágeno (flechas) que se encontraban en el corte de miometrio utilizado como sustrato. (nnc) del inglés, *Non-neural cell*, (N) neuritas y (*) fibrillas de colágeno.

En vista de esta estrecha relación espacial, investigué los efectos del estrógeno sobre la orientación del colágeno en la MEC miometrial *in situ*. Utilizando MET asociada a métodos morfométricos cuantitativos, demostramos que el estrógeno modifica la orientación del colágeno perimuscular. Así en las hembras castradas, las fibrillas de colágeno se alineaban en forma paralela al eje mayor del músculo liso; siendo esta orientación la seguida por las neuritas en crecimiento en los crio-cultivos y por los nervios simpáticos *in situ* (Fig. 13).

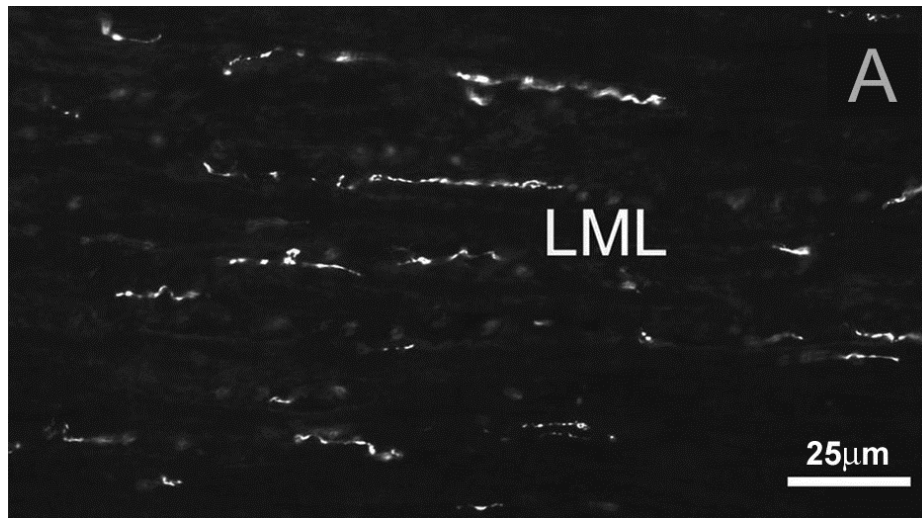


Figura 13. Inmunofluorescencia de corte longitudinal de la capa longitudinal miometrial (LML, del inglés: *longitudinal myometrial layer*) de útero de rata adulta. Se observan nervios simpáticos inmunomarcados para tirosina hidroxilasa. Nótese, que los nervios se orientan siguiendo la dirección de la capa longitudinal miometrial uterina. Imagen tomada de Brauer y Smith, 2015.

Contrariamente, en los cortes de miometrio uterino que provenían de ratas castradas tratadas con estrógeno, observamos que las fibrillas de colágeno cambiaban de una orientación paralela a una perpendicular al eje mayor del miometrio (Fig. 14). Estas observaciones fueron sustentadas por estudios cuantitativos que mostraron que en las hembras castradas, el 83 % del colágeno se orientaba paralelamente al eje mayor del miometrio. Luego del tratamiento con estrógeno, sólo el 11 % tenía esta orientación mientras que el resto mostraba una orientación perpendicular.

Queda aún por analizar si los cambios detectados en las condiciones experimentales estudiadas, también se observan en condiciones fisiológicas. Otra pregunta que surge naturalmente de los resultados brindados por los ensayos de crio-cultivo, es si los cambios de orientación de las fibrillas de colágeno son capaces de alterar el patrón y extensión del crecimiento neurítico simpático.

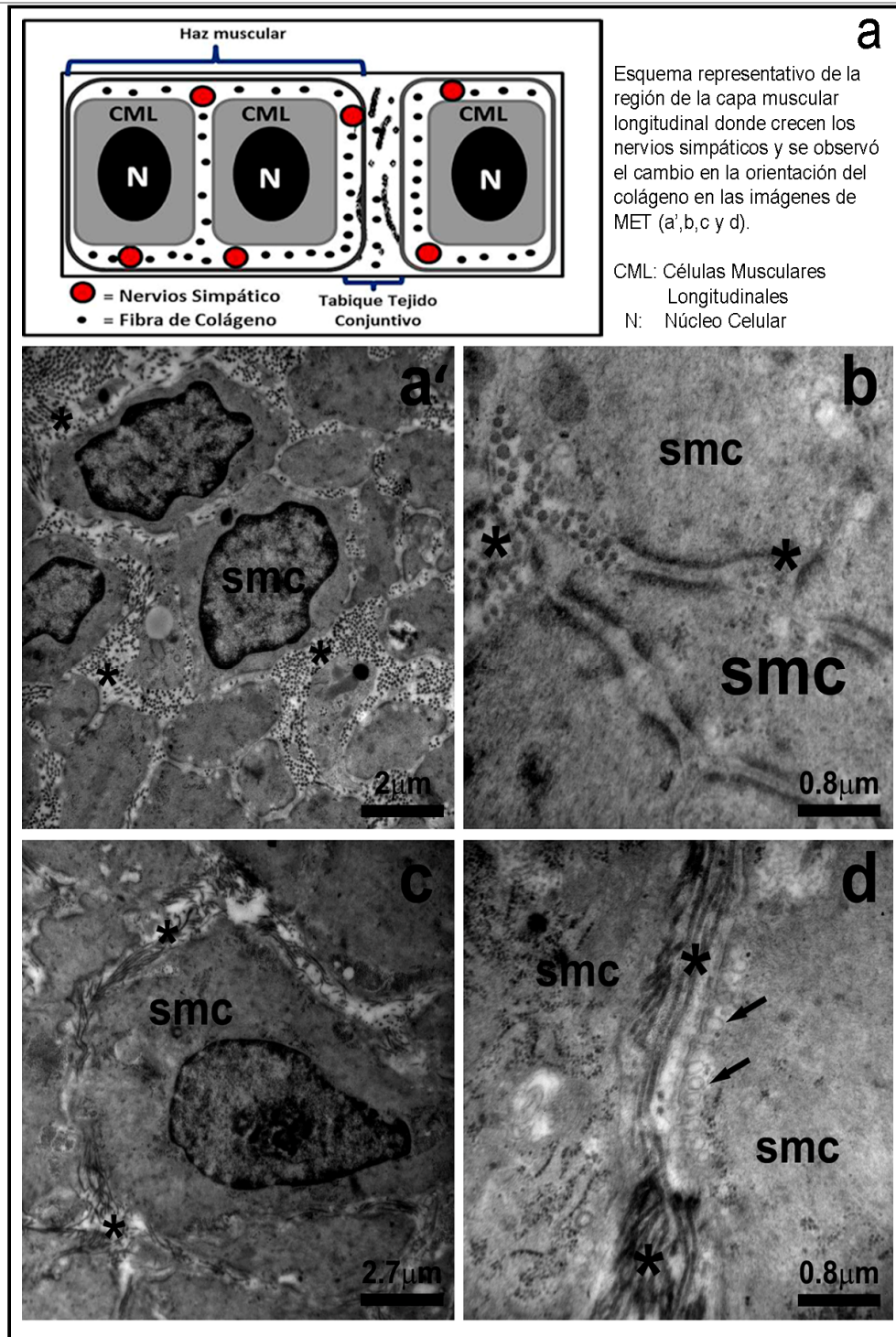


Figura 14. (a) esquema representativo de la zona por donde crecen los nervios simpáticos. (a', c) Imágenes ultraestructurales de cortes transversales de cuerno uterino de ratas adultas OVX control y OVX tratadas con estrógeno, respectivamente. En ellas se ilustran los cambios inducidos por el tratamiento con 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 ratas OVX control (a') las fibrillas de colágeno se encuentran cortadas transversalmente y por lo tanto orientadas siguiendo el eje mayor de las células musculares lisas. En b y d, se muestran imágenes a mayor aumento señalando la orientación del colágeno de la matriz extracelular intersticial (*). Las flechas en d, señalan las cavéolas propias del músculo liso maduro. Tomado de Martínez., 2012.

Finalmente, basándonos en evidencias morfológicas cualitativas que sugieren que el estrógeno aumenta el grado de empaquetamiento de las fibrillas de colágeno miometrial y potencialmente su rigidez, también nos propusimos valorar este parámetro. Como detalláramos anteriormente, la rigidez de las matrices de colágeno puede afectar positiva o negativamente la extensión del crecimiento neurítico (Li y col., 2007; Yao y col., 2010). Hasta donde sabemos, no existen estudios que analicen el impacto de la rigidez de las matrices de colágeno sobre el crecimiento de las neuritas simpáticas y la morfología de sus conos de crecimiento. Por esta razón, estos aspectos fueron analizados en el marco de este trabajo de Tesis.

HIPÓTESIS

Los cambios en la topografía y la rigidez del colágeno fibrilar (Tipo I) afectan el crecimiento de los nervios simpáticos y podrían ser uno de los factores que contribuyen a la inhibición del crecimiento de los nervios uterinos en respuesta al estrógeno.

OBJETIVO GENERAL

Contribuir a elucidar la influencia del alineamiento y rigidez del colágeno Tipo I sobre el crecimiento neurítico simpático.

Objetivos Específicos

1. Complementar los hallazgos realizados en el Trabajo de Grado evaluando si los cambios en la orientación del colágeno fibrilar detectados en condiciones experimentales también ocurren en condiciones fisiológicas.
2. Explorar la relevancia de la orientación del colágeno sobre el patrón y la extensión del crecimiento neurítico simpático.
3. Analizar el efecto de la rigidez de las matrices de colágeno Tipo I en el crecimiento de las neuritas simpáticas.
4. Comenzar a explorar los efectos de las propiedades mecánicas de las matrices de colágeno sobre los conos de crecimiento de las neuritas simpáticas.

A. En relación al Objetivo 1.

Basados en las observaciones realizadas durante la Pasantía de Grado (Martínez, 2012), analizamos si los cambios en la orientación del colágeno detectados por microscopía electrónica de transmisión en las ratas adultas ovariectomizadas y tratadas con estrógeno, también son provocados por cambios fisiológicos en los niveles sistémicos de estrógeno. Con este fin, utilizamos como modelo la pubertad natural de la rata. Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que el aumento en los niveles de estrógeno que ocurren en el primer estro de la pubertad provoca una inhibición en el crecimiento de los nervios simpáticos que modifica irreversiblemente la relación neuromuscular en el miometrio uterino (Brauer y col., 1992). La relevancia del estrógeno en estos cambios fue oportunamente demostrada en modelos experimentales (Brauer y col., 1995).

B. En relación al Objetivo 2.

Con el fin de determinar la relevancia de la orientación del colágeno sobre el patrón y la extensión del crecimiento neurítico simpático utilizamos como aproximación los ensayos de crio-cultivo, pero en este caso usando como sustrato cortes a congelación longitudinales de tendón de cola de rata. Esta elección se basó en el hecho de que este tejido está constituido en un 97 % por colágeno Tipo I altamente alineado. Al igual que en los estudios de miometrio (Richeri y col., 2010), se utilizaron como fuente de neuronas simpáticas explantos de ganglio cervical superior de ratas hembras neonatales. Las neuritas se visualizaron utilizando coloración vital (*5-carboxyfluorescein diacetate, acetoxymethyl ester, Molecular Probes, Invitrogen*, EEUU) y microscopía de epifluorescencia.

C. En relación al Objetivo 3.

Con el propósito de analizar los efectos de la rigidez de las matrices de colágeno Tipo I en el crecimiento de las neuritas simpáticas se usaron ensayos de cultivo en los que los explantos ganglionares simpáticos fueron sembrados en matrices tridimensionales (3D) de colágeno Tipo I. Para estos experimentos se utilizó colágeno Tipo I extraído de cola de rata (*Gibco, Invitrogen*, EEUU), el cual permite alcanzar una concentración de 1,89 mg/ml. A esta concentración, el colágeno forma un gel de baja rigidez mientras que a concentraciones inferiores, no gelifica o forma un gel de estructura muy lábil. Dado que no fue posible aumentar la rigidez de la matriz modificando la concentración de colágeno (Skornia y Willits, 2004), se utilizó la estrategia de aumentar la rigidez utilizando glicolaldehído, un agente que

promueve el entrecruzamiento de las fibras de colágeno (Modificado de Kuzuka 1996; Rodríguez-Teja y col., 2015). Las neuritas se visualizaron utilizando coloración vital (5-carboxyfluorescein diacetate, acetoxymethyl ester; Molecular Probes, Invitrogen) y microscopía de epifluorescencia.

D. En relación al Objetivo 4.

Finalmente, con el fin de comenzar a investigar los efectos de las propiedades mecánicas de las matrices de colágeno sobre los conos de crecimiento de las neuritas simpáticas, utilizamos la misma aproximación que en el objetivo 3, pero en este caso las neuritas fueron visualizadas utilizando inmunofluorescencia. Para la visualización de los microtúbulos se utilizó un anticuerpo anti-tubulina tirosinada (Tubulina dinámica); (anti-Tir-Tub; Sigma-Aldrich, EEUU) y para evidenciar los filamentos de actina se utilizó el marcador Faloidina-Rodamina (Molecular Probes, Invitrogen).

Este objetivo fue realizado durante una pasantía de 2 meses de duración en el Laboratorio de Neurobiología del Instituto de Investigaciones Médica “Mercedes y Martín Ferreyra” (IMMF) de la Ciudad de Córdoba, Argentina.

1. Animales

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar del Bioterio del IIBCE. Las ratas fueron sexadas al nacer, mantenidas con libre acceso a agua y alimento en grupos de 7 hembras y 1 macho, y destetadas a los 20 días de edad. La eutanasia de los animales fue realizada mediante la administración intraperitoneal de una sobredosis de pentobarbital sódico (60 mg/kg). Todos los estudios fueron conducidos de acuerdo a normas éticas establecidas por la Comisión de Ética en el Uso de Animales del IIBCE (CEUA) bajo las regulaciones establecidas en la ley nacional de experimentación animal n° 18611. Se realizó el mayor esfuerzo para minimizar el número de animales y se tomaron las medidas adecuadas para minimizar dolor, incomodidades y estrés.

Pubertad natural. Los animales prepúberes fueron eutanizados antes de que ocurriera la apertura vaginal (antes de los 27 días de edad). Las hembras púberes fueron eutanizadas en el primer estro que sigue o acompaña a la apertura vaginal (aproximadamente a los 28 días de edad). La fase del ciclo estral fue determinada mediante la identificación de células cornificadas en el frotis vaginal (Brauer y col., 1992).

Ovariectomía de hembras adultas. Las ratas adultas donantes de tendón fueron ovariectomizadas (OVX) para evitar posibles interferencias del estrógeno en algún aspecto de colágeno del tendón (Hansen y col., 2009; Dehghan y col., 2014). Las hembras fueron anestesiadas mediante una inyección i.p de 90 mg/kg Ketamina (Unimedical, Uruguay) y 10 mg/kg de Xilacina (Unimedical). La ovariectomía se realizó a través de dos pequeñas incisiones en la región lumbar bajo condiciones de asepsia. Luego de suturar, se dejó que los animales se recuperaran en el laboratorio antes de ser devueltos al Bioterio, donde permanecieron en jaulas individuales hasta el momento de la eutanasia (Richeri y col., 2010).

2. Microscopía Electrónica de Transmisión y Morfometría

Los tejidos provenientes de ratas prepúberes y púberes fueron procesados para microscopía electrónica de transmisión (MET) siguiendo protocolos que ya han sido establecidos en estudios previos de nuestro grupo (Richeri y col., 2010; 2011; Martínez, 2012).

Preparación de tejidos. Los cuernos uterinos fueron expuestos e inmediatamente fijados *in situ* con glutaraldehído al 2,5 % diluido en solución tampón fosfato 0.1 M, pH: 7.2. Posteriormente los cuernos uterinos fueron removidos, liberados de la grasa y el tejido conjuntivo anexo, fraccionados en trozos de aproximadamente 1 mm y fijados por inmersión en el mismo fijador por 24-48 hs. adicionales, a 4 °C. Luego, las muestras fueron lavadas

durante 1 hora en solución tampón fosfato, post-fijadas en tetróxido de osmio al 1 % durante 1:30 hs. a 4 °C en agitación y protegidos de la luz. Cumplido ese tiempo, los tejidos fueron lavados y luego deshidratados en alcoholes de graduación creciente y acetona absoluta. Finalmente, se realizó la inclusión en araldita (Durcupan ACM; Fluka, EEUU), teniendo especial cuidado en que la orientación del eje mayor del útero estuviera perfectamente alineada con el frente de corte del bloque. Los bloques fueron polimerizados a 60 °C durante 48 hs. (Fig. 15).

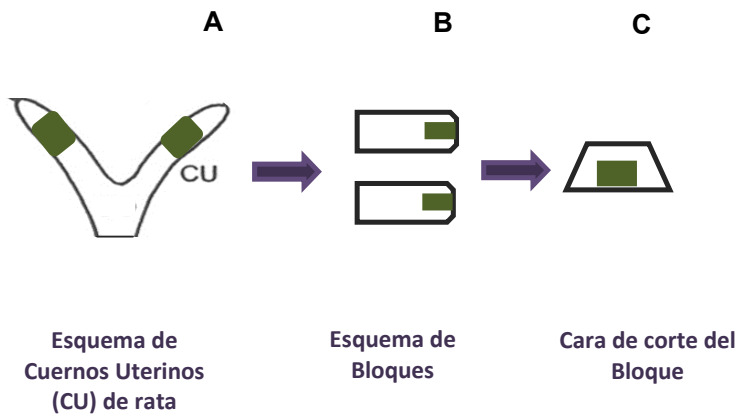


Figura 15. (A) Esquema representativo de la parte inferior del tracto genital femenino de la rata. En los cuernos uterinos se señala la región seleccionada para ser procesados para su estudio por MET (rectángulo verde). CU: cuerno uterino. (B) Esquema representativo de los bloques realizados con los tejidos; (C) cara de sección de corte del bloque. Nótese, que los tejidos fueron colocados de forma que el eje mayor del útero se encontrara alineado y fueran cortados de forma transversal.

Obtención y tinción de cortes. Utilizando un ultramicrotomo (*Power Time-XL*) se realizaron cortes semi-finos (250 nm de espesor) transversales al eje mayor del útero y obtenidos a dos diferentes profundidades dentro de la región media de cada cuerno uterino. Los cortes fueron teñidos con azul de toluidina borácico al 1 % y, bajo el microscopio óptico, se seleccionaron los campos de la capa miometrial longitudinal de los cuales se obtuvieron los cortes ultra-finos (70 nm); (Fig. 16). Estos cortes ultrafinos fueron montados en grillas de cobre de ventana y posteriormente contrastados con acetato de uranilo al 2 % y citrato de plomo al 1 %. Los cortes fueron examinados en un microscopio electrónico Jeol JEM1010 y las imágenes se capturaron a 14.000 y 19.000 aumentos utilizando una cámara digital.

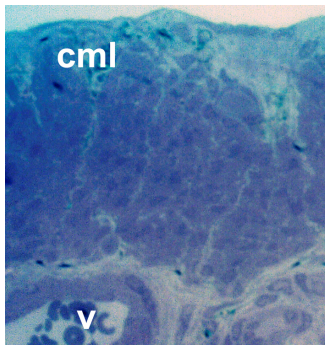


Figura 16. Imagen de un corte transversal semi-fino de cuerno uterino teñido con azul de toluidina que muestra la zona de la capa muscular longitudinal (cml) seleccionada para realizar los cortes ultra-finos para MET. v=vaso sanguíneo.

Cuantificación del alineamiento del colágeno. Para evidenciar los cambios en la orientación del colágeno perimuscular, en cada una de las imágenes que correspondía al área total se determinó: (a) el área total ocupada por colágeno perimuscular, (b) el área ocupada por colágeno perimuscular orientado paralelamente al eje mayor de las células musculares lisas, (c) el área ocupada por el colágeno que presenta una orientación perpendicular a este eje o que muestra una orientación azarosa en la matriz extracelular (MEC) perimuscular (Fig. 17). Además se evaluó el porcentaje de: (d) área ocupada solo por MEC perimuscular, (e) la relación MEC / células musculares lisas, y por último el porcentaje de MEC que era solo ocupado por colágeno sin importar su orientación. Estos valores se utilizaron para calcular el porcentaje de área ocupada por colágeno alineado, no alineado, área total de MEC, la relación que existía entre el área ocupada por MEC y la ocupada por las células musculares y, cuanta área de la MEC era ocupada por colágeno. Los estudios cuantitativos se realizaron utilizando el programa *Image ProPlus* (Media Cybernetics, EEUU).

Análisis estadístico. Los datos obtenidos de cada cuerno uterino (n=6) fueron promediados y analizados con el programa *GraphPad Prism 4*. Las medidas fueron expresadas como mediana y comparadas utilizando el test no-paramétrico de Mann-Whitney ya que los datos no presentaron una distribución normal. Se consideraron como significativos valores de $p < 0,05$.

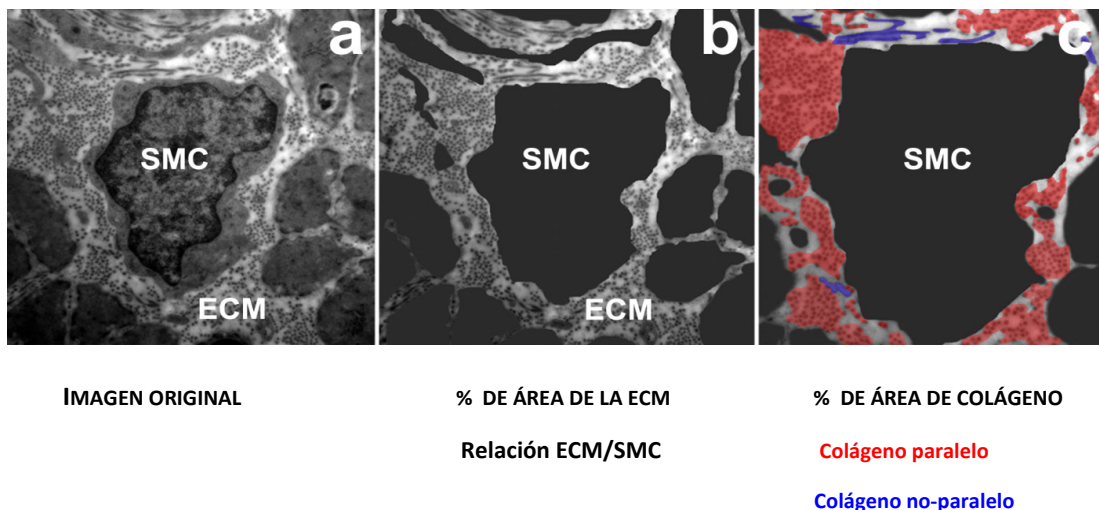


Figura 17. Esquema representativo del método utilizado para cuantificar los cambios en la orientación del colágeno en la matriz extracelular intersticial de la capa longitudinal del miometrio uterino proveniente de ratas prepúberes y púberes. SMC: células musculares lisas; ECM: matriz extracelular.

3. Crio-cultivo sobre cortes de tendón de cola de rata

Diseño y cortes de los bloques. Los tendones que componen la cola de la rata fueron aislados de manera aséptica y fragmentados en trozos de aproximadamente 1 cm de largo. Bajo lupa, los fragmentos fueron colocados forma paralela en un molde de silicona que contenía agua ultra-pura estéril. Luego de completar el volumen del molde se eliminó el exceso de líquido y se congeló la muestra a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se realizaron cortes a congelación ($14\text{ }\mu\text{m}$) paralelos a la cara del bloque los que fueron colocados en placas de cultivo de poliestireno de 35 mm (Greiner, Alemania) y mantenidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig. 18).

Para confirmar la influencia de la orientación del colágeno tendinoso sobre el crecimiento de las neuritas simpáticas, se colocaron cortes longitudinales de tendón en ángulo recto. Se evitó que los cortes estuvieran excesivamente separados o se superpusieran (Fig. 18).

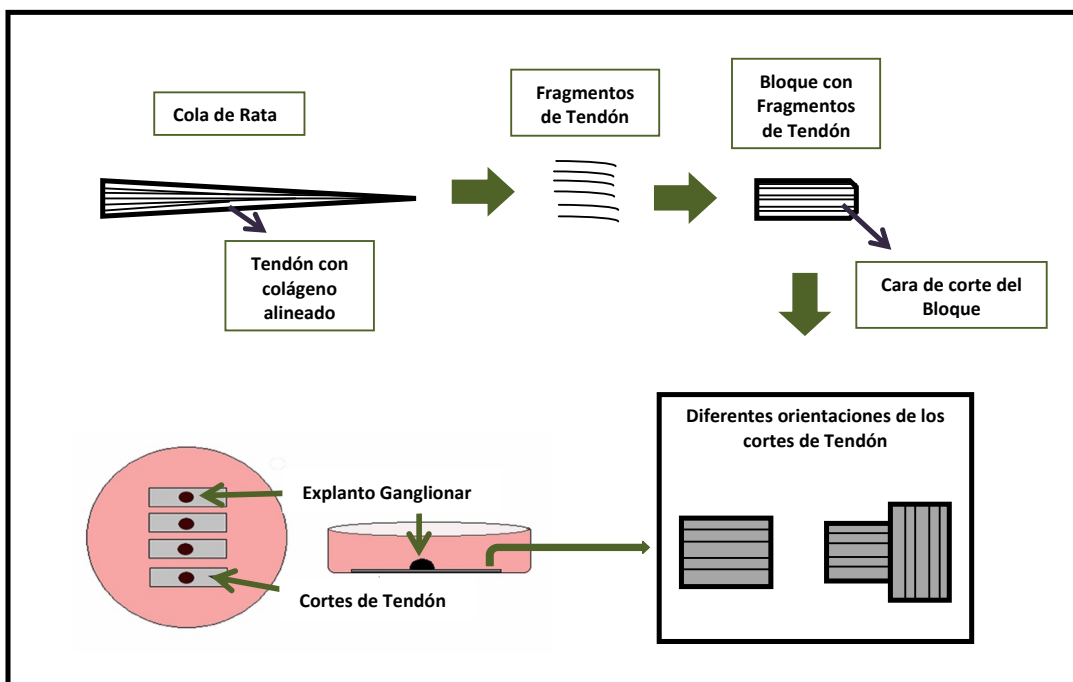


Figura 18. Esquema que ilustra el método de crio-cultivo de explantos ganglionares sobre cortes de tendón de cola de rata.

Obtención de Ganglios Cervicales Superiores. Los ganglios fueron obtenidos de ratas hembra neonatales (4–6 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. Luego de lavados, los explantos fueron sembrados sobre los cortes de tendón. Luego de permitir que se adhirieran al sustrato por 10 minutos, se colocaron 2 ml de medio Neurobasal desprovisto de suero (*Gibco, Invitrogen*, EEUU) suplementado con B-27 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). Los cultivos se mantuvieron por 72 hs. a 37 °C y 5 % de CO₂.

Coloración Vital. Las placas fueron incubadas por una hora a 37 °C con 5-carboxyfluorescein diacetate, acetoxymethyl ester (*Molecular Probes, Invitrogen*, EEUU), (0,8 %). Las preparaciones fueron examinadas bajo un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 800 utilizando el objetivo 4X. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara digital monocroma CoolSNAP-Pro asociada al programa Image ProPlus (*Media Cybernetics*).

Los ensayos de crío-cultivo fueron realizados en colaboración con la Lic. Paola Bianchimano

4. Cultivos en geles de colágeno Tipo I de diferente rigidez

Para la realización de cultivos 3D se utilizó colágeno Tipo I (*Gibco, Invitrogen*). Se gelificó el colágeno Tipo I (3 mg/ml) con una solución neutralizante compuesta por NaHCO₃ (0,08 M) y NaOH (0,2 M) y solución tampón fosfato salino 5X (PBS) llegando de este modo a una concentración final de colágeno de 1,89 (mg/ml). En todos los casos, se colocaron 4 gotas (40 µl) por placa de petri de 35 mm. Se realizaron tres experimentos independientes (4 placas por experimento); en cada experimento se colocó un explanto de GCS por gota de gel y se obtuvo un n=7-8 explantos en cada condición (menos rígido y rígido).

El procedimiento para aumentar la rigidez de los geles de colágeno se puso a punto en nuestro laboratorio y consistió en tratar las gotas de colágeno ya colocadas en la placa de petri (40 µl de colágeno 1,89 mg/ml) con glicolaldehído (GA); (0,2 M Buffer fosfato, pH 7,8 *Sigma-Aldrich*) 4 horas (1 ml /placa). Finalizada la incubación, el GA fue removido y se colocó 1 ml de etil-ester-glicina (1 M *Sigma-Aldrich*) durante una hora para detener la acción del reactivo. Finalmente los geles fueron lavados 10 veces con PBS (1X).

En ambos casos, se colocaron en cada gota de gel un explanto de ganglio cervical superior con una pipeta *Pasteur* estéril. Los explantos de GCS de ratas hembra neonatales fueron procesados como se describe para los análisis de crio-cultivos. Luego de permanecer por 15 minutos en una estufa a 37 °C, se agregaron 2 ml/placa de medio de cultivo (Neurobasal suplementado) y se incubaron durante 48 hs. Finalmente, los cultivos se tiñeron con colorante vital y se examinaron bajo microscopio de epifluorescencia como se detallara anteriormente.

Cuantificación del crecimiento neurítico. Utilizando un objetivo 4X, se capturaron imágenes digitales de cada explanto ganglionar. Para evaluar el crecimiento, el halo neurítico se dividió en 4 cuadrantes y se tomaron imágenes de cada uno, por lo menos en tres focos diferentes. En cada cuadrante, se midieron las neuritas más largas trazando una recta tangencial al borde del explanto, y luego otra hasta el extremo de la neurita, teniendo la precaución de que esta última partiera en forma perpendicular a la recta tangencial al borde del explanto como se ilustra en la Figura 19.

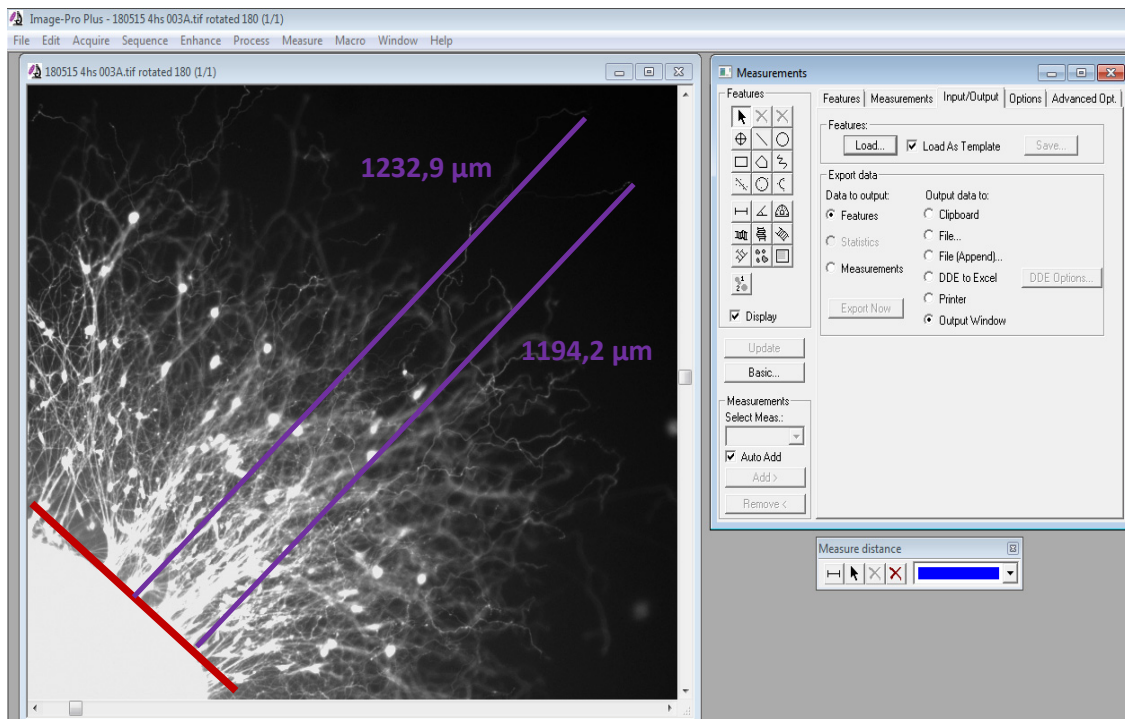


Figura 19. Imagen representativa de método cuantitativo utilizado para medir largo neurítico de explantos de GCS creciendo en geles rígidos y control.

Además, de evaluar el largo neurítico en los geles control y rígidos también se realizaron medidas de: (a) diámetro del Halo Neurítico, (b) diámetro del Halo de Células no-neurales y (c) diámetro del explanto ganglionar. Para ello, se realizó una reconstrucción del Halo neurítico de cada explanto mediante el programa *Photoshop CS5* y las imágenes resultantes fueron analizadas con el programa *Image ProPlus* como se ilustra en la figura 20.

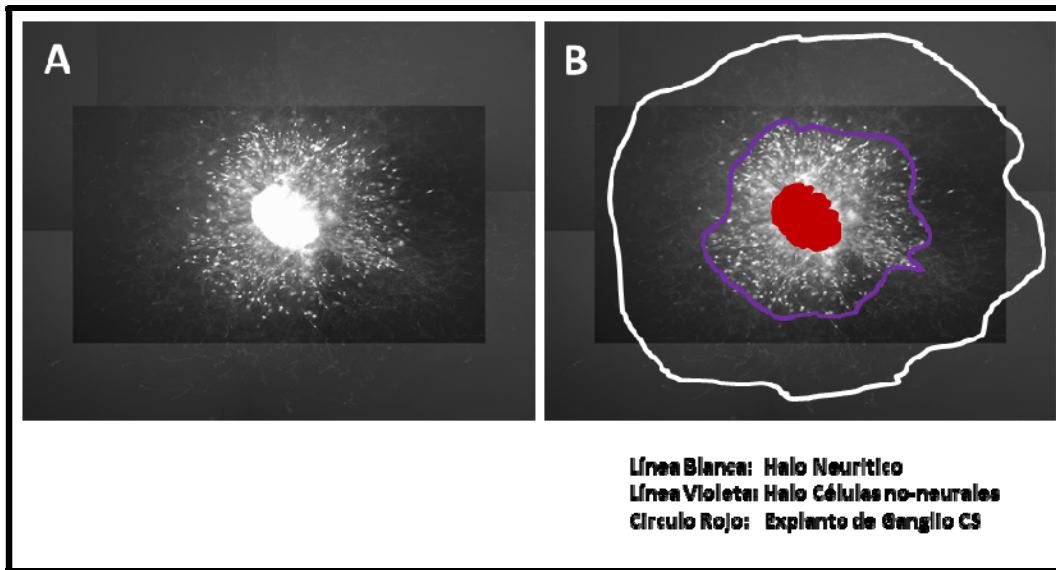


Figura 20. Imagen que representa el método cuantitativo utilizado para medir; Halo Neurítico (Línea Blanca), Halo de Células no-neurales (Línea violeta) y tamaño de Explanto de Ganglio Cervical Superior (GCS).

Los ensayos de cultivo tridimensionales fueron realizados bajo la supervisión de la Dra. Analía Richeri

5. Análisis de los conos de crecimiento en geles de colágeno 3D

En el marco de una pasantía de dos meses realizada en el Laboratorio de Neurobiología del Instituto de Investigaciones Médica “Mercedes y Martín Ferreyra” (Córdoba, Argentina), se establecieron las condiciones óptimas de procesamiento de los cultivos 3D para estudiar los conos de crecimiento de las neuritas simpáticas por inmunofluorescencia. Luego de diferentes aproximaciones, se eligió fijar los cultivos en una mezcla de paraformaldehído al 4 % y sacarosa al 4 % / (PFS) en PBS (1X; pH: 7,2 - 7,4) durante 20 minutos. Previo a esta fijación los cultivos fueron incubados con una solución de Fijación/Extracción durante 1

minuto, compuesta por PFS 1 %, Tritón 0,25 % en PBS (1X; pH: 7,2 - 7,4). Este paso permitió extraer proteínas solubles del citoesqueleto y mejorar así la visualización de la inmunofluorescencia. Este procesamiento, se realizó en dos experimentos independientes; en cada experimento se colocó un explanto de GCS por gota de gel y se obtuvo un n=5 en cada condición (menos rígido y rígido).

Inmunofluorescencia. Luego de terminado el proceso de fijación se realizaron tres lavados con PBS (1X) de 5 minutos cada uno y los geles fueron traspasados a una superficie hidrofóbica (Lamina de cera para placas dentales) la cual permitió contener las soluciones en los posteriores procedimientos hasta ser montados en porta-objetos. Seguidamente, los geles fueron incubados en 50 µl de solución de bloqueo que contenía BSA 5 % y Tritón 0,2 % durante una hora a temperatura ambiente, para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo y el marcador utilizado.

Para evidenciar microtúbulos del citoesqueleto se realizó el método de inmunofluorescencia indirecta. Para ello, se utilizó un anticuerpo primario en una dilución 1:1000 dirigido a tubulina tirosinada (Tir-Tub); (Sigma-Aldrich), y como anticuerpo secundario se utilizó Alexa 488 (Molecular Probes, Invitrogen) en una dilución 1:500. El anticuerpo primario fue incubado durante toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Pasado este tiempo los cultivos 3D fueron lavados y posteriormente incubados en el anticuerpo secundario durante 1 hora, en una solución de 1:5 de solución de bloqueo en PBS 1X (la misma solución en la cual se diluyó el anticuerpo primario). En este último procedimiento se colocó el marcador directo de F-actina, Faloidina - Rodamina (Molecular Probes, Invitrogen); (dilución 1:1000).

Como control se omitió el anticuerpo primario. Finalmente, los geles fueron lavados con PBS 1X en tres tiempo de 10 minutos, colocados en porta-objetos y montados con 50 µl de *fluorsave* (Linscott's Directory, EEUU). Los preparados fueron guardados a 4 °C protegidos de la luz hasta el momento de ser observados en el microscopio.

Microscopía y evaluación de cambios morfológicos en los conos de crecimiento.

Durante mi pasantía recibí entrenamiento en la utilización del Microscopio de Epi-fluorescencia (Nikon, Eclipse TE-2000E); equipado con el programa MetaMorph de adquisición de imágenes. Las imágenes fueron capturadas utilizando el objetivo 60X. El análisis de las imágenes capturadas se realizó con el programa ImageJ-Fiji.

Con el fin de cuantificar los cambios provocados por las alteraciones en la rigidez de los geles de colágeno, se comenzó cuantificando directamente bajo el microscopio siguiendo el siguiente procedimiento: (a) utilizando el canal verde ($\lambda=488$ nm), (Fluorescencia de la Tir-Tub marcada con Alexa 488) se eligió un campo que presentara, por lo menos, más de dos tips (extremo de los axones) (Fig. 7); (b) luego de escoger la zona se cambió al canal rojo ($\lambda=540$ nm), (Fluorescencia de la Actina marcada con Faloidina - Rodamina) y se contabilizaron cuántos de esos tips presentaban una morfología de citoesqueleto de actina tipo lamelipodios (red de actina), filopodios (largos filamentos de actina) o colapsada (sin marcación o marcación retrayente de actina). Esto se realizó manteniendo el criterio de elegir entre 4 y 5 zonas recorriendo en sentido horario la periferia del halo neurítico del explanto, región donde se esperan encontrar los conos de crecimiento de las neuritas (Fig. 21).

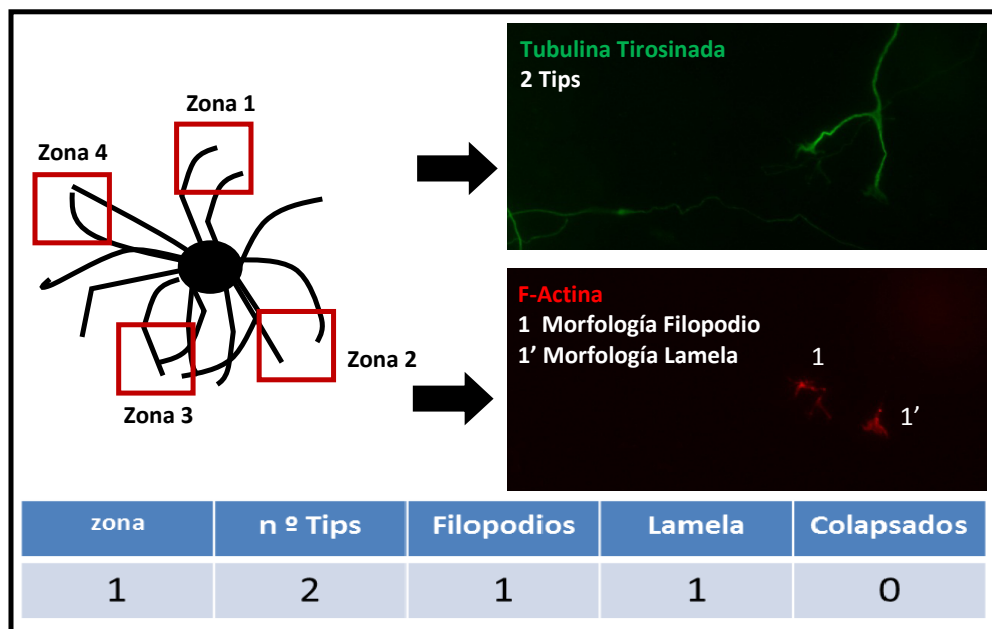


Figura 21. Ilustra el método cuantitativo utilizado para evaluar el efecto de la rigidez de geles 3D de colágeno en la morfología de los CC de neuritas simpáticas.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos de todos los estudios de cultivo en geles 3D se analizaron con el programa *GraphPad Prism 4*. Las medidas de crecimiento neurítico (largo y halo) fueron expresadas como media \pm EEM (error estándar de la media) y comparadas con el *test t de Student*. Se consideraron como significativos valores de $p < 0,05$.

1. Efectos de pubertad natural en la orientación del colágeno miometrial

En las ratas prepúberes, los espacios extracelulares que rodeaban a las células musculares lisas (CML) individuales contenían abundantes fibrillas de colágeno. La mayoría de estas fibrillas presentaban la misma orientación (alineamiento), aparecían cortadas transversalmente indicando que estaban orientadas siguiendo el eje mayor de las CML (Figs. 22A y C, asteriscos). Consistentemente, los estudios cuantitativos mostraron que un 80 % del colágeno se orientaba paralelamente al eje mayor de estas células (Fig. 22E).

En las ratas púberes en estro, se detectó que las fibrillas de colágeno perimuscular habían cambiado su orientación y ahora envolvían a las CML (Figs. 22B y D; asteriscos). Consistentemente, los estudios cuantitativos (Fig. 22E) mostraron que en las ratas púberes, el 57% del área total ocupada por el colágeno estaba representada por fibrillas orientadas transversalmente al eje mayor de las CML, mientras que el 43 % restante mantenía la orientación observada en las ratas prepúberes.

A nivel del tejido conjuntivo que rodea a los haces musculares, también se observaron altas cantidades de colágeno fibrilar. Como se muestra en las figuras 23A y 23B, durante la transición puberal las fibrillas de colágeno de estas regiones sufrieron cambios de orientación similares a los observados en las regiones de la matriz extracelular que rodea a las células musculares individuales que componen cada haz.

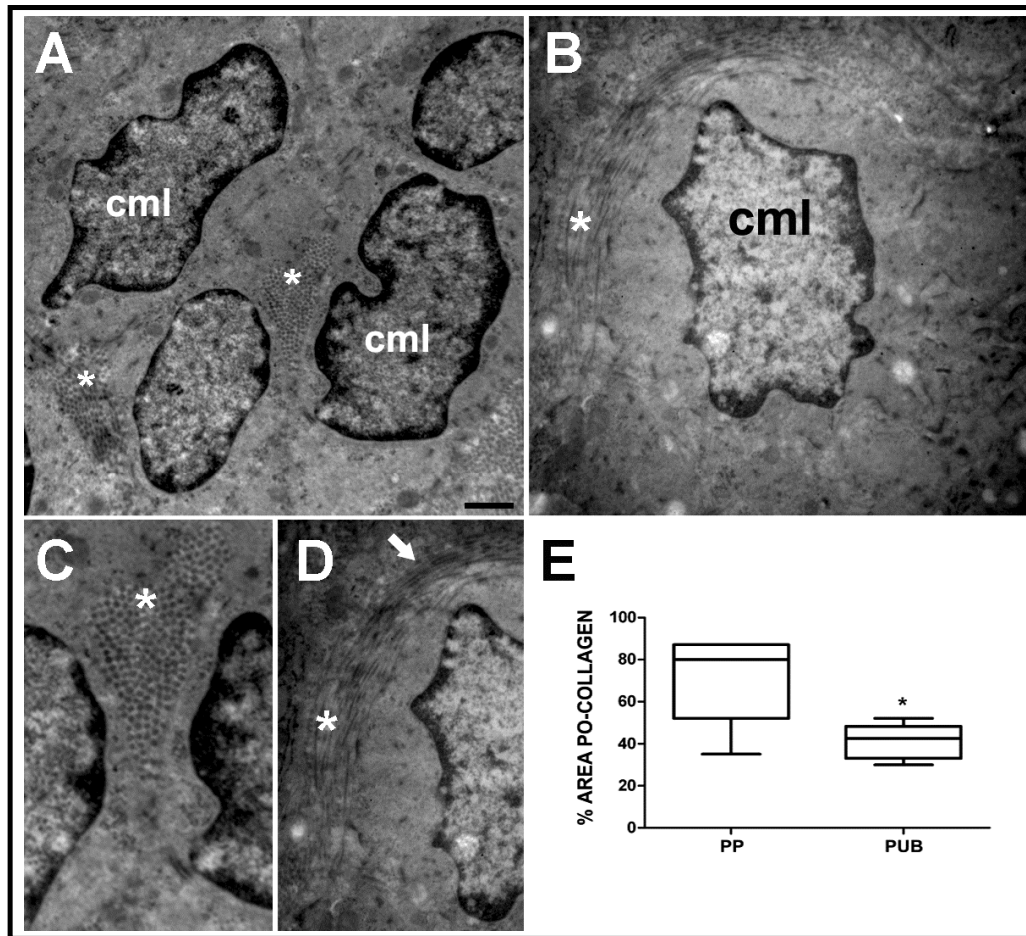


Figura 22. Imágenes ultraestructurales de cortes transversales del cuerno uterino de ratas prepúberes y púberes. (A, B) Se ilustran los cambios inducidos por la pubertad en el tamaño de las células musculares lisas (cml) así como en la orientación del colágeno (*) que ocupa la matriz extracelular perimuscular que las rodea. Nótese que en las hembras prepúberes las fibrillas de colágeno perimuscular se encuentran cortadas transversalmente y por lo tanto están orientadas siguiendo el eje mayor de las células musculares lisas (A). Luego de la transición de la pubertad, la fibrillas de colágeno se orientan perpendicularmente al eje mayor de las células musculares lisas (B). **C y D** muestran a mayor magnificación la zona de colágeno perimuscular (*) de hembras prepúberes y púberes respectivamente. La flecha blanca indica la zona donde las fibrillas de colágeno se encuentran más empaquetadas. **(E)** porcentaje del área total ocupada por colágeno fibrilar orientado en paralelo (PO-Collagen: del inglés *parallel orientation collagen*) a las células musculares lisas. Las medianas fueron comparadas utilizando el test no-paramétrico de Mann-Whitney. * = $p < 0.02$. Barra de calibración = 1,6 μm (A-B) y 3,2 μm (C-D).

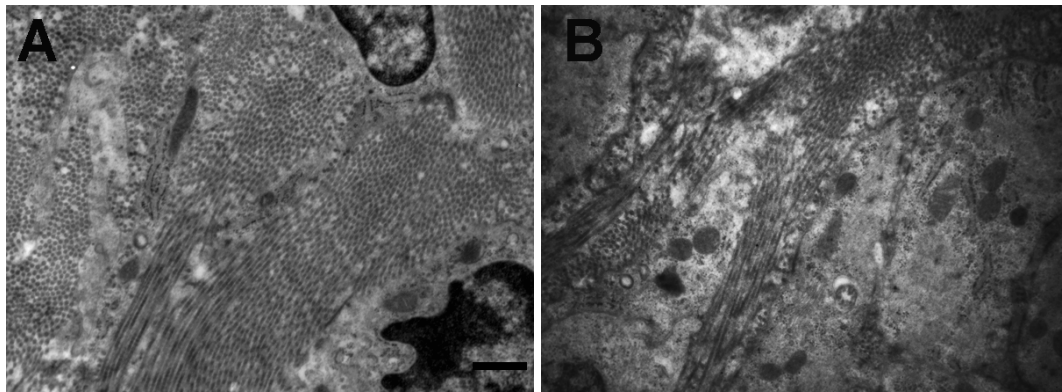


Figura 23. Ultraestructura de la orientación del colágeno en el tejido conjuntivo. Imágenes ultraestructurales de cortes transversales del cuerno uterino de ratas prepúberes (A) y púberes (B). En ellas se observan regiones del tejido conjuntivo que separan los haces miometriales. Nótese que en las ratas prepúberes, la mayoría de las fibrillas de colágeno se encuentran orientadas siguiendo el eje mayor del cuerno uterino, mientras que en las ratas púberes, el colágeno tiene una orientación predominantemente perpendicular a dicho eje o al azar. Barra de calibración = 2 μ m.

Los restantes parámetros cuantificados en la MEC perimuscular, incluyendo el área total ocupada por el colágeno (Fig. 24A), porcentaje de área ocupado por la MEC que rodea a las CML individuales (Fig. 24B) y la relación entre el área de la matriz extracelular y las células musculares lisas (MEC/SMC), (Fig. 24C) no presentaron alteraciones significativas.

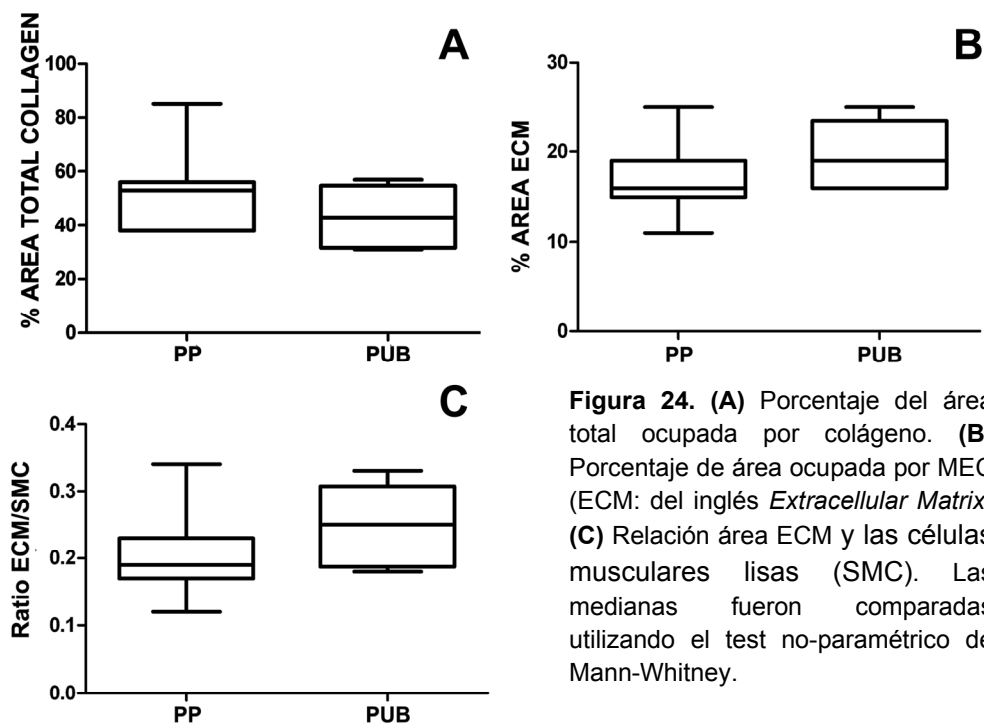


Figura 24. (A) Porcentaje del área total ocupada por colágeno. **(B)** Porcentaje de área ocupada por MEC (ECM: del inglés *Extracellular Matrix*) **(C)** Relación área ECM y las células musculares lisas (SMC). Las medianas fueron comparadas utilizando el test no-paramétrico de Mann-Whitney.

2. Patrón de crecimiento en crio-cultivos de tendón

Los explantos de ganglios simpáticos crecieron exitosamente sobre los cortes a congelación de tendón. Dicho crecimiento se extendió exclusivamente en la dirección del eje mayor del corte longitudinal del tejido y no se observó crecimiento en sentido transversal al mismo (Figs. 25A, B).

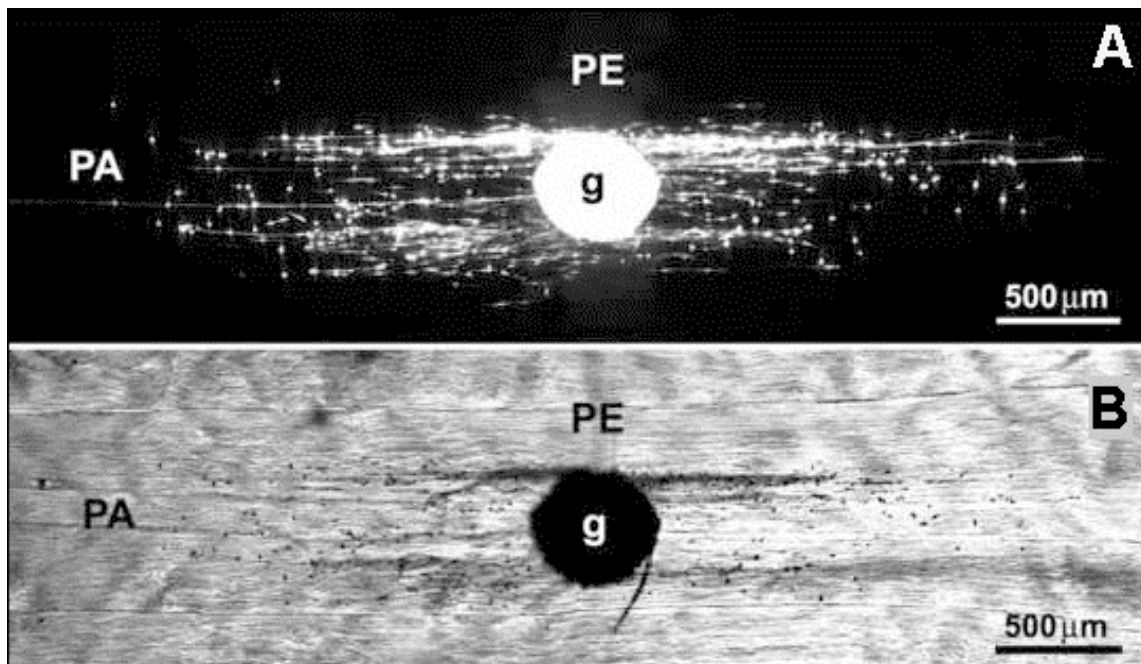


Figura 25. Imágenes representativas del crecimiento de las neuritas simpáticas sobre cortes longitudinales de tendón de cola de rata. (A) Coloración vital; (B) Tinción con Azul de Toluidina. Nótese que las neuritas crecen en forma paralela (PA) siguiendo la orientación del tejido utilizado como sustrato pero no son capaces de crecer perpendicularmente (PE) al mismo. G, explanto de ganglio simpático.

En los ensayos en que se colocaron cortes longitudinales de tendón de forma adyacente y en ángulo recto (Fig. 26A), se observó que la mayoría de las neuritas detenían su avance al encontrar el corte orientado perpendicularmente. Sin embargo, las que sobrepasaron el límite entre ambos cortes, cambiaron la dirección de su crecimiento, realizando un giro de 90°, adaptando su curso al eje mayor del corte longitudinal de tendón. Las neuritas que crecían del lado contralateral del ganglio presentaron un largo mayor, lo que indica que las mismas contaban con una buena tasa de crecimiento.

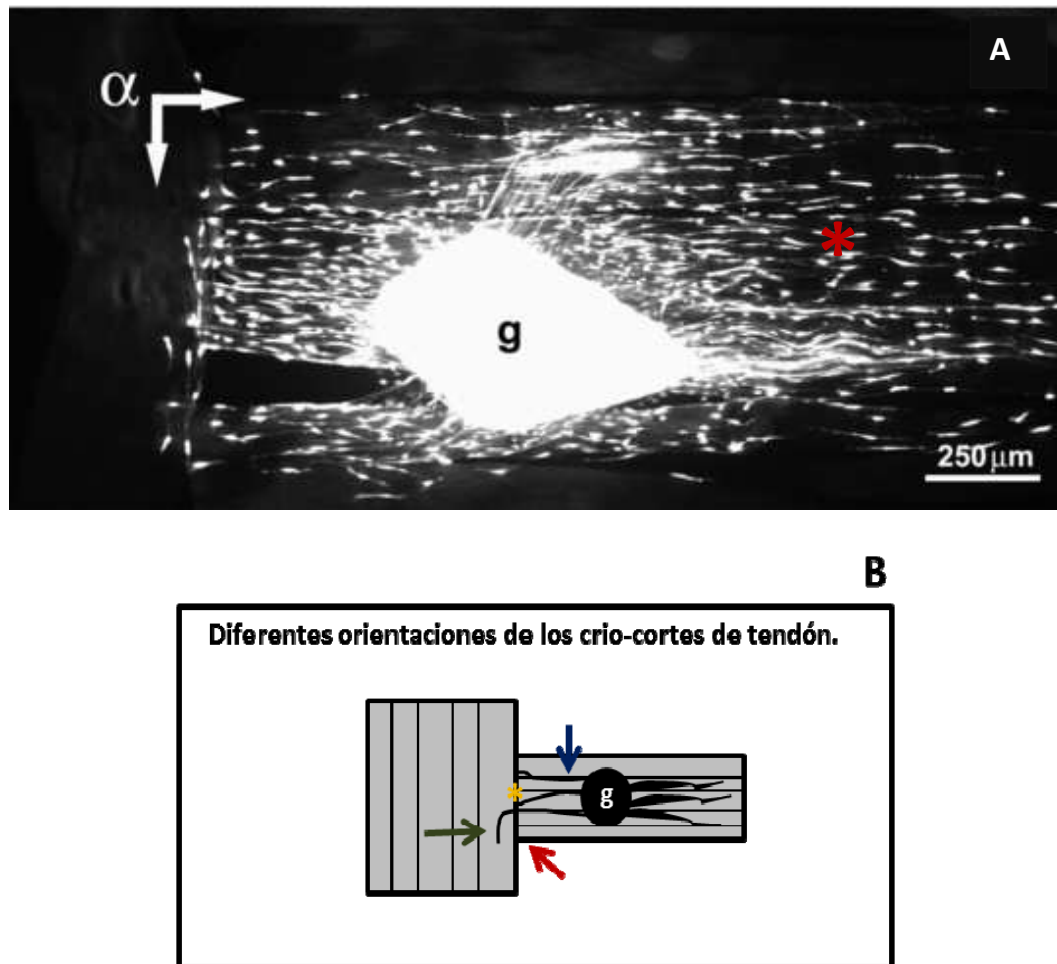


Figura 26. Crecimiento de las neuritas simpáticas sobre cortes longitudinales de tendón en diferentes orientaciones. (A) Figura que ilustra crío-cultivos creciendo sobre cortes longitudinales de tendón colocados en ángulos rectos (α). Cuando las neuritas llegan a la sección de corte colocada adyacente y perpendicular doblan hasta 90° y no crecen más allá de ese límite. Sin embargo, si se observa la región contralateral del crío-cultivo las neuritas presentan un gran crecimiento (asterisco rojo). (B) Esquema representativo de cómo fueron orientados los cortes longitudinales de tendón. La flecha roja indica la representación del corte de tendón que fue ubicado perpendicularmente adyacente al corte donde vienen creciendo las neuritas simpáticas, de este modo se evitó posible impedimento por sobre-posición de los cortes del crecimiento neurítico. La flecha azul, neurita que toma la orientación del corte de tejido, flecha verde neurita que toma la orientación del corte de tejido con el que se encuentra. El asterisco naranja indica neuritas que detienen su crecimiento.

3. Efectos de la rigidez de matrices de colágeno Tipo I en el crecimiento neurítico simpático

En los geles de colágeno control (no tratados con glicolaldehído, GA), se observó que las neuritas formaban un halo simétrico alrededor del explanto ganglionar. Estas neuritas eran delgadas y no formaban fascículos en entre sí (Figs. 27A y 28A). En los geles rígidos tratados con GA también se formaron halos simétricos. Sin embargo, las neuritas se encontraban fasciculadas especialmente en la cercanías del explanto (Figs. 27B y 28B).

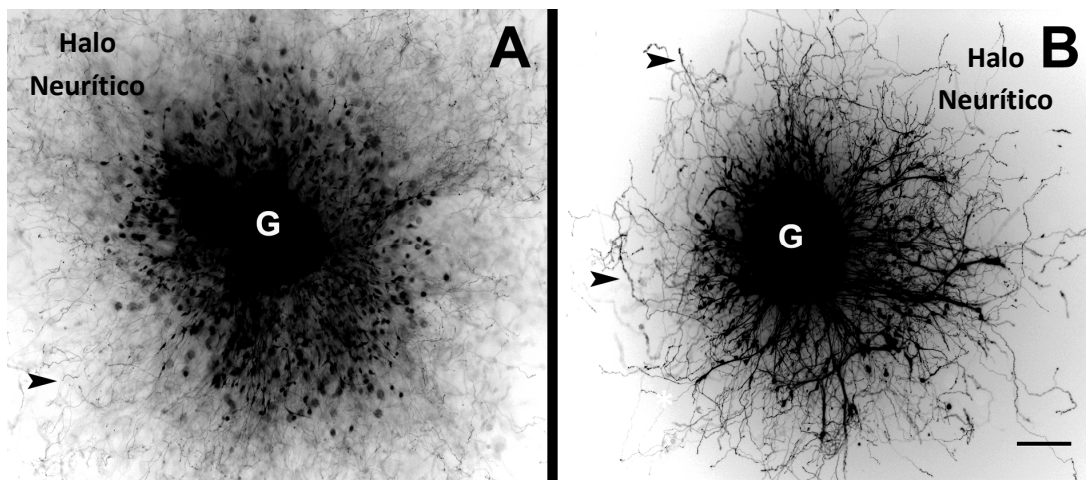


Figura 27. Crecimiento neurítico en geles de colágeno Tipo I. Explanto de ganglio neuronal (G) creciendo en un gel control (A) y un gel rígido (B). Se puede observar el tamaño del Halo Neurítico en ambas condiciones, las cabezas de flechas negras indican las neuritas presentes en cada halo mostrando que en el gel control el número de neuritas es mayor y que se encuentran menos fasciculadas en comparación con el rígido. Los cultivos fueron revelados con un colorante vital fluorescente. En vista del gran ruido de fondo que producía el mismo las imágenes fueron invertidas en su color para poder evidenciar más claramente el halo neurítico. Barra de calibración = 250 μ m

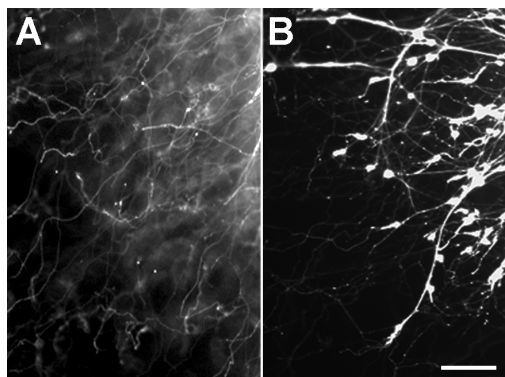


Figura 28. Crecimiento neurítico en geles 3D evidenciados con coloración vital. (A y B) Imágenes a mayor magnificación de las neuritas creciendo en ambas condiciones, control y rígida, respectivamente. Nótese que las neuritas que crecieron en un gel rígido se encuentran más fasciculadas en comparación con el gel no rígido Barra de calibración = 100 μ m.

El crecimiento neurítico en los geles de colágeno rígidos fue marcadamente menor al observado en los geles control. Esta diferencia se vio reflejada en el diámetro de sus halos neuríticos (HN), siendo este parámetro significativamente menor en los geles rígidos (Media \pm EEM; Control, 2011 \pm 112 vs Rígido, 1535 \pm 115, Fig. 29A). Para descartar la posibilidad de que el tamaño del HN estuviera influenciado por el tamaño del explanto ganglionar, normalizamos el tamaño del halo contra el diámetro del explanto, y esto también mostró un descenso significativo del crecimiento neurítico en geles rígidos (Fig. 29B). Además, medimos el largo neurítico mayor, como otra forma de evaluar diferencias inducidas por la rigidez, y también observamos una reducción en este parámetro (Media \pm EEM = 1122 \pm 75 vs 843 \pm 48, Fig. 30).

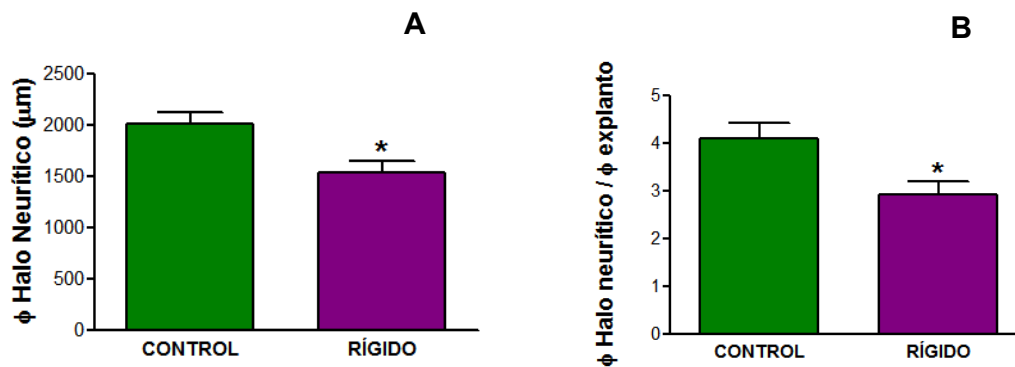


Figura 29. Graficas que muestran las medidas de: **(A)** diámetro (ϕ) de Halo Neurítico; **(B)** ϕ Halo Neurítico corregido con el ϕ del Explanto Ganglionar. Las medidas fueron expresadas como media + EEM (error estándar de la media) y comparadas con el test t de Student. Se consideraron como significativos valores de $p < 0,05$.

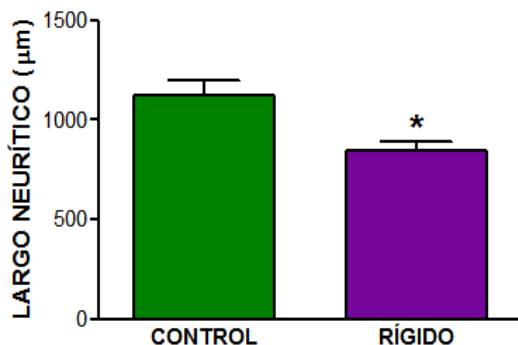
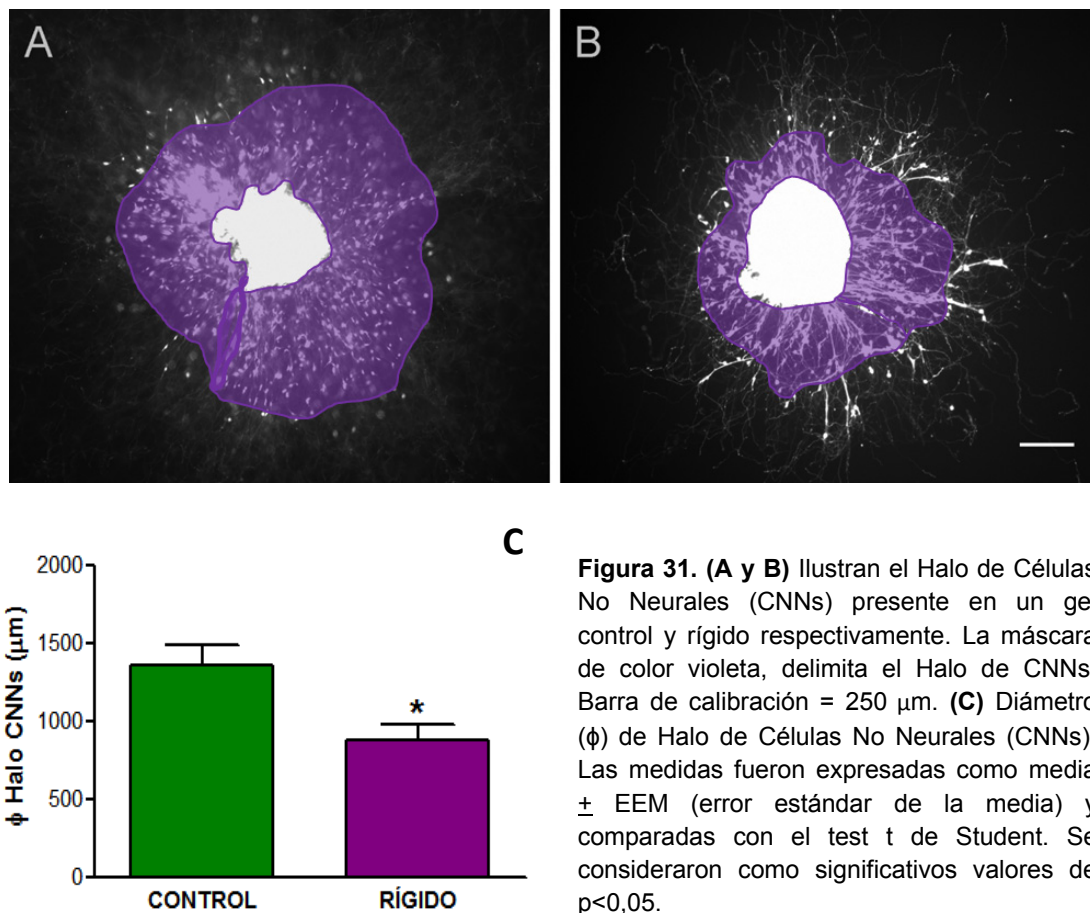


Figura 30. Gráfica que muestra el largo neurítico en ambas condiciones. Las medidas fueron expresadas como media + EEM (error estándar de la media) y comparadas con el test t de Student. Se consideraron como significativos valores de $p < 0,05$

En los geles control, se observaron numerosas células no-neuronales que migraban desde el explanto ganglionar y formaban un halo celular. Este halo siempre fue de tamaño menor al formado por las neuritas (Fig. 31A y B). En los geles rígidos, la migración de células no-neuronales desde el ganglio fue menor (Fig. 31B) y también el halo celular fue 35 % más reducido que en los controles (Fig. 31C).



4. Efectos de la rigidez de matrices de colágeno Tipo I en la morfología del cono de crecimiento de las neuritas simpáticas

Realizando inmunofluorescencia pudimos observar que los cambios en la rigidez del colágeno provocan un impacto en la morfología del citoesqueleto de F-actina de los conos de crecimiento (CC), (Fig. 32A - C). Estos estudios mostraron que los CC de las neuritas que crecían en geles control presentaban mayoritariamente una morfología de largos filopodios y en algunos casos una lamela (red de Actina) bien pronunciada (Fig. 32A y B). Si bien en los geles rígidos, también se observaron CC con estas morfologías, aumentó sustantivamente la presencia de CC colapsados (Fig. 32C). Esta morfología se caracteriza por una retracción del citoesqueleto de F- Actina (Fig. 32C, flecha).

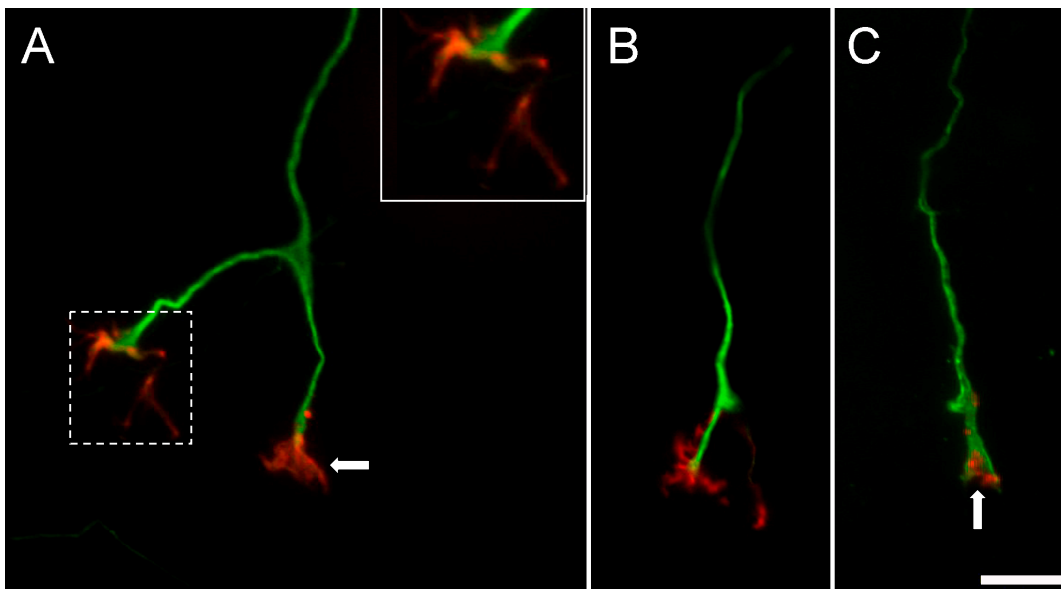


Figura 32. Imágenes de fluorescencia que muestran la morfología de conos de crecimiento de neuritas simpáticas creciendo en geles de colágeno Tipo I. (A y B) CC creciendo en geles control (menos rígidos), (C) CC creciendo en gel rígido. (A) Se observan prolongaciones de filamentos de Actina (Rojo) de morfología de filopodio (recuadro punteado blanco). Recuadro arriba a la derecha, muestra a mayor magnificación estructuras de filopodios del cono de crecimiento resaltado en el recuadro punteado blanco. La flecha indica una lamela bien pronunciada (A). (C) CC de axón simpático creciendo en un gel de colágeno rígido con marcación de F-actina (Rojo) típica de un cono colapsado. Nótese, que la actina no presenta estructura de filopodio sino que se encuentra retraída en el extremo del CC (Flecha Blanca). Tir-tubulina en Verde. Barra de calibración = 10 μm (A,B,C); 7 μm (recuadro en A).

Apoyando estas observaciones, la cuantificación mostró que en los geles rígidos, el 26 % de las neuritas simpáticas presentaron CC colapsados, mientras que esta morfología sólo se detectó en el 3 % de las neuritas que crecían en geles control.

Por otra parte, mientras que en los geles control, el 66 % de los CC presentaron estructuras de lamela y el 31 % largos filopodios, en los geles rígidos los CC con estas morfologías representaban el 53 % y 21 %, respectivamente (Fig. 33).

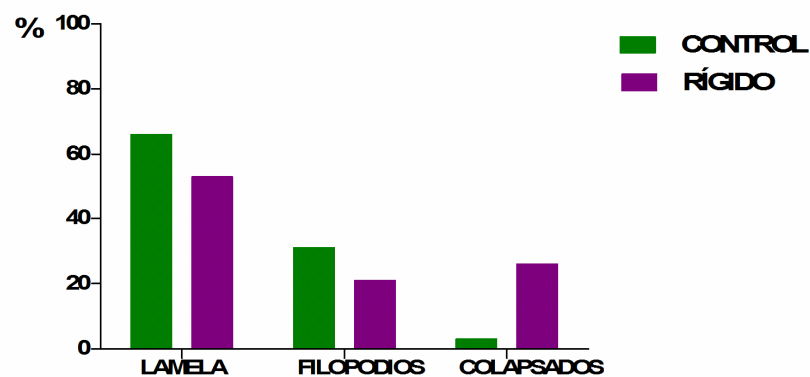


Figura 33. Gráfica que muestra las distintas morfologías (lamela, filopodio y colapsado) de los conos de crecimiento de explantos de Ganglios Cervicales Superiores detectadas dentro de geles de colágeno Tipo I control (menos rígido) y rígidos. Nótese que el porcentaje de conos de crecimiento colapsados fue mayor cuando crecían embebidos en geles de colágeno Tipo I rígido.

1. La pubertad produce cambios en la orientación de las fibrillas de colágeno miometrial

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el aumento fisiológico de los niveles de estrógeno que marca el inicio de la pubertad provoca un cambio significativo en la orientación del colágeno fibrilar que rodea a las células musculares lisas del miometrio uterino. Estos resultados confirman y amplían observaciones previas realizadas durante mi trabajo de Grado utilizando ratas adultas ovariectomizadas y tratadas con estrógeno.

En ambos casos se observó que cuando los niveles de estrógeno son bajos (ratas ovariectomizadas y prepúberes) la mayor parte de las fibrillas de colágeno localizadas en la matriz extracelular perimuscular, se encontraban altamente alineadas y orientadas en forma paralela al eje mayor de las células musculares lisas. Más aun, los estudios cuantitativos mostraron que la proporción del colágeno total que presenta esta orientación es similar en las ratas prepúberes y las ratas adultas castradas (80 % y 83 %, respectivamente).

Tanto la pubertad como la administración de estrógeno a las ratas adultas ovariectomizadas provocó un cambio en la orientación de las fibrillas de colágeno, que pasaron de tener una orientación paralela al eje mayor de las células musculares lisas a orientarse de forma perpendicular a este eje. Sin embargo, la proporción de fibrillas que sufrieron esta reordenamiento fue mayor en las ratas adultas tratadas con estrógeno que en las ratas púberes (89 % y 57 %, respectivamente). Esta diferencia podría estar vinculada a la utilización de dosis supra-fisiológicas de estrógeno y el mayor tiempo de exposición a la hormona en las ratas adultas.

La existencia de procesos de remodelación en el colágeno uterino se ha descrito en condiciones fisiológicas, patológicas y experimentales. Por ejemplo, en el cuello uterino, ocurre una pérdida de tensión al acercarse el parto, que se asocia con profundos cambios estructurales en el colágeno Tipo I cervical (Timmons y col., 2010). En los leiomiomas uterinos (fibromas) existen cambios en la estructura y orientación de las fibrillas de colágeno, lo que sugiere que la formación de estas en el miometrio se altera en estos tipos de tumores (Leppert y col., 2004). Finalmente, se ha demostrado que los ratones con diabetes experimental presentan una desorganización del colágeno fibrilar, que deja de mostrar la organización altamente alineada y orientación paralela al eje mayor de las células musculares lisas que se observa en los ratones control (Favaro y col., 2010).

Todavía no contamos con una explicación de cómo el estrógeno induce cambios en la orientación del colágeno perimuscular. Una posibilidad es que el aumento en el tamaño de las células musculares que provoca el estrógeno pudiera “comprimir” el espacio extracelular y modificar la orientación de las fibrillas de colágeno. Esta posibilidad podría verse sustentada por los resultados obtenidos en las ratas adultas tratadas con estrógeno, en las que se observó una reducción significativa en el área de la MEC perimuscular y en la relación entre el área de MEC y el área de las células musculares lisas. Contrariamente, los cambios provocados por la pubertad en la orientación del colágeno perimuscular no podrían ser atribuidos a este fenómeno, ya que no se detectaron cambios significativos en estos parámetros.

Otro de los posibles mecanismos que podrían causar este fenómeno de reorientación incluiría alteraciones en la interacción de las fibrillas de colágeno con otras moléculas de la MEC, como por ejemplo con el proteoglicano decorina. La decorina se une a las fibrillas de colágeno y se vincula con procesos de fibrologénesis y de orientación del colágeno fibrilar en la MEC (Danielson y col., 1997; Pins y col., 1997). Esto es apoyado por observaciones ultraestructurales que demostraron que los ratones mutantes que no expresan decorina, presentan desorganización en las fibrillas de colágeno endometriales (Sanchez y col., 2010). Por otra parte, se ha evidenciado que la expresión de decorina puede ser regulada por el estrógeno y la gestación (San Martin y Zorn, 2003; Wu y col., 2005).

2. Los cambios en la orientación de las fibrillas de colágeno miometrial coinciden temporal y espacialmente con la inhibición del crecimiento de los nervios simpáticos durante la pubertad

Como se detallara en la Introducción de esta Tesis, estudios realizados en nuestro Laboratorio mostraron que la pubertad provoca una inhibición del crecimiento de los nervios simpáticos el cual conduce a un descenso irreversible en la densidad de inervación miometrial que perdura en la vida cíclica adulta (Brauer y col., 1992). Como mostramos en este trabajo, este fenómeno de inhibición del crecimiento nervioso simpático ocurre simultáneamente con los cambios en la orientación de las fibrillas de colágeno que rodean a las células musculares lisas.

Cabe destacar, que estos cambios en la orientación del colágeno fibrilar ocurren en las áreas donde se localizan las fibras nerviosas terminales destinadas al miometrio. Como se muestra en la figura 34, estudios cuantitativos realizados durante mi pasantía de grado mostraron que en las ratas prepúberes, el 96 % de los axones simpáticos miometriales se encontraban asociados con los haces musculares (confinados a la MEC perimuscular), mientras que sólo un 4 % de los axones cursaba por el tejido conjuntivo que separaba dichos haces. Más aún, estos estudios mostraron que los nervios que cursaban por el tejido conjuntivo presentaban un diámetro de más de 3 μm , lo que es concordante con haces nerviosos de distribución. Los axones asociados a las fibras musculares tenían un diámetro promedio de 1.6 μm , y el 65 % tenía un diámetro medio de 1 μm .

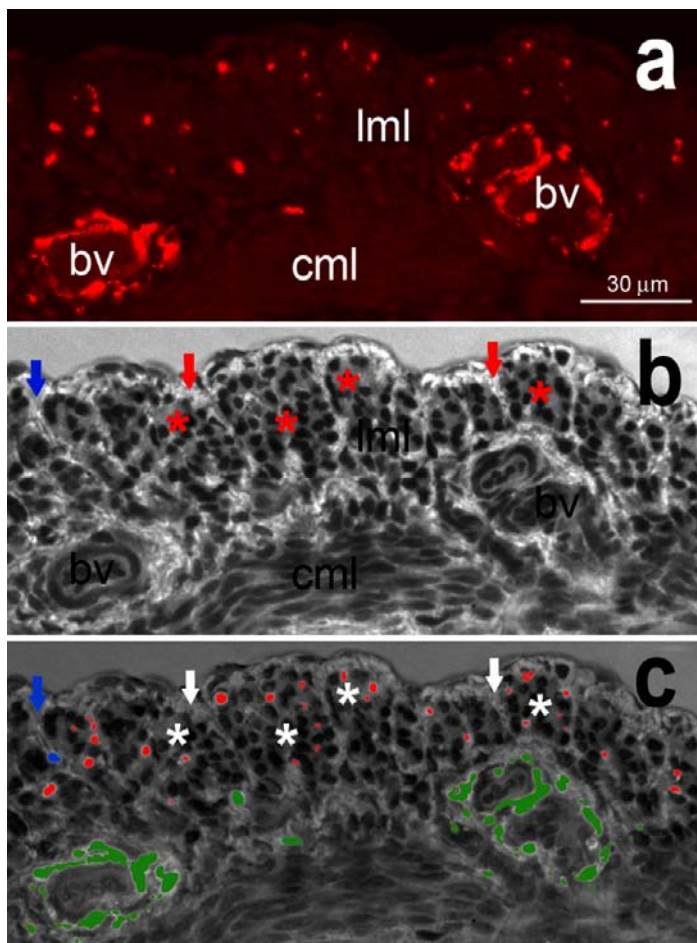


Figura 34. Distribución de fibras simpáticas en el miometrio de la rata prepúber.

En (a), se muestra la inervación simpática (inmunofluorescencia, anti-tirosina hidroxilasa). En (b), se muestra la misma región del corte, ahora visto en campo claro y teñido con azul de toluidina. Los asteriscos señalan los haces musculares y las flechas los tabiques de tejido conjuntivo que separa dichos haces. En (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). lml (*del inglés*: longitudinal muscle layer), cml (*del inglés*: circular muscle layer), bv (*del inglés*: blood vessels). Imagen tomada de Martínez, 2012.

3. La orientación del colágeno afecta el crecimiento de las neuritas simpáticas: evidencias de los crío-cultivos sobre cortes de tendón

Con el fin de evaluar la relevancia de la orientación del colágeno fibrilar sobre el crecimiento neurítico simpático, en el presente estudio analizamos este crecimiento en crío-cultivo, utilizando como sustrato cortes a congelación de tendón de cola de rata. Como se explicara anteriormente, este tejido fue elegido porque se encuentra constituido en un 97 % de colágeno Tipo I altamente alineado.

Como era nuestra expectativa, las neuritas crecieron ordenadamente y siguiendo el eje mayor del corte de tendón y muy probablemente el de las fibrillas de colágeno. El patrón de crecimiento de las neuritas en los crío-cultivos de tendón fue similar al de los crío-cultivos en los que se utilizó como sustrato cortes de miometrio provenientes de ratas ovariectomizadas, donde las neuritas crecían siguiendo la orientación del eje mayor de las células musculares lisas, y probablemente la orientación longitudinal del colágeno fibrilar que las rodea (Richeri y col., 2010; Martínez, 2012).

Sobre los cortes de tendón, no se observaron neuritas que crecieran perpendicularmente al eje longitudinal del tendón/colágeno. Esto confirma la relevancia de la orientación del colágeno no sólo en el direccionamiento sino también en la extensión del crecimiento neurítico (Dubey y col., 1999; Ceballos y col., 1999). Cabe también resaltar que en los ensayos en que se colocaron cortes adyacentes de tendón en ángulo recto, algunas neuritas torcieron su curso de crecimiento para adaptarse a la nueva disposición espacial del colágeno tendinoso. Observaciones similares se realizaron en crío-cultivos de miometrio cuando las neuritas simpáticas en crecimiento alcanzaban el límite entre dos capas musculares (longitudinal y circular), (Fig. 35).

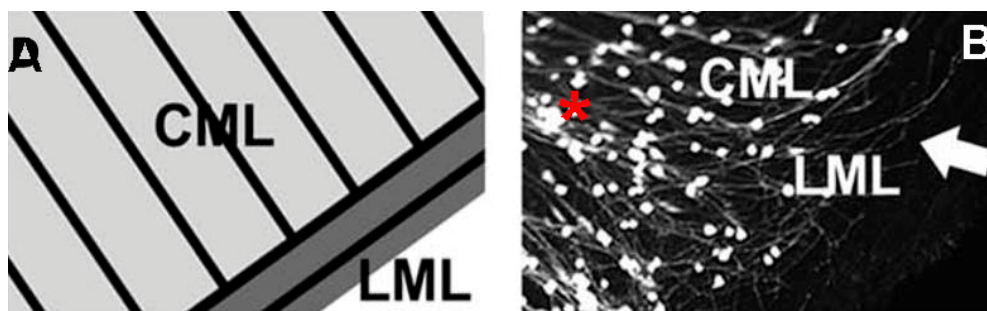


Figura 35. Crío-cultivo de ganglio simpático creciendo sobre un corte longitudinal de miometrio uterino. Nótese que el crecimiento neurítico sigue el eje axial mayor (*) de las células musculares lisas (CML) (B), y como las neuritas reorientan su crecimiento adaptándose a la orientación que poseen las células musculares de la capa LML (flecha). (A) esquema representativo de la orientación de las células musculares presentes en el crío-corte subyacente. Capa muscular circular (CML) y Capa muscular longitudinal (LML). Imágenes tomadas de Richeri y col., 2010.

Tomados en su conjunto, los resultados obtenidos en estas investigaciones refuerzan la importancia de la micro-arquitectura y geometría del ambiente donde crecen los axones para su direccionamiento y grado de crecimiento (Pettigrew y Crutcher, 1999, 2001). Cabe mencionar, que este conocimiento básico ha llevado al desarrollo, por ingeniería de tejidos, de ambientes topográficos que favorezcan el crecimiento de los nervios lesionados (McCormick y Leipzig, 2012).

El colágeno fibrilar es uno de los componentes más utilizados para esta clase de nanotecnología, ya que su alineamiento en el espacio favorece el direccionamiento de los axones (Phillips y col., 2005; Georgiou y col., 2013). Por ejemplo, existen evidencias de que el estiramiento de las matrices 3D del colágeno provoca un alineamiento del mismo que incrementa la extensión neurítica (Eats y col., 2010). Hoy en día existen compañías que fabrican nano-túbulos de colágeno Tipo I alineado para su utilización como conductos guías en lesiones de nervios periféricos. Más aún, estudios *in vivo* mostraron que el implante de nano-túbulos con esas características promueve la regeneración axonal en lesiones de nervio facial de ratas (Cao y col., 2012); y existen evidencias que señalan al tendón como posible conducto guía para la regeneración de axones lesionados. En 2014 Alberti y colaboradores observaron que las neuritas de los ganglios de la raíz dorsal crecían siguiendo la orientación del tendón. Si bien este tejido no aumentaba la extensión del largo neurítico respecto a los geles de hidratados de colágeno (orientación al azar), sí presentaban cambios notorios en su direccionamiento. Colectivamente, estas evidencias refuerzan la idea de que el alineamiento del colágeno por sí mismo favorece a la extensión y el direccionamiento de los axones (Phillips y col., 2005; Georgiou y col., 2013).

Más allá de las evidencias de la influencia del alineamiento del colágeno en la extensión neurítica, hoy se sabe que no sólo las señales topográficas del ambiente influyen en este crecimiento; sino que la interacción entre señales químicas y topográficas realizan un balance para favorecer el crecimiento y direccionamiento de los axones en procesos de regeneración (Bozkurt y col., 2007; Madduri y Gander, 2011; Ma y col., 2014; Man y col., 2014; Zeng y col., 2014). Por esta razón, no podemos descartar la idea de que el patrón de crecimiento que observamos en los crio-cultivos de tendón pueda estar influenciado por otras moléculas de la MEC, tales como la decorina (Scott y col., 1981). De la misma manera, si bien el estrógeno causa un cambio en la orientación del colágeno del miometrio que podría afectar el crecimiento de los nervios simpáticos tanto en crio-cultivo como *in situ*, no podemos obviar, la existencia de otras señales en la MEC de efecto negativo para los nervios simpáticos.

A modo de ejemplo, estudios recientes en ratones, han demostraron que en la cicatriz que se forma en el miocardio luego del infarto los proteoglicanos inhiben el crecimiento neurítico simpático *in vitro* y evitan que ocurra la reinervación *in vivo* (Gardner y Habecker, 2013).

3. El aumento de la rigidez de matrices 3D de colágeno Tipo I causa una disminución en el crecimiento de las neuritas simpáticas

Las imágenes ultraestructurales sugirieron que además de cambios en la orientación del colágeno fibrilar podrían también ocurrir cambios en la compactación de las fibrillas lo que alteraría la rigidez del mismo. Se desconocen, sin embargo, los efectos de la rigidez sobre el crecimiento de las neuritas simpáticas. Si bien en la bibliografía se han presentado evidencias de que la rigidez de las matrices usadas en ensayos *in vitro* influye en el crecimiento de los axones, las respuestas de los mismos dependen en gran parte del tipo neuronal. Por ejemplo, en las neuronas periféricas el aumento de la rigidez promueve el crecimiento neurítico (Man y col., 2011) mientras que en las neuronas centrales lo inhibe (Koch y col., 2012; Chen y col., 2013).

Con el fin de evaluar cómo los cambios en la rigidez de las matrices de colágeno Tipo I podrían afectar el crecimiento de las neuritas simpáticas utilizamos cultivos en geles 3D de colágeno de diferente dureza. Los análisis cuantitativos mostraron que cuando los axones simpáticos se enfrentan a un ambiente en el que el colágeno se encuentra más compactado y por ende más rígido, muestran un crecimiento menor al observado en las matrices menos rígidas. Esto nos indicó que no sólo el cambio de la orientación del colágeno provoca un efecto en el crecimiento de las neuritas, sino que sus propiedades físicas también jugarían un papel relevante.

La inhibición del crecimiento neurítico observado en las matrices rígidas de colágeno logradas por un aumento del entrecruzamiento de sus fibrillas, podría vincularse con cambios en el tamaño de los poros en los geles (Castaneda y col., 2008; Cancan y col., 2012). Es posible entonces que en nuestros estudios el aumento en el entrecruzamiento entre las fibrillas de colágeno dificulte el crecimiento de las neuritas simpáticas mediante un impedimento esencialmente físico.

Otro efecto de los geles de colágeno más rígidos, fue que las neuritas se asociaban entre sí formando fascículos. La fasciculación (crecimiento de axones asociados) es un proceso que ocurre normalmente durante el desarrollo del sistema nervioso (Sanes y col., 2006; Learte e Hidalgo, 2007); y se ha observado que los axones forman fascículos para atravesar caminos dificultosos o químicamente inhóspitos (Snow y col., 2003; Mondal y col., 2014). En este

marco, la observación de fascículos de neuritas en los geles de colágeno rígidos podría ser una posible estrategia de las neuritas simpáticas para poder continuar su crecimiento en un territorio menos favorable.

La migración de las células no neuronales desde los explantos ganglionares también se vio reducida en los geles rígidos de colágeno. Esta reducción, sin embargo, no parece ser responsable de la disminución del crecimiento neurítico, dado que en todos los casos las neuritas crecían superando el halo de células no-neuronales. Esto indicaría que el crecimiento de los axones está directamente influenciado por el colágeno. Evidencias previas de nuestro grupo mostraron que en crio-cultivos sobre cortes de la capa miometrial longitudinal, las neuritas crecen en ausencia de células no-neuronales luego del tratamiento con Mitomicina-C (Fig. 36, Richeri y col., 2010). Además, en cultivos 2D donde se utiliza como sustrato colágeno Tipo I, se observó que la extensión de las neuritas simpáticas se da más allá del halo celular y las mismas son capaces de crecer directamente sobre el colágeno utilizado como sustrato (Argiro y Johnson, 1982). En este contexto, podemos decir que la inhibición del crecimiento neurítico observada es dada por las propiedades físicas del colágeno, en este caso su rigidez.

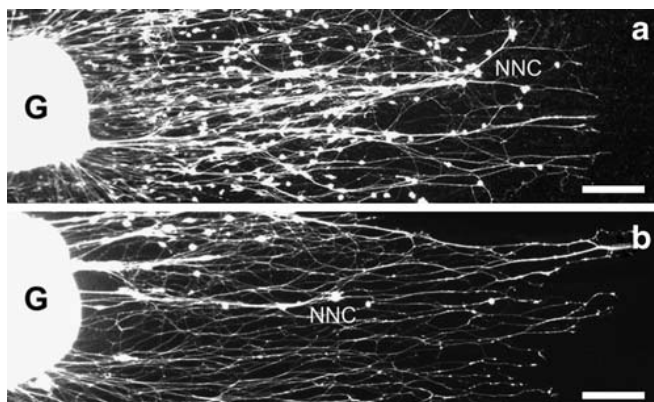


Figura 36. Imágenes tomadas de Richeri y Col., 2010. Se puede observar crio-cultivos revelados con colorante vital. **(a)** Explanto de ganglio simpático (G) creciendo sobre un corte longitudinal de miometrio uterino proveniente de rata OVX control. **(b)** crecimiento neurítico en iguales condiciones que en **(a)** pero en este caso el ganglio fue tratado con Citomicina-C. Nótese, que las neuritas en ausencia de células no-neuronales crecen subyacentes al crio-corte de tejido utilizado como sustrato. Barra de calibración = 200 μm **(a y b)**.

En conjunto, estos resultados pusieron de manifiesto la relevancia de la rigidez de las matrices de colágeno Tipo I y su impacto negativo en el crecimiento neurítico simpático. Estos datos sustentarían la posibilidad de que cambios en la rigidez del colágeno miometrial contribuyan a la inhibición del crecimiento de la inervación simpática en respuesta al estrógeno.

4. Matrices de colágeno más rígidas producen cambios morfológicos en el cono de crecimiento de neuritas simpáticas

En nuestros estudios observamos que cuando los axones crecían incluidos en geles de colágeno 3D poco rígidos, una alta proporción de los conos de crecimiento (CC) presentaron una expansión de membrana formando lamelas y largos filopodios. Estas morfologías se asocian con la capacidad que presentan los CC de “sensar” el ambiente que los rodea y escoger caminos de avance para su crecimiento (Sanes y col., 2006; Wacker y col., 2014; Tamariz y Varela-Echeverría, 2015). Sin embargo, cuando las neuritas simpáticas crecían en geles más rígidos presentaron un aumento en la proporción de conos de crecimiento colapsados; una morfología característica de los CC que enfrentan una señal negativa para su crecimiento (Roche y Col., 2009; MR Nangle y JR Keast, 2010).

Si bien es sabido que cambios en las propiedades físicas de la matriz extracelular, o de matrices artificiales utilizadas *in vitro*, provocan alteraciones en la morfología del citoesqueleto de F-Actina de los conos de crecimiento (CC, Gómez and Letourneau, 2014), los resultados presentados en nuestro trabajo constituirían las primeras evidencias de que los cambios físicos en los geles de colágeno Tipo I causan el colapso en los CC.

Una posible explicación de los efectos de la rigidez sobre los CC es que la misma esté influyendo en cascadas intracelulares de señalización, que regulan mecanismos de polimerización y despolimerización de la F-Actina. Existen evidencias de que el crecimiento neurítico y cambios en las ramificaciones terminales se ven influenciado mediante la integración de señales extra e intracelular (Ribeiro y Col., 2012). Las proteínas FAKs, están estrechamente vinculadas con cambios en las diferentes morfologías de los conos de crecimiento neuronales, así como en el control de las propiedades mecánicas de las células (Chacón y Col., 2010; Mierke T, 2013). Pensamos que podría postularse esta quinasa como una potencial candidata de regulación en los mecanismos de modulación de la polimerización y despolimerización de la F-actina por efecto de la rigidez del colágeno Tipo I.

Conclusiones

Los resultados aportados por este trabajo mostraron que la **pubertad provoca cambios** en la **orientación** de las fibrillas de **colágeno miometrial**. Este cambio ocurre en un marco **temporal y espacial** coincidente con la **inhibición** del crecimiento de los **nervios simpáticos** ocurre en el tejido que bajo la influencia del **estrógeno**.

La evaluación de la influencia de la orientación del colágeno sobre el éxito o fracaso del crecimiento neurítico simpático se vio sustentado por los estudios de crio-cultivo sobre cortes de tendón. Se reforzó así la idea de que el **relineamiento** del **colágeno** miometrial podría ser uno de los elementos que **limitan** el **crecimiento de las neuritas simpáticas** observado en los ensayos de **criocultivo** y **posiblemente** a los axones simpáticos *in situ*.

Los ensayos de cultivos tridimensionales de colágeno Tipo I, permitieron **caracterizar** por primera vez la influencia de la rigidez de las matrices de colágeno tipo I sobre el crecimiento neurítico simpático. Se pudo demostrar que el **aumento de la rigidez** de los geles de **colágeno inhibe el crecimiento de las neuritas simpáticas**. Esta observación da sustento preliminar a la posibilidad de que además de cambios en el alineamiento del colágeno fibrilar del miometrio, posibles alteraciones en la rigidez de la MEC miometrial desfavorezcan el crecimiento de los nervios simpáticos en respuesta al estrógeno.

Finalmente, se presentó evidencia novedosa de que los **cambios en la rigidez** de las matrices de **colágeno** afectan a los **conos de crecimiento** de las neuritas simpáticas, promoviendo un **aumento de morfologías de aspecto colapsado**. Esto indicaría que la rigidez de las matrices de colágeno Tipo I provoca una inhibición en el crecimiento de las neuritas simpáticas influyendo en su frente de avance.

Creemos que en su conjunto, los resultados presentados aportan datos relevantes a la comprensión de la compleja regulación multifactorial de la plasticidad de la inervación simpática del útero en respuesta al estrógeno. Por otra parte, los resultados obtenidos aportan datos que trascienden este problema específico y aportan al conocimiento del comportamiento de las neuritas simpáticas y sus conos de crecimiento frente a cambios en las propiedades elásticas de los medios en que crecen.

Perspectivas

En las últimas décadas hemos visto cambiar sustancialmente nuestra comprensión de los mecanismos que regulan los fenómenos de plasticidad de la inervación simpática del útero. Resultados de nuestro y otros grupos han puesto de manifiesto que esta plasticidad es regulada por múltiples señales, que involucran no solamente moléculas difusibles sino también moléculas estructurales.

El trabajo incluido en esta Tesis permitió identificar al colágeno como una señal de la matriz extracelular potencialmente involucrada en la remodelación de la inervación uterina inducida por el estrógeno. Los resultados obtenidos en cada uno de los objetivos dejan numerosas preguntas de interés para abordar en estudios futuros.

Por ejemplo, con el fin de avanzar en la caracterización del impacto funcional que posee la disposición en el espacio del colágeno como molécula estructural en el crecimiento de los nervios simpáticos sería interesante evaluar si la decorina, que controla la disposición de las fibrillas de colágeno en el espacio, varía su expresión en el micro-ambiente de los nervios uterinos en respuesta a modificaciones fisiológicas y/o experimentales en los niveles de estrógeno.

Sería también interesante estudiar los cambios morfológicos que presentan los conos de crecimiento en crio-cultivo. Por ejemplo, cuando enfrentan sustratos poco permisivos, tales como el miometrio estrogenizado. También cuando tienen que alterar su vía de crecimiento debido a cambios en la micro-arquitectura del sustrato, tales como las impuestas por los cortes de tendón colocados perpendicularmente o a nivel del miometrio, ante cambios en la dirección de los haces musculares.

Finalmente, sería interesante investigar posibles mecanismos que controlan los cambios del citoesqueleto de F-Actina de los conos de crecimiento en respuesta a variaciones en las propiedades físicas del colágeno. En tal sentido, proponemos desarrollar estudios en torno a la actividad de la quinasa *FAK* (del inglés, *focal adhesión kinase*); proteína que está estrechamente vinculada a cambios en las diferentes morfologías de los conos de crecimiento neuronales (Chacón y col., 2010).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberti K.A., Hopkins A.M., Tang-Schomer M., Kaplan D.L and Xu Q., (2014). The behavior of neuronal cells on tendon-derived collagen sheets as potential substrates for nerve regeneration. *Biomaterials*. 35: 3551-3557.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K and Watson J.D., (2002). *Biología Molecular de la Célula*. 3^a Edición.
- Andrin Wacker A., Gerhardt H and Phng L-K., (2014). Tissue guidance without filopodia. *Communicative & Integrative Biology* 7:1, e28820.
- 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.
- Argiro V, Johnson M.I., (1982) Patterns and kinetics of neurite extension from sympathetic neurons in culture are age dependent. *J Neurosci.* 4:503-12.
- Becker C.G., Becker T.T., (2002). Repellent guidance of regenerating optic axons by chondroitin sulphate glycosaminoglycans in Zebrafish. *J. Neurosci.* 22: 842.
- 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.* 3: 413-25.
- Bouquet C and Nothias F., (2007). Molecular Mechanisms of Axonal Growth. *Axon Growth and Guidance*, chapter 1. *Molecular Mechanisms of Axonal Growth*. pag 1-16.
- Bozkurt A., Brook G.A., Moellers S., Lassner F., Sellhaus B., Weis J., Woeltje M., Tank J., Beckmann C., Fuchs P., Damink L.O., Schügner F., Heschel I., Pallua N., (2007). In vitro assessment of axonal growth using dorsal root ganglia explants in a novel three-dimensional collagen matrix. *Tissue En.* 13:2971-9.
- Brauer M.M., Lilcoln J., Blundell D., Corbacho A., (1992). Postnatal development of noradrenaline-containing nerves of de rat uterus. *J. Anaton Nerv Syst.* 39: 37-49.
- Brauer M, 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. Devl. Neurosci.* 13:791-798.
- 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., (2008). Cellular and molecular mechanisms underlying plasticity in uterine sympathetic nerves. *Auton Neurosci.* 140: 1-16.
- Brauer M.M and Smith P.G., (2015). Estrogen and female reproductive tract innervation: Cellular and molecular mechanisms of autonomic neuroplasticity. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.* *Auton Neurosci.* 187:1-17.
- Cancan Xu., Wei Lu., Shaoquan Bian., Jie Liang., Yujiang Fan., and Xingdong Zhang., (2012). Porous Collagen Scaffold Reinforced with Surface Activated PLLA Nanoparticles. *The ScientificWorld Journal.* 10 pages doi:10.1100/2012/695137.
- Cao J., Xiao Z., Jin W., Chen W., Meng D., Ding W., Han S., Hou X., Zhu T., Yuan B., Wang J., Liang W., Dai J., (2012). Induction of rat facial nerve regeneration by functional collagen scaffolds. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.031>
- Castaneda L., Valle J., Yang N., Pluskat S., and Slowinska K., (2008). Collagen Crosslinking with Au Nanoparticles. *Biomacromolecules.* 12: 3383–3388.
- 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.
- Chacón M.R, Fernández G., Rico B., (2010). Focal adhesion kinase functions downstream of Sema3A signaling during axonal remodeling. *Molecular and Cellular Neuroscience* 44:30–42.
- Chen W-H., Cheng S-J., Tzen J.T.C., Cheng C-M., Lin Y-W., (2013). Probing Relevant Molecules in Modulating the Neurite Outgrowth of Hippocampal Neurons on Substrates of Different Stiffness. *PLoS ONE* 8(12): e83394. doi:10.1371/journal.pone.0083394.
- 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, 187-207.
- Danielson K. G., Baribault H., Holmes D. F., Graham H., Kadler K. E., and Iozzo R. V., (1997). Targeted Disruption of Decorin Leads to Abnormal Collagen Fibril Morphology and Skin Fragility. *J. Cell Biol.* 136:729–743.
- Dehghan F., Muniandy S., Yusof A and Salleh N., (2014). Sex-Steroid Regulation of Relaxin Receptor Isoforms (RXFP1 & RXFP2) Expression in the Patellar Tendon and Lateral Collateral Ligament of Female WKY Rats. *International Journal of Medical Sciences.* 2:180-191.
- Dent E.W., Gupton E.L., and Gertler F.b., (2011). The Growth Cone Cytoskeleton in Axon Outgrowth and Guidance. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3:a001800.
- 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.

- East E., de Oliveira D.B., 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*. 10:3173-84.
- Erler J.T and Weaver V.M., (2009). Three-dimensional context regulation of metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 1:35-49.
- 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 the myometrium in the early pregnancy of mice. *Int. J. Exp. Path.* 91:426–435.
- Fox M.A., Sanes J.R., Borza D.B., Eswarakumar V.P., Fässler R., Hudson B.G., John S.W., Ninomiya Y., Pedchenko V., Pfaff S.L., Rheault M.N., Sado Y., Segal Y., Werle M.J., Umemori H., (2007). Distinct target-derived signals organize formation, maturation, and maintenance of motor nerve terminals. *Cell*. 1:179-93.
- Frey M and Wang Y., (2009). A photo-modulatable material for probing cellular responses to substrate rigidity. *Soft Matter*. 5:1918–1924.
- García-Álías G., Petrosyan H.A., Schnell L., Horner P.J., Bowers W.J., Mendell L.M., Fawcett J.W., and Arvanian V.L., (2011). Chondroitinase ABC Combined with Neurotrophin NT-3 Secretion and NR2D Expression Promotes Axonal Plasticity and Functional Recovery in Rats with Lateral Hemisection of the Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience*. 31: 17788 –17799.
- Gardner R.T and Habecker B.A., (2013). Infarct-derived chondroitin sulfate proteoglycans prevent sympathetic reinnervation after cardiac ischemia-reperfusion injury. *J Neurosci*. 17:7175-7183.
- Gavazzi I., Boyle KS, Cowen T., (1996). Extracellular matrix molecules influence innervation density in rat cerebral blood vessels. *Brain Res*. 1-2:167-74.
- Georgiou. M., Bunting. S.C.J., Davies. AH.A., Loughlin. A.J., Golding. J.P., Phillips. J.B., (2013). Engineered neural tissue for peripheral nerve repair. *Biomaterials*. 34:7335-7343.
- Gomez T.M and Letourneau P.C., (2014). Actin Dynamics in growth cone motility and navigation. *JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY*. 129:221-234.
- Hansen M., Kongsgaard M., Holm L., Skovgaard D., Magnusson S.P., Qvortrup K., Larsen J., Aagaard P., Morten Dahl M., Serup A., Frystyk J., Flyvbjerg A., Langberg H., Michael Kjaer M., (2009). Effect of estrogen on tendon collagen synthesis, tendon structural characteristics, and biomechanical properties in postmenopausal women. *J Appl Physiol*. 106:1385-1393.
- Houdeau E., Rossano B., Prud'homme M.J., (2003). Regional and muscle layer variations in cholinergic nerve control of the rat myometrium during the oestrous cycle. *Auton. Neurosci*. 104:1-9.

Hopkins A.M., Wheeler B., Staii C., Kaplan D.P., and Atherton T.J., (2014). Semi-automatic quantification of neurite fasciculation in high-density neurite images by the Neurite Directional Distribution Analysis (NDDA). *J Neurosci Methods*. 228:100-109.

Huebner E.A, Strittmatter S.M., (2009). Axon regeneration in the peripheral and central nervous systems. *Probl Cell Differ*. 48:339-351.

Hwang Y-J., Granelli J., and Lyubovitsky J., (2011). Effects of Zero-Length and Non-Zero-Length Cross-Linking Reagents on the Optical Spectral Properties and Structures of Collagen Hydrogels. *Appl. Mater. Interfaces*. 4:261-267.

Kijenska E., Prabhakaran M.P., Swieszkowski W., Kurzydowski K.J., Ramakrishna S., (2012). Electrospun bio-composite P(LLA-CL)/collagen I/collagen III scaffolds for nerve tissue engineering. *Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)*. DOI: 10.1002/jbm.b.32676.

Koch D., Rosoff, W.J., Jiang, J., Geller, H.M and Urbach, J.S., 2012. Strength in the Periphery: Growth Cone Biomechanics and Substrate Rigidity Response in Peripheral and Central Nervous System Neurons. *Biophysical Journal*. 3:452-60.

Krizsan-Agbas D., Smith PG., (2002). Estrogen modulates myometrium-induced sympathetic neurite formation through actions on target and ganglion. *Neuroscience*. 114: 339.

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*. 14:3086-95.

Kuzuka M., Satake S., Miura M., Hayashi T., AND Iguchi A., (1996). Inhibition of Endothelial Cell Differentiation on a Glycosylated Reconstituted Basement Membrane Complex. *Experimental cell research*. 226:336–345.

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.

Learte A.R and Hidalgo A., (2007). The role of glial cells in axon guidance, fasciculation and targeting. *Adv Exp Med Biol*. 621:156-66.

Leppert P.C., Baginski T., Prupas C., Catherino W.H., Pletcher S., Segars J.H., (2004). Comparative ultrastructure of collagen fibrils in uterine leiomyomas and normal myometrium. *Fertil. Steril*. 82:1182-1187.

Li G.N., Livi L.L., Guord C.M., Deweerd E.S., and Hoffman-Kim D., (2007). Genomic and Morphological Change of Neoblastoma Cells in Response to Three-Dimensional Matrices. *Tissue Eng*. 5:1035-47.

- Ma F., Xiao Z., Meng D., Hou X., Zhu J., Dai J., Xu R., (2014). Use of natural neural scaffolds consisting of engineered vascular endothelial growth factor immobilized on ordered collagen fibers filled in a collagen tube for peripheral nerve regeneration in rats. *Int J Mol Sci.* 10:18593-609.
- Madduri S., Gander B., (2011). Growth factor delivery system and repair strategies for damaged peripheral nerves. *J Control Release.* 2:274-82.
- 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.
- Man A.J, Davis H.e., Itoh A., Leach J. K., and Bannerman P., (2011). Neurite Outgrowth in Fibrin Gels Is Regulated by Substrate Stiffness. *Tissue engineering.* 17:23-24.
- Man A.J., Leach J.K., Bannerman P., (2014). Redirection of neurite outgrowth by coupling chondroitin sulfate proteoglycans to polymer membranes. *Ann Biomed Eng.* 42:1271-81.
- Martínez G.F., 2012. Contribución de la reorganización del colágeno en la plasticidad de la inervación simpática del útero. Tesina de grado, Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias – UdelaR.
- 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.
- McCormick A.M and Leipzig N.D., (2012). Neural regenerative strategies incorporating biomolecular axon guidance signals. *Ann Biomed Eng.* 40:578-97.
- Mondal A.,Black B.,Kim.Y & Mohanty S., (2014).Loop formation and self-fasciculation of cortical axon using photonic guidance atlong working distance. *Scientific reports.* 4:6902.
- Mierke C.T., (2013). The role of focal adhesion kinase in the regulation of cellular mechanical properties. *Phys Biol.* 6:065005. doi: 10.1088/1478-3975/10/6/065005.
- Myers J.P and Gomez T.M., (2011). Focal adhesion kinase promotes integrin adhesion dynamics necessary for chemotropic turning of nerve growth cones. *J Neurosci.* 38:13585-95.
- Nangle M.R y Keast J.R., (2011). Semaphorin 3A inhibits growth of adult sympathetic and parasympathetic neurones via distinct cyclic nucleotide signalling pathways. *British Journal of Pharmacology* 162:1083-1095.
- Pelham R and Wang Y., (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:13661-13665.
- Pettigrew D.B and Crutcher K.A., (2001). Myelin contributes to the parallel orientation of axonal growth on white matter in vitro. *BMC Neurosci.* 2:9.

- Pettigrew D.B., Crutcher K.A., (1999). White matter of the CNS supports or inhibits neurite outgrowth in vitro depending on geometry. *J Neurosci.* 19:8358-66.
- Peyton S.R., Ghajar C.M., Khatiwala C.B., Putnam A.J., (2007). The emergence of ECM mechanics and cytoskeletal tension as important regulators of cell function. *Cell Biochem Biophys.* 2:300-20.
- Phillips J.B., Bunting S.C.J., Hall S.M., and Brown R.A.,(2005). Neural Tissue Engineering: A Self-Organizing Collagen Guidance Conduit. *Tissue Engineering.* 11:9-10.
- 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.
- Ribeiro A., Vargo S., Powell S.E., and Leach J.B.,(2012). Substrate Three-Dimensionality Induces Elemental Morphological Transformation of Sensory Neurons on a Physiologic Timescale. 18:93-102.
- Richard-Blum Sylvie., (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3:a004978.
- Richeri A., Bianchimano P., Mármol N.M., Viettro L., Cowen T and Brauer M., (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 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., 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., 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.
- Roche F.K., Marsick B.M., and Letourneau P.C., (2009). Protein synthesis in distal axons is not required for growth cone responses to guidance cues. *J Neurosci.*3:638-652.

- Rodriguez-Teja M., Gronau J.H., Breit C., Zhang Y.Z., Minamidate A., Caley M.P., McCarthy A., Cox T.R., Erler J.T., Gaughan L., Darby S., Robson C., Mauri F., Waxman J., Sturge J., (2015). AGE-modified basement membrane cooperates with Endo180 to promote epithelial cell invasiveness and decrease prostate cancer survival. *J Pathol.* 4: 581-92.
- Sanches JC, Jones CJ, Aplin JD, Iozzo RV, Zorn TM, Oliveira SF., (2010) Collagen fibril organization in the pregnant endometrium of decorin-deficient mice. *J Anat.* 216:144-155.
- San Martin S., Zorn T.M., (2003). The small proteoglycan biglycan is associated with thick collagen fibrils in the mouse decidua. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 4:673-8.
- Sanes D., Reh T., Harris W., (2006). Axon Growth and Guidance. Development of the nervous system (second edition). Chapter 5 Pag. 111-144.
- Scott J., Orford C.R and Hughes E.W., (1981). Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tail tendon. *Biochem. J.* 3:573-81.
- Selfridg J., Krizsan-Agbas D., Smith P.G., (2010). p75NTR is necessary for estrogen-induced remodeling of sympathetic nerves in the uterus. *Soc. Neurosci.*
- Shields Lisa B. E., Zhang Y., Darlene A. B, MA, Graya R and Shields C.B., (2008). Benefit of Chondroitinase ABC on Sensory Axon Regeneration in a Laceration Model of Spinal Cord Injury in the Rat. *Surg Neurol.* 69: 568–577.
- 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.
- Siqueira M. B., Mostacada K and Blanco Martínez A.M., (2015). Neurotrauma and Inflammation> CNS and PNS Response. Hindawi Publishing Corporation. 14.
- Skornia S.L and Willits R.K., (2004). Effect of collagen gel stiffness on neurite extension. *J Biomater Sci Polym Ed.* 15:1521-31.
- Snow D.M., Smith J.D., Cunningham A.T., McFarlin J., Goshorn E.C., (2003). Neurite elongation on chondroitin sulfate proteoglycans is characterized by axonal fasciculation. *Exp Neurol.* 2:310-21.
- Stang F., Fansa H., Wolf G., Keilhoff G., (2005). Collagen nerve conduits--assessment of biocompatibility and axonal regeneration. *Biomed Mater Eng.* 1-2:3-12.
- Sundararaghavan H.S., Monteiro G.A., Firestein B.L., Shreiber D.I., (2008). Neurite Growth in 3D Collagen Gels With Gradients of Mechanical Properties. *Biotechnology and Bioengineering.* 102:632-643.
- Sylvie Ricard-Blum., (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3:a004978.
- Tamariz E and Varela-Echeverría A., (2015). The discovery of the growth cone and its influence on the study of axon guidance. doi: 10.3389/fnana.2015.00051.

- Timmons B., Akins M., Mahendroo M., (2010). Cervical remodeling during pregnancy and parturition. *Trends Endocrinol. Metab.* 21: 353–361.
- 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.
- Vitriol E.A and Zheng J.Q., (2012). Growth Cone Travel in Space and Time: the Cellular Ensemble of Cytoskeleton, Adhesion, and Membrane. *Trends in Neurosciences.* 6:1068-81.
- Wacker A., Gerhardt H., Phng L.K., (2014). Tissue guidance without filopodia. *Commun Integr Biol.* 9:7-e28820.
- Wu W.E., Zhang Q.I., Unno N., Derks J.B., Nathanielsz P.W.,(2000). Characterization of decorin mRNA in pregnant intrauterine tissues of the ewe and regulation by steroids. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278: C199-C206.
- Yao L., Billiar K.L., Windebank A.J., Pandit A., (2010). Multichanneled Collagen Conduits for Peripheral Nerve Regeneration: Design, Fabrication, and Characterization. *Tissue Engineering.* 16:1585-1595.
- Yu W., Barteau M.A., Chen J.G., (2011). Glycolaldehyde as a probe molecule for biomass derivatives: reaction of C-OH and C=O functional groups on monolayer Ni surfaces. *J Am Chem Soc.* 50:20528-35.
- Zaminy A., Shokrgozar M.A., Sadeghi Y., Norouzi M., Heidari M.H., Piryaei A., (2013). Transplantation of schwann cells differentiated from adipose stem cells improves functional recovery in rat spinal cord injury. *Arch Iran Med.* 9:533-41.
- Zeng W., Rong M., Hu. x., Xia W., Qi F., Huang J., Luo Z.,(2014). Incorporation of Chitosan Microspheres into Collagen-Chitosan Scaffolds for the Controlled Release of Nerve Growth Factor. *PLoS ONE* 9(7): e101300. doi:10.1371/journal.pone.0101300.
- Zoubina E.V, 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 E.V, Mize A.L, Alper R.H, Smith P.G., (2001). Acute and chronic oestrogen supplementation decreases uterine sympathetic innervation in ovariectomised adult virgin rats. *Histol Histopathol.* 16:989-996.
- 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., Fan Q., Smith P., (1998). Variation in uterine innervation during the estrous cycle. *J Comp. Neurol.* 397:561-571.