



# Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Posgrado en Ciencias Biológicas

Expresión del factor de crecimiento neuronal  
derivado de células gliales y su receptor  $GFR\alpha-1$   
en la pared dorsolateral de la vagina pélvica de  
conejas vírgenes y primíparas

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Verónica García Villamar

Director de tesis  
Dr. Francisco Castelán

Tlaxcala, Tlax.

Agosto, 2013





# Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Posgrado en Ciencias Biológicas

Expresión del factor de crecimiento neuronal  
derivado de células gliales y su receptor  $GFR\alpha-1$   
en la pared dorsolateral de la vagina pélvica de  
conejos vírgenes y primíparas

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Verónica García Villamar

### **Comité Tutorial**

Dr. Francisco Castelán

Dra. Margarita Martínez Gómez

Dr. Arturo Ortega Soto

Dra. Rossana C. Zepeda Hernández

Dr. Jorge Rodríguez Antolín

Tlaxcala, Tlax.

Agosto, 2013





Universidad Autónoma de Tlaxcala  
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Verónica García Villamar** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Expresión del factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales y su receptor GFR $\alpha$ -1 en la pared dorsolateral de la vagina pélvica de conejas vírgenes y primíparas”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., JULIO 12 DE 2013

  
DR. FRANCISCO CASTELÁN

  
DRA. MARGARITA MARTÍNEZ GÓMEZ

  
DR. ARTURO ORTEGA SOTO

  
DRA. ROSSANA C. LEPEDA HERNÁNDEZ

  
DR. JORGE RODRÍGUEZ ANTOLÍN



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:  
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel-Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: [posgradoctbcuat@gmail.com](mailto:posgradoctbcuat@gmail.com)  
Tlaxcala, Tlax.



Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Francisco Castelán y la asesoría de Dra. Margarita Martínez Gómez, Dr. Arturo Ortega Soto, Dra. Rossana C. Zepeda Hernández y Dr. Jorge Rodríguez Antolín. La asistencia técnica brindada por la Q.F.B. Laura García Rivera fue fundamental para la realización de este proyecto.

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Biología Celular del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la UATx, Unidad Periférica Tlaxcala del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Para su desarrollo se contó con el financiamiento de PROMEP-SEP (UATLX-PTC-109 a FC), PAPIIT-UNAM (228110 a MMG), CONACyT (105882 a MMG), beca CONACyT a VGV (261601) y Universidad Autónoma de Tlaxcala (CACyPI-UATx-2013).



Universidad Autónoma de Tlaxcala  
Reforma Curricular 2012



Universidad de la Autorrealización



## **Agradecimientos**

A la Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx), por abrirme sus puertas, por confiar en mí y haberme permitido formar parte de este grupo.

A los miembros del comité revisor, Dra. Margarita Martínez Gómez, Dr. Arturo Ortega Soto, Dra. Rossana C. Zepeda Hernández, Dr. Jorge Rodríguez Antolín y Dr. Francisco Castelán por su colaboración y disposición para aclarar mis dudas así como para ayudarme a lograr esta meta.

## ***Agradecimientos a título personal***

### *A mis padres*

Guillermina y Gaspar pilares fundamentales en mi vida. Sin ellos, jamás hubiese podido conseguir lo que hasta ahora. Su tenacidad y lucha incansable han hecho de ellos el gran ejemplo a seguir. Que me acompañaron en esta aventura que significó la maestría y que de forma incondicional estuvieron siempre conmigo brindándome todo lo que ellos podían, entendiendo mis ausencias y mis malos momentos. Por decirme estudia y aquí estoy estudiando no para saber más ni ser mejor que otros sino para superarme a mí misma. Gracias mil gracias por todo los amo.

### *A mis hermanos*

María de Jesús, José Luis, Karen, Alejandro, Guadalupe y Daniela por estar siempre que los he necesitado sin importar las circunstancias, por todo lo que hemos compartido juntos así como por sus lecciones de vida y palabras de aliento cuando sentía que ya no podía más, porque juntos aprendimos a vivir, crecimos como cómplices día a día y somos amigos incondicionales de toda la vida, los que nunca dudaron que lograría este triunfo, los quiero mucho aunque no lo parezca, son la mejor compañía con la que pude compartir el mismo hogar.

### *A mis amigos*

Rhode, Dianis, Vero, Nenna, Paco, Margie, Nicté, Iván, Luigui, Mine, Esme, Julie, Tavo, George, Cesar, y a ti Juas que siempre estuvieron ahí junto a mí para ayudarme, escucharme, aconsejarme y en muchas ocasiones guiarme, por su apoyo y cariño que me han brindado, por tener siempre tendida su mano amiga desde el día en que nos conocimos, pero sobre todo por brindarme su amistad incondicional, por ser la sal que condimenta mi vida, Gracias por aceptarme y soportar como soy ☺.

*A mi director de tesis*

Sé que no le va agradar pero debo agradecer de manera especial y sincera al Dr. Francisco Castelán por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Por su apoyo y confianza en mi trabajo, por su ejemplo de trabajo y dedicación, porque él ha sido parte importante de este trabajo y de mi formación personal mil gracias Paco.

*A mis compañeros de laboratorio*

Tavo, Ángeles, Laura y Kenia por hacer que el trabajo fuera más ameno y placentero, por su constante ayuda en las tareas cotidianas y en cada problema experimental, por poder hacer del trabajo de todos los días un espacio para compartir alegrías, tristezas, problemas, proyectos y porque durante este tiempo juntos aprendimos que nuestras diferencias se convierten en riqueza cuando existe respeto.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han compartido conmigo algún momento en la vida, que han participado en la realización de ésta tesis, a todas y cada una de ellas muchas gracias, ya que cada una aportó un granito de arena para la culminación de este proyecto. Sé que no necesito nombrarlas porque tanto ellas como yo sabemos quiénes son y que desde lo más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo su apoyo y amistad.

*“Considero más valiente al que conquista sus deseos que al que conquista a sus enemigos, ya que la victoria más dura es la victoria sobre uno mismo”.*

*Aristóteles*

## Resumen

El sistema nervioso está constituido por dos tipos de células: las neuronas, que se encargan de transmitir los impulsos nerviosos y las células gliales. Las células gliales son consideradas células de sostén del tejido nervioso, participan durante el desarrollo de este siendo el sustrato físico para la migración neuronal. Tienen una función trófica y metabólica activa, permitiendo la comunicación e integración de las redes neurales. La comunicación entre las neuronas y células gliales es esencial para la conducción axonal, la transmisión sináptica, y procesamiento de la información para el buen funcionamiento del sistema nervioso durante el desarrollo y la vida adulta. La comunicación básica entre las neuronas es conocida como sinapsis sin embargo los factores neurotróficos constituyen otro medio de comunicación entre estas. Dichos factores intervienen en el desarrollo de las células del sistema nervioso y actúan como mensajeros químicos de acción local. Los factores neurotróficos son proteínas que modulan el crecimiento, diferenciación, reparación y supervivencia neuronal. Uno de ellos es el factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales (GDNF), el cual participa en el desarrollo, mantenimiento y plasticidad de neuronas simpáticas y parasimpáticas del plexo pélvico. Estos efectos ocurren a través de su interacción con receptores específicos ( $GFR\alpha 1$ ). Los ganglios pélvicos proporcionan la mayor parte de la inervación autonómica a los órganos urogenitales y a diferencia de otros ganglios autónomos, estos se componen de una mezcla de neuronas pos-ganglionares simpáticas y parasimpáticas. En la coneja, hemos encontrado que la experiencia reproductiva remodela la inervación paravaginal de la pared dorsolateral de la vagina pélvica, pertenecientes al plexo pélvico. Esta remodelación podría involucrar la señalización de factores neurotróficos. Por lo que la señalización de factores neurotróficos es relevante para la recuperación de lesiones que afecten la inervación simpática y parasimpática. En este contexto no hay información sobre la asociación de factores neurotróficos con la remodelación de ganglios pélvicos en hembras de mamíferos. Por lo cual el objetivo de este trabajo fue determinar la expresión del factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales y de su receptor  $GFR\alpha 1$  en la pared dorsolateral de la vagina pélvica de conejas vírgenes y primíparas. Para ello utilizamos 12 conejas de 6 meses de edad divididas en dos grupos: conejas control y primíparas 3 días posparto. Realizamos inmunohistoquímicas (IHC) e inmunodetección en fase sólida (WB) ambas para anti-

GDNF y anti-GFR $\alpha$ . Obtuvimos los siguientes resultados: las neuronas de los ganglios paravaginales expresan marcaje anti-GDNF y anti-GFR $\alpha$ -1. En las IHC, el marcaje en ambos casos se observa en el citoplasma de las neuronas siendo más intenso para el receptor GFR $\alpha$ -1. Es más intenso en las conejas primíparas (P3) con respecto al grupo control (C). Esto se observa para GDNF y GFR $\alpha$ -1. Referente a la cuantificación por western blot (WB) no existen diferencias entre los grupos para ninguna de las proteínas. En conclusión, el parto no modifica la expresión de GDNF y de su receptor GFR $\alpha$ -1 en la pared dorsolateral de la vagina pélvica de la coneja.

# Índice

1.	Introducción.....	1
2.	Antecedentes.....	3
2.1.	Fisiología reproductiva.....	3
2.2.	Inervación del aparato urogenital.....	4
2.3.	Factores neurotróficos.....	5
2.3.1.	Familia de factores de crecimiento neuronal derivados de células gliales.....	6
2.3.2.	Co-receptores GFR $\alpha$ -RET de la familia de GFLs.....	7
2.3.3.	El factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales.....	9
2.3.4.	Implicaciones del complejo ligando-co-receptores: GDNF-GFR $\alpha$ -RET.....	10
2.4.	Factores de crecimiento neuronal y los ganglios pélvicos.....	11
3.	Justificación.....	12
4.	Hipótesis.....	13
5.	Objetivos.....	14
5.1.	General.....	14
5.2.	Particulares.....	14
6.	Metodología.....	15
6.1.	Diseño experimental.....	15
6.2.	Materiales y métodos.....	15
6.2.1.	Animales.....	15
6.3.	Obtención de fragmentos dorsolaterales de la vagina pélvica.....	16
6.4.	Procesamiento de los fragmentos dorsolaterales de la vagina pélvica.....	16
6.4.1.	Expresión del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y su receptor GFR $\alpha$ -1 en la pared dorsolateral de la vagina pélvica.....	16
6.4.1.1.	Inmunodetección en fase sólida (Western blot).....	16
6.4.2.	Identificación de células que expresan al GDNF y su receptor GFR $\alpha$ -1.....	17
6.4.2.1.	Inmunohistoquímica.....	17
6.5.	Análisis estadístico.....	18
7.	Resultados.....	19
7.1.	Expresión del factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales (GDNF).....	19
7.1.1.	Inmunodetección en fase solida (WB) para el anti-GDNF.....	19
7.1.2.	Marcaje inmunohistoquímico anti-GDNF.....	21
7.2.	Expresión del receptor GFR $\alpha$ -1.....	22
7.2.1.	Inmunodetección en fase solida (WB) para anti-GFR $\alpha$ -1.....	22
7.2.2.	Marcaje inmunohistoquímico anti-GFR $\alpha$ -1.....	24
7.3.	Número de células gliales satélite en los ganglios paravaginales.....	25
8.	Discusión.....	26
8.1.	Aplicaciones del modelo de estudio.....	29
9.	Conclusiones.....	30
10.	Perspectivas.....	31
11.	Referencias bibliográficas.....	32

12.	Abreviaturas.....	40
13.	Anexos.....	41
13.1.	Anexo 1. Tinción tricrómica de Masson.....	41
13.2.	Anexo 3. Inmunohistoquímica anti- factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales (GDNF) y anti-receptor alfa de la familia de receptores de los GFLs ( $GFR\alpha-1$ ) en cortes transversales de la región pélvica de la vagina.....	42
14.	Publicaciones.....	44





## **1. Introducción**

La reproducción es un proceso biológico que permite la creación de nuevos organismos, una característica común de todas las formas de vida conocidas. La reproducción de las hembras de mamíferos incluye diversos procesos fisiológicos y conductuales. Entre ellos se encuentran la receptividad, la cópula, la gestación, el parto y la lactancia. Estos procesos tienen como sustrato anatómico el aparato urogenital inferior. La respuesta fisiológica del aparato urogenital femenino es regulada por fluctuaciones hormonales y el sistema nervioso.

El sistema nervioso para su estudio se divide en somático y autonómico y está constituido por dos tipos de células: las neuronas, que se encargan de transmitir los impulsos, y las células gliales las cuales se encargan de mantener la homeostasis nerviosa (García y Massieu 2004). Las células gliales brindan sostén al tejido nervioso, pero existe una dependencia funcional muy importante entre ellas y las neuronas. La glía cumple un papel fundamental durante el desarrollo del sistema nervioso, debido a que es el sustrato físico para la migración neuronal. Las células gliales también tienen función trófica y metabólica activa, permitiendo la comunicación e integración de las redes neurales.

La comunicación básica entre las neuronas es conocida como sinapsis, sin embargo, los factores neurotróficos constituyen otro medio de comunicación entre estas. Dichos factores intervienen en el desarrollo de las células del sistema nervioso y actúan como mensajeros químicos de acción local. Todas las células de los tejidos que reciben inervación y todas las células del sistema nervioso producen estos factores neurotróficos (Bustamante 2007).

De acuerdo con su localización el sistema nervioso se divide en central y periférico, siendo este último el encargado de inervar el aparato urogenital por medio del plexo pélvico. Los ganglios pélvicos proporcionan la mayor parte de la inervación autonómica a los órganos urogenitales y parte de la inervación extrínseca del intestino grueso. A diferencia de otros ganglios autónomos, los ganglios pélvicos se componen de una mezcla de neuronas postganglionares simpáticas y parasimpáticas.

Eventos reproductivos como la cópula, la gestación y el parto de las hembras de mamíferos podrían modificar la inervación autonómica vaginal, y con ello alterar su función. En este sentido la señalización de factores neurotróficos es relevante para la recuperación de

lesiones que puedan afectar la inervación simpática y parasimpática. Existe escasa información sobre la asociación de factores neurotróficos con la remodelación de ganglios pélvicos en hembras de mamíferos.

## **2. Antecedentes**

### **2.1. Fisiología reproductiva**

En hembras de mamíferos la fisiología reproductiva requiere de la participación coordinada del aparato urogenital, la musculatura estriada pélvica y perineal, así como del plexo pélvico. El aparato urogenital femenino está conformado por dos grupos de órganos, los genitales y los urinarios. Los genitales participan en funciones reproductivas como la cópula y el parto. Los urinarios elaboran, almacenan y eliminan la orina. En la mujer y la rata, los conductos genital y urinario están separados a diferencia de la mayoría de las hembras de mamíferos (perra, gata, cerda, hiena y coneja), en las que un conducto cumple con funciones de uretra y vagina (Wake 1992).

Las hormonas esteroides son fundamentales para la modulación de funciones reproductivas como la receptividad. La vagina es el principal órgano involucrado en la respuesta sexual femenina. Debido a que durante y previo a la cópula existe una serie de cambios como el aumento del flujo sanguíneo genital, sensación genital y lubricación vaginal llevando como consecuencia la preparación de la hembra para copular (Giraldi y col. 2002).

En la coneja, la vagina es un órgano tubular localizado en el área pélvica, sostenida anatómicamente por músculos estriados pélvicos y perineales, así como por ligamentos suspensorios. Considerando su posición en la pelvis, el conducto vaginal de la coneja adulta puede dividirse en tres regiones denominadas abdominal, pélvica y perineal (Martínez-Gómez y col. 1997). La región abdominal es la más extensa y se ubica cerca a la vejiga y al cérvix. La región pélvica está situada dentro de la cavidad pélvica, en ésta región es en la que desemboca la uretra, está rodeada por un prominente plexo venoso y por las glándulas de marcaje vestibulares. La región perineal protruye caudalmente de la cavidad pélvica (Martínez-Gómez y col. 1997, Cruz y col. 2002).

El conducto vaginal histológicamente está compuesto por cuatro capas distintivas de cualquier órgano tubular, la mucosa, la submucosa, la muscular y la externa (Alexander y col. 2004, Rodríguez-Antolín y col. 2009). Este arreglo histológico varía entre cada una de las regiones del conducto vaginal (Oh y col. 2003; Rodríguez-Antolín y col. 2009), y además se ve afectado por los niveles de hormonas gonadales circulantes (Pessina y col. 2006; Ramírez-

Corona 2011) y por condiciones fisiológicas como la cópula (Barberini y col. 1992), el parto y la edad (Rodríguez-Antolín 2007).

## **2.2. Inervación del aparato urogenital**

La respuesta fisiológica del aparato urogenital femenino es regulada por el sistema nervioso. Los órganos reproductivos son inervados por el plexo pélvico, el cual está formado por una red de ramas de diferentes nervios entre los que se encuentran, el nervio pélvico (parasimpático), el nervio hipogástrico (simpático) y el nervio pudendo (somático; de Groat 2006). La estructura anatómica del plexo pélvico puede variar dependiendo de la especie. En la mujer, la coneja y la perra, el plexo forma una red de ramas nerviosas con un gran número de ganglios incorporados en ella (Langley y Anderson 1896, Li y Masuko 2001; Imai y col. 2006). A diferencia de lo que ocurre en el cobayo y la rata donde existe un ganglio de mayor tamaño denominado ganglio pélvico principal (Hondeau y col. 1995).

Los ganglios pélvicos son ganglios mixtos que contienen neuronas simpáticas y parasimpáticas. (Wanigasekara y col. 2005). Estos ganglios proveen la mayoría de las conexiones nerviosas autonómicas a la vejiga, intestino grueso y órganos reproductores (Keast 2006). La inervación vaginal autonómica se completa con la de los ganglios adosados a la pared vaginal como los paracervicales (Hondeau y cols. 1995) y los paravaginales (Owman y Sjöberg 1966). Por lo que alteraciones en la inervación de este conducto podrían generar trastornos en la fisiología reproductiva y la micción femenina (Shüssler y col. 1994).

En nuestro grupo de investigación hemos descrito nervios y ganglios en el tejido paravaginal dorsolateral de la coneja (Castelán y col. 2013). Los ganglios paravaginales están envueltos en una densa cápsula de tejido conectivo. Frecuentemente se observan con formas circulares y ovales, aunque en ocasiones tienen una forma de bastón. La mayoría de las neuronas ganglionares son de distintos tamaños, y tienen forma poligonal u ovoide. Sus prolongaciones citoplásmicas son escasas. Los núcleos de las células de la glía satelital ganglionar se observan alrededor de los somas neuronales y en el espacio entre ellos. La inmunoreactividad anti- $\beta$ -tubulina III evidencia axones transversales y longitudinales. Los ganglios paravaginales contienen neuronas noradrenérgicas (tirosina hidroxilasa positivas) y

colinérgicas (acetilcolina transferasa positivas), siendo estas últimas las que predominan (Castelán y col. 2013).

La experiencia reproductiva induce cambios en los ganglios paravaginales, particularmente en aquellos localizados alrededor de la desembocadura uretral en la vagina pélvica. La multiparidad (cuatro partos consecutivos) promueve un desarreglo en la matriz extracelular y contenido de colágeno de los ganglios paravaginales. El área de las neuronas ganglionares es mayor que la de las neuronas de los ganglios en conejas vírgenes, y lo mismo se observó para los nervios localizados en el mismo campo que los ganglios. De manera interesante, 30% menos neuronas ganglionares fueron cuantificadas en los ganglios de las conejas múltiparas de la misma edad (Castelán y col. 2013, Xelhuantzi-Arreguin 2012).

La gestación y el parto afectan la morfología de las neuronas ganglionares. Se ha reportado que el área neuronal así como el área ganglionar es menor, además de que no existen diferencias en el número de ganglios, neuronas por ganglio y nervios en conejas gestantes a término y primíparas 3 días posparto comparadas con conejas vírgenes de la misma edad (Castelán y col. 2013, Hernández-Aragón 2012).

### **2.3. Factores neurotróficos**

Los factores neurotróficos son proteínas que modulan el crecimiento, diferenciación, reparación, maduración y supervivencia de neuronas inmaduras así como la supervivencia, protección y mantenimiento de poblaciones neuronales en adultos, algunos tienen otras funciones, en la neurotransmisión y en la reorganización sináptica en el aprendizaje y la memoria (Sullivan y Toulouse 2011). Durante el desarrollo, los factores neurotróficos participan en la sobrevivencia, localización y proyección de las neuronas pélvicas y en la etapa adulta se asocian con procesos de plasticidad (Keast 2006). Estos factores han sido implicados en la etiología de algunas enfermedades neurodegenerativas, y algunos de ellos han sido propuestos como agentes terapéuticos para estas enfermedades, basándose en estudios *in vitro* y en modelos animales (Vega y Moris de la Tassa 2003).

### **2.3.1. Familia de factores de crecimiento neuronal derivados de células gliales**

Desde el descubrimiento del factor de crecimiento nervioso (NGF) y el establecimiento de su capacidad para apoyar la supervivencia neuronal, se han hecho infinidad de estudios para identificar los factores neurotróficos adicionales que pueden tener influencia en neuronas en cultivo primario ya sea durante el desarrollo normal o en modelos experimentales de lesión neuronal. Esto ha dado como resultado la identificación de un gran y diverso grupo de proteínas que son capaces de promover la supervivencia neuronal en diversos casos experimentales (Baloh y col. 2000).

Algunos de estos factores son los pertenecientes a la familia de ligandos del factores de crecimiento neuronal derivado de células gliales (GDNF). En este grupo podemos encontrar al GDNF, neurturina (NRTN), artemina (ARTN) y persepina (PSPN). Estos 4 factores forman la familia de ligandos del GDNF (GFLs). Estos participan en el desarrollo y función del sistema nervioso (Airaksinen y col. 1999 y 2002).

Estudios realizados en un modelo de lesión unilateral del nervio cavernoso sugiere que las neuronas posganglionares del lado intacto prolongan sus axones hasta el extremo dañado promoviendo la regeneración del nervio favoreciendo así la recuperación de la función eréctil, este cambio en la plasticidad se debe a la acción de los factores neurotróficos (Cacalano y col 1998). En pacientes menores de 60 años con prostatectomía radical la recuperación de la función eréctil puede ser de hasta un 76% y en pacientes mayores de 65 años la recuperación solo es del 47% este mecanismo de plasticidad neuronal se modifica debido a la edad pero se sugiere que neurturina participa en el re-establecimiento de dicho mecanismo. (Airaksinen y col. 1999, Hisasue y col. 2006, Jing y col. 1997).

Factores como la NRTN y ARTN son importantes para algunos tipos de neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas así como para subpoblaciones de neuronas periféricas autonómicas y sensoriales (Buj-Bello y col. 1995; Trupp y col. 1995).

La reciente incorporación de PSPN y ARTN a los ligandos de la familia del GDNF, junto con la confirmación de estudios con genes knockout sobre la importancia de GDNF y NRTN en el neurodesarrollo, ha establecido las GFLs como una segunda familia de factores neurotróficos. Los resultados de estos análisis revelan numerosas similitudes y solapamientos

potenciales con la familia de las neurotrofinas ya que al igual que esta familia regulan el desarrollo del sistema nervioso periférico (Baloh y col. 2000).

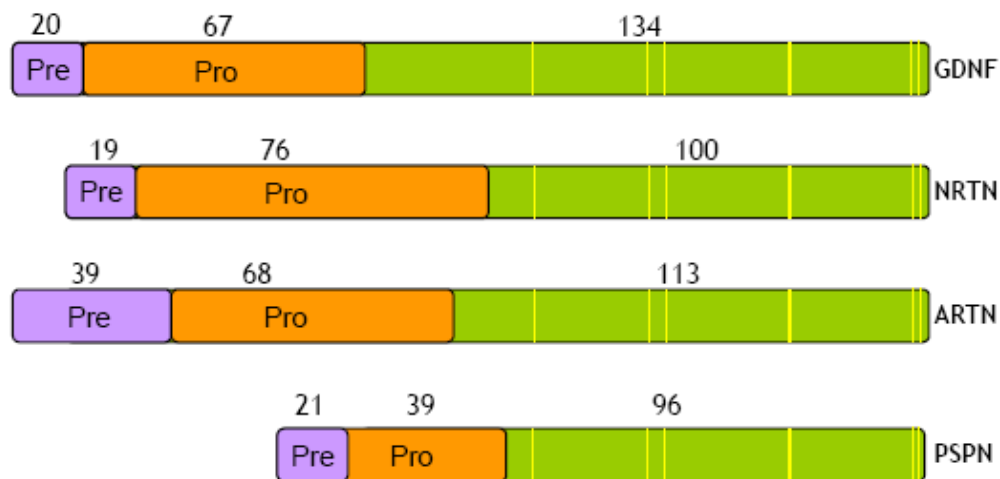


Figura 1. Estructura esquemática de los GFLs. La forma madura está representada en color verde, la secuencia que corresponde a la forma pro está en naranja y la forma precursora en violeta. En amarillo están las cisteínas conservadas. Factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales (GDNF), neurturina (NRTN), artemina (ARTN) y persepina (PSPN; Airaksinen y col. 1999).

### 2.3.2. Co-receptores GFR $\alpha$ -RET de la familia de GFLs

Recientemente se ha descrito que la señalización de los GFLs es a través de un complejo receptor multicomponente (Figura 2, Paratcha y Ledda 2008). Dicho complejo está formado por dos unidades co-receptoras; el receptor alfa de la familia de receptores de los GFLs (GFR $\alpha$ , 1-4) el cual está unido a la superficie celular a través de un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) y el co-receptor transmembrana de tirosina cinasa de RET (Durbec y col. 1996, Jing y col. 1996, Treanor y col. 1996, Trupp y col. 1996).

Se conocen 4 isoformas de la subunidad GFR $\alpha$ -1 del receptor, que va del GFR $\alpha$ -1 al GFR $\alpha$ -4 manteniendo su especificidad para el ligando y el complejo GFR $\alpha$ -RET, GDNF se une a GFR $\alpha$ -1 posteriormente se une con RET y se forma un complejo, neurturina se une a GFR $\alpha$ -2, persepina se une a GFR $\alpha$ -3 y artemina se une con GFR $\alpha$ -4 (Takahashi 2001). Los



GFR $\alpha$  por lo general están anclados a la membrana, pero por medio de la acción de alguna proteasa o fosfolipasa se pueden obtener formar libres de este co-receptor.

RET es una proteína transmembrana la cual está compuesta por cuatro cadherinas (dominio extracelular) y un dominio intracelular de tirosina quinasa. Se sugiere que un dímero de GDNF se pega al GFR $\alpha$ -1, formando un complejo GDNF-GFR $\alpha$ 1, este complejo se une a RET induciendo su homodimerización y autofosforilación en la tirosina (Airaksinen y Saarma 2002). RET por sí solo no puede activar a los GFLs, se requiere de GFR $\alpha$  y RET para formar un receptor GFL funcional (Baloh y col. 2000, Airaksinen y col. 1999 y 2002).

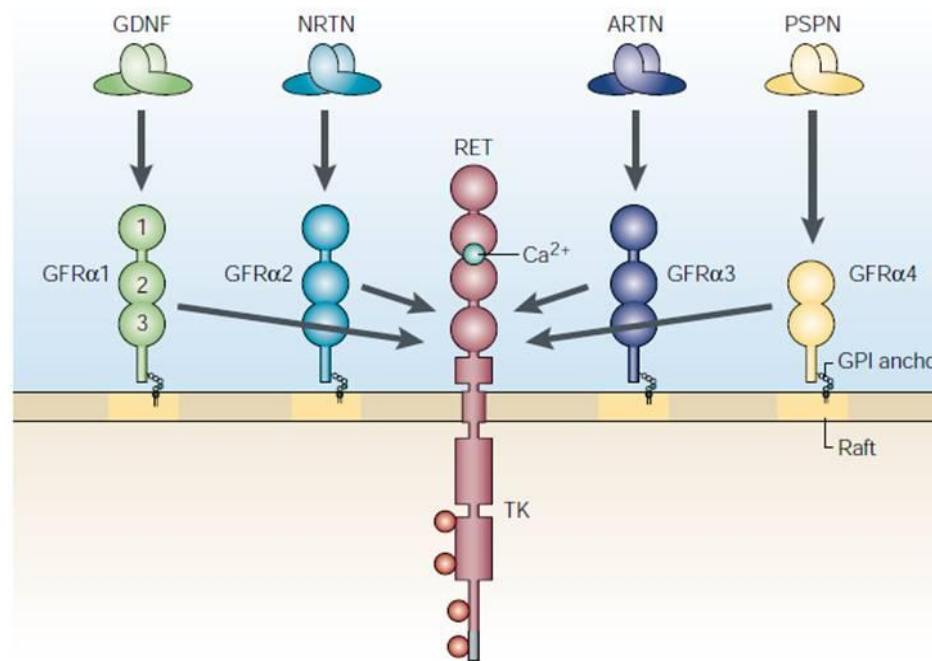


Figura 2. Familia de ligandos del factor de crecimiento derivado de células gliales (GDNF). Actúan mediante 2 co-receptores: tirosina cinasa del receptor RET y glucosilfosfatidilinositol anclada al co-receptor GFR $\alpha$  1–4 (Airaksinen y Saarma 2002).

### **2.3.3. El factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales**

El factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales (GDNF) se purificó de un glioma de rata, se caracterizó como un factor de crecimiento de apoyo en la supervivencia de neuronas dopaminérgicas del cerebro medio ventral (Lin y col. 1993). Más tarde, se encontró que tiene efecto sobre la supervivencia de neuronas motoras y otras sub-poblaciones de neuronas del sistema nervioso central y periférico (Henderson y col. 1994, Airaksinen y col. 1999 y 2002). Además de su papel como factor de supervivencia, el GDNF es esencial para la proliferación, migración y diferenciación de diversas poblaciones neuronales. El GDNF se expresa también en órganos periféricos, como el estómago y la piel (Jing y col 1996). Por otro lado este factor tiene un papel importante fuera del sistema nervioso actuando como morfógeno en el desarrollo renal y regulando la diferenciación de las espermatogonias. Esta amplia distribución del GDNF fuera del sistema nervioso sugiere un papel funcional en los tejidos no neuronales (Paratcha y Ledda 2008).

En ratones con deleciones dirigidas al gen de GDNF se encontraron defectos en los tejidos derivados de células de la cresta neural, mencionando que los daños más graves fueron la ausencia de riñones y la pérdida completa de neuronas entéricas en el tracto digestivo (Schuchardt y col. 1994). Otros estudios demuestran que el GDNF promueve la supervivencia *in vitro* de una subpoblación de neuronas nociceptivas, en especial las que unen a la isolectina-B4 (IB4), la unión de IB4 es relevante para diferenciar una subpoblación de neuronas nociceptivas sensoriales, diferente a las que responden al factor de crecimiento nervioso (NGF; Quartu y col. 2006). Estudios posteriores han demostrado que el GDNF induce síntesis de dopamina y la enzima tirosina hidroxilasa (TH), en cultivos corticales de fetos de rata y humano (Shults y col. 1996). Además, de manera consistente ha mostrado promover la supervivencia y diferenciación de neuronas dopaminérgicas así como la protección de estas células a toxinas como la 6 -hidroxidopamina (6-OHDA; Theofilopoulos y col. 2001). Por otro lado se ha reportado que al realizar tratamientos con GDNF se reduce el índice de apoptosis de neuronas dopaminérgicas en cultivos de cerebro medio de embriones de rata y humano (Sullivan y Toulouse 2011).

#### **2.3.4. Implicaciones del complejo ligando-co-receptores: GDNF-GFR $\alpha$ -RET**

Se ha descrito que GDNF se une a GFR $\alpha$ -1 posteriormente se une con RET y se forma un complejo (Takahashi 2001). En ratones que carecen de GDNF y GFR $\alpha$ -1 falla el desarrollo de neuronas entéricas, de riñones y mueren durante el periodo perinatal, efectos similares ocurren en ratones deficientes de RET (Cacalano y col. 1998, Moore y col. 1996, Schuchardt y col. 1994). Por otra parte, en experimentos *in vitro* se ha demostrado que el GDNF apoya la supervivencia y proliferación de los progenitores entéricos en cultivo, y también han sugerido que la capacidad de respuesta del GDNF disminuye con forme aumenta la edad (Chalazonitis y col. 1998, Heuckeroth y col. 1998, Taraviras y col. 1999). En ratones que carecen de RET existe un gran número de células apoptóticas presentes en el intestino anterior, cosa que no sucede en ratones de tipo salvaje, lo que sugiere que los progenitores entéricos mueren debido a la falta de la señalización GDNF-GFR $\alpha$ 1-RET (Taraviras y col. 1999). Diversos estudios sugieren que la señalización de GDNF-GFR $\alpha$ 1-RET es crítico para mantener la supervivencia y / o proliferación de las células precursoras entéricos. RET es expresado por precursores entéricos que pueden diferenciarse en glía, neuronas o ambos (Lo y Anderson 1995).

Además de las neuronas entéricas, algunas subpoblaciones de neuronas sensoriales cutáneas, neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal (DRG) y del ganglio nudoso visceral también dependen del sistema GDNF-GFR $\alpha$ 1 para la supervivencia. En el DRG, se ha demostrado que una subpoblación de neuronas nociceptivas expresan RET y tienen la capacidad de cambio de respuesta de NGF a GDNF posnatalmente. Aunque la muerte al nacimiento de ratones deficientes de GDNF y GFR $\alpha$ 1 impide el análisis de la dependencia de GDNF posnatal por estas neuronas (Bennett y col. 1998, Molliver y col. 1997).

Por otra parte, mientras que el GDNF es un potente agente promotor de la supervivencia para neuronas dopaminérgicas del cerebro medio, el sistema GDNF-GFR $\alpha$ 1 parece ser innecesario para la supervivencia de estas neuronas centrales antes del nacimiento (Enomoto y col. 1998, Pichel y col. 1996, Sánchez y col. 1996).

#### **2.4. Factores de crecimiento neuronal y los ganglios pélvicos**

Los factores neurotróficos son esenciales para la migración, diferenciación, supervivencia y el objetivo de inervación de las neuronas periféricas, además de tener funciones en el mantenimiento de las neuronas postnatales y en la regeneración axonal después de una lesión (Kotzbauer y col. 1996).

Los ganglios pélvicos proporcionan la mayor parte de la inervación autonómica a los órganos urogenitales y parte de la inervación extrínseca del intestino grueso (Keast 1999). La extensión del axón y la migración neuronal en el sistema nervioso periférico se ve influida por numerosos factores neurotróficos entre ellos los factores de la familia de neurotrofinas como el factor de crecimiento neuronal (NGF), las neurotrofinas 3 y 4 (NT-3, NT-4) y algunos miembros de la familia de los GFLs.

El NGF, NT-3, NT-4 y GDNF se expresan en tejidos inervados por neuronas pélvicas como en el colon, los conductos deferentes del pene y la vejiga (Ernsberger 2009). Estudios realizados en animales adultos y posparto se observó cambios en las neuronas pélvicas así como una inervación deficiente, ya que hay denervación parasimpática en los órganos reproductivos (Laurikainen y cols. 2000, Kawakami y col. 2003).

La señalización de factores neurotróficos es relevante para la recuperación de lesiones que afecten la inervación simpática y parasimpática. En esta última el GDNF es crítico para la supervivencia neuronal; las neuronas parasimpáticas expresan los receptores para este ligando (GFR $\alpha$ -1 y 2; Keast 2006).

### **3. Justificación**

Se sabe cómo está organizado el conducto vaginal en la coneja, que en la región pélvica de este conducto existen formaciones neuronales (ganglios paravaginales) adosadas a la pared vaginal (Castelán y col. 2013). También se ha descrito la organización de los ganglios paravaginales, su morfología, su naturaleza química y sus posibles funciones (Xelhuantzi-Arreguin 2012). Además se sugiere que estos ganglios se modifican por la gestación y la multiparidad. Conjuntamente se ha visto que en conejas primíparas 20 días posparto, los ganglios son similares a los de conejas vírgenes (Hernández-Aragón 2012, Xelhuantzi-Arreguin 2012), esto es indicio de que existe un mecanismo de plasticidad que permite esta remodelación ganglionar, pero no se ha descrito cuál es este mecanismo, ni cómo es que este funciona. Por lo el objetivo de este trabajo es determinar cómo es que el factor de crecimiento derivado de células gliales (GDNF) y su receptor GFR $\alpha$ -1 participan en la plasticidad de los ganglios paravaginales de la coneja.

#### **4. Hipótesis**

La primiparidad aumenta la expresión del factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales (GDNF) así como la de su receptor  $GFR\alpha-1$  en la pared dorsolateral de la vagina pélvica de la coneja.

## **5. Objetivos**

### **5.1. General**

Determinar la expresión del factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales (GDNF) y su receptor  $GFR\alpha-1$  en la pared dorsolateral de la vagina pélvica de conejas vírgenes y primíparas.

### **5.2. Particulares**

En la pared dorsolateral de la vagina pélvica de conejas vírgenes y primíparas:

- Determinar la expresión del GDNF y de su receptor  $GFR\alpha-1$
- Identificar las células que expresan el GDNF y su receptor  $GFR\alpha-1$ .
- Cuantificar la expresión del GDNF y su receptor  $GFR\alpha-1$ .

## 6. Metodología

### 6.1. Diseño experimental

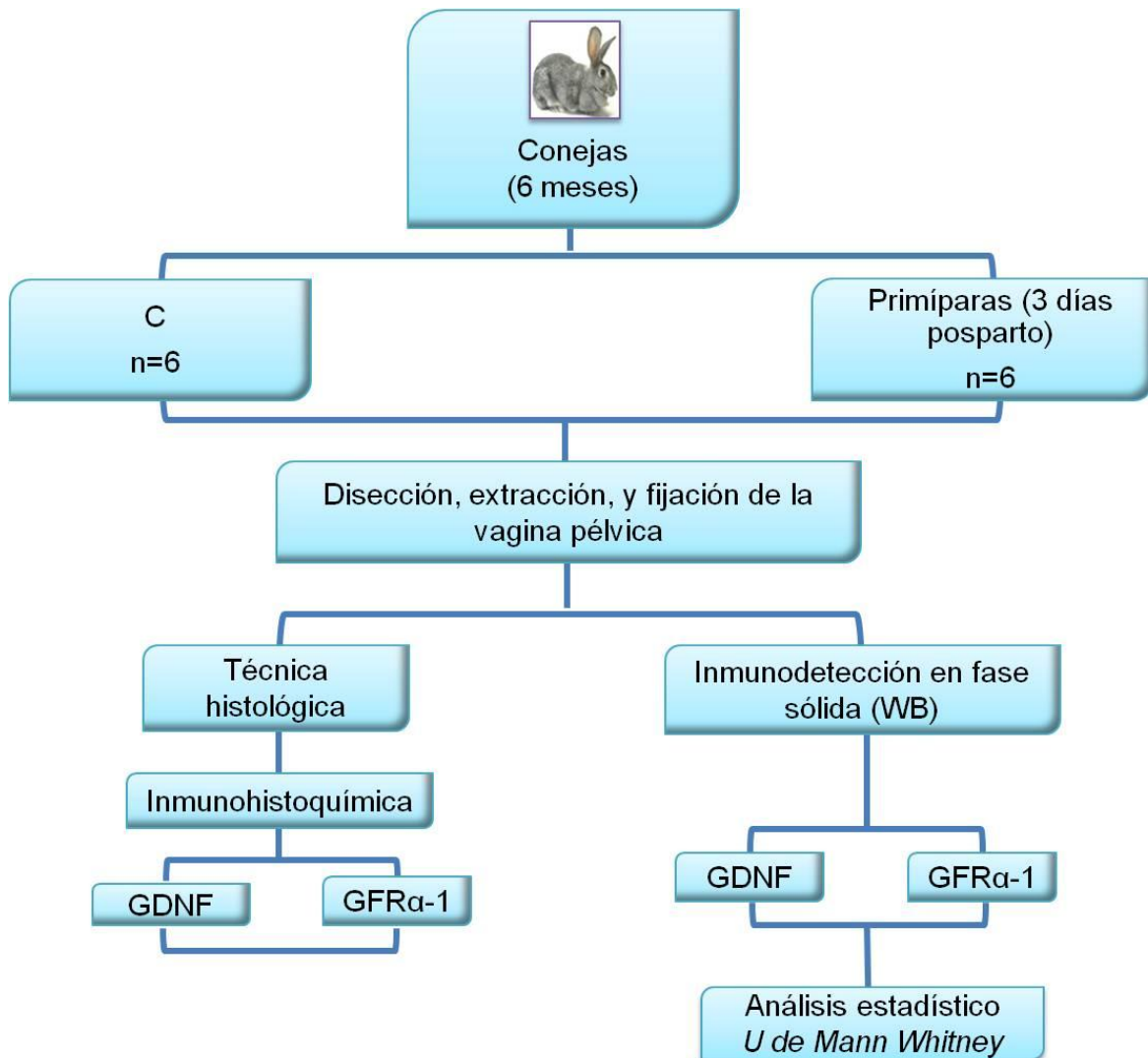


Figura 3. Representación esquemática de la metodología que se siguió durante la elaboración de este trabajo.

### 6.2. Materiales y métodos

**6.2.1. Animales.** Se utilizaron conejas (*Oryctolagus cuniculus*) de 6 meses de edad, de la raza chinchilla, que fueron mantenidas en el bioterio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Las conejas se alojaron en jaulas individuales de acero inoxidable (50 x 60 x 40 cm) en condiciones ambientales habituales (16



h / 8 h de luz y oscuridad; T= 22 ± 2°C). Se alimentaron con croquetas (Conejina, Purina) y agua *ad libitum*.

El diseño experimental del proyecto incluye un grupo control (C) formado por conejas vírgenes y un grupo de conejas primíparas (P3). Con una n total de seis animales por grupos.

Las conejas del grupo P tendrán su primera cópula a los seis meses de edad con machos sexualmente expertos de la colonia. Las conejas serán sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/Kg de peso, i.p.) las primíparas serán sacrificadas a los tres días después del parto y las del grupo C cuando alcancen la misma edad (aproximadamente siete meses).

**6.3. Obtención de fragmentos dorsolaterales de la vagina pélvica.** Se extrajo el conducto vaginal como se describió previamente por Rodríguez-Antolín y col. (2009). Se obtuvo la vagina pélvica, específicamente la región dorsal y se cortó longitudinalmente por la mitad. En cada uno de estos fragmentos dorsolaterales se localizan los ganglios paravaginales. Considerando que no existe diferencia en el número de neuronas ganglionares del fragmento derecho e izquierdo (Castelán y col. 2013), se utilizó el primero para inmunohistoquímica y el segundo para la obtención de homogenados requeridos para la inmunodetección en fase sólida (WB).

#### **6.4. Procesamiento de los fragmentos dorsolaterales de la vagina pélvica**

**6.4.1. Expresión del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y su receptor *GFR $\alpha$ -1* en la vagina pélvica dorsolateral.**

**6.4.1.1. Inmunodetección en fase sólida (Western blot).** El fragmento dorsolateral izquierdo (5 cm de longitud, aproximadamente) de la vagina pélvica se congeló inmediatamente en una mezcla de hielo seco-acetona y se almacenó a -20° C hasta su procesamiento. El tejido fue homogenado con ayuda de un homogenizador eléctrico en solución amortiguadora de lisis (100 mM tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl) adicionado con un cóctel de inhibidores de proteasas, 1mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 1 mM de ditiotreitól (DTT). Los homogenados obtenidos se centrifugaron durante 30 min a 15000g, a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford.

La separación electroforética de las proteínas se realizó utilizando geles de poliacrilamida y dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) de acuerdo al método de Laemmli (1970). Las muestras fueron aplicadas en el gel y separadas aplicando un voltaje de 100 V en el sistema Mini-Protean Tetra System (Bio-Rad). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando el sistema Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad), aplicando una corriente de 5.5 mA/cm<sup>2</sup> de membrana. Las membranas se incubaron con una solución de leche descremada al 5% y 0.2% de tween-20 en PBS (PBS pH 7.4, NaCl 150 mM) por 60 min a temperatura ambiente, para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. Las membranas se incubaron durante 16-18 h a 4°C, con el anticuerpo primario (anti-GDNF sc-13147, anti-GFR $\alpha$ -1 sc-74045; Santa Cruz) diluido en 1% de leche descremada y 0.2% tween-20 en PBS. Después se incubaron con el anticuerpo secundario (anti IgG de ratón acoplado a peroxidasa, Santa Cruz Biotechnology) diluido en 1% de leche descremada y 0.2% tween-20 en PBS, durante 2 h a temperatura ambiente. Las bandas inmunorreactivas se revelaron utilizando un kit de quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico Thermo Scientific) y la exposición de placas radiográficas a las membranas. La cuantificación de la expresión de GDNF y del receptor GFR $\alpha$ -1 se realizó mediante densitometría con el programa ImageJ ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) Los resultados obtenidos se expresaron en densidad óptica de la banda anti-GDNF y anti-GFR $\alpha$ -1 para cada uno de los grupos experimentales.

#### *6.4.2. Identificación de células que expresan al GDNF y su receptor GFR $\alpha$ -1*

**6.4.2.1. Inmunohistoquímica.** El fragmento dorsolateral derecho de la vagina pélvica se sumergió en una solución de Bouin-Duboscq (ácido pícrico 0.44%, formalina 9.86%, ácido acético 6.66%, etanol 53.33%) durante 24 h. Posteriormente, se llevó a cabo la deshidratación con alcohol etílico en concentraciones ascendentes (70, 80, 96 y 100%), enseguida fue aclarado en una solución previa de etanol-xileno y otra de xileno. Ya deshidratado, el tejido fue incluido en paraplast X-tra (Sigma-Aldrich). Una vez incluido el tejido se dejó reposar por 24 h, pasando este tiempo se procedió a realizar cortes en el micrótopo, fueron cortes de 7 $\mu$ m de grosor que se recolectaron formando series de 3 en portaobjetos preparados con poli-L-lisina. Los cortes se dejaron secar durante 24 h. Una vez secos se desparafinaron y se incubaron 72 h en citrato de sodio (100mM, pH 6) a 4°C, para el desenmascaramiento de

antígenos. Al término se realizaron tres lavados con solución amortiguadora de fosfatos salino (PBS; 0.16 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 154 mM NaCl) y después se incubó con 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS para agotar las peroxidasas endógenas. Los cortes fueron lavados con PBS-Tx (PBS/0.3% triton x-100), después se incubaron con solución de bloqueo (5% suero normal/PBS/0.3% triton X-100). Después de tres lavados con PBS / 0.3% triton x-100, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario diluido en PBS / 0.1% triton X-100 durante 72 h a 4°C. Transcurrido este tiempo se hicieron tres lavados con PBS / 0.3% triton x-100, y se incubó con el anticuerpo secundario diluido en PBS / 0.1% triton-X-100 durante 2 h a temperatura ambiente. El marcaje inmunohistoquímico se reveló con el kit ABC (Vector Lab) utilizando diaminobencidina (DAB) como sustrato. Los cortes fueron deshidratados y cubiertos con Cytoseal-60 (Richard-Allan Scientific) y un cubreobjetos. Las preparaciones histológicas se observaron con un microscopio óptico Zeiss (Axio Imager A1) a 200 y 400 aumentos totales. Se tomaron fotografías con una cámara digital OLYMPUS C-5060.

### ***6.5 Análisis estadístico.***

La comparación de las variables cuantificadas en los distintos objetivos particulares se hizo mediante una prueba *U de Mann Whitney* para grupos independientes, utilizando el programa de análisis estadístico Prism 4c para PC (GraphPad).

## 7. Resultados

### 7.1. Expresión del factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales (GDNF)

#### 7.1.1. Immunodetección en fase solida (WB) para el anti-GDNF

Se realizaron western blot piloto para estandarizar las concentraciones y condiciones en las cuales se harían los blots con las muestras de los animales experimentales.

En el primer blot se corrió en un gel SDS-PAGE al 15%, se cargaron 100µg proteína total, se transfirió el gel a la membrana todo a 100 volts constantes. Se bloquearon uniones inespecíficas y se incubó con anticuerpo primario 1:100, el anticuerpo secundario fue diluido 1:1000. Al revelar obtuvimos una banda muy intensa, Figura 5.

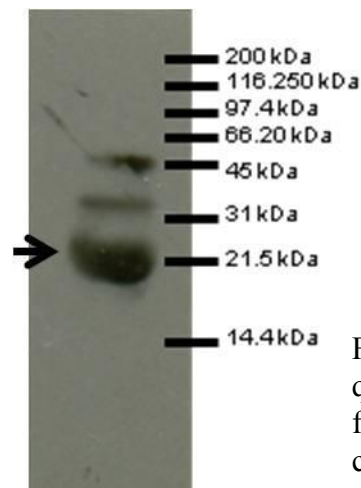


Figura 5. Placa fotográfica en la que se observa la expresión del factor neurotrófico derivado de células gliales.

A pesar de que el marcaje inmunohistoquímico se ve más intenso en el grupo de las conejas P3 con respecto al C cuando se realizaron los western blot (WB) las conejas del grupo P3 tienen menor cantidad de GDNF. Al realizar la densitometría comparando las bandas dadas por GDNF contra bandas de ATPasa-5 y no encontramos diferencias entre los grupos, esto se corrobora con una prueba estadística (*U de Mann-Whitney*,  $P=0.4127$ ; Figura 6).

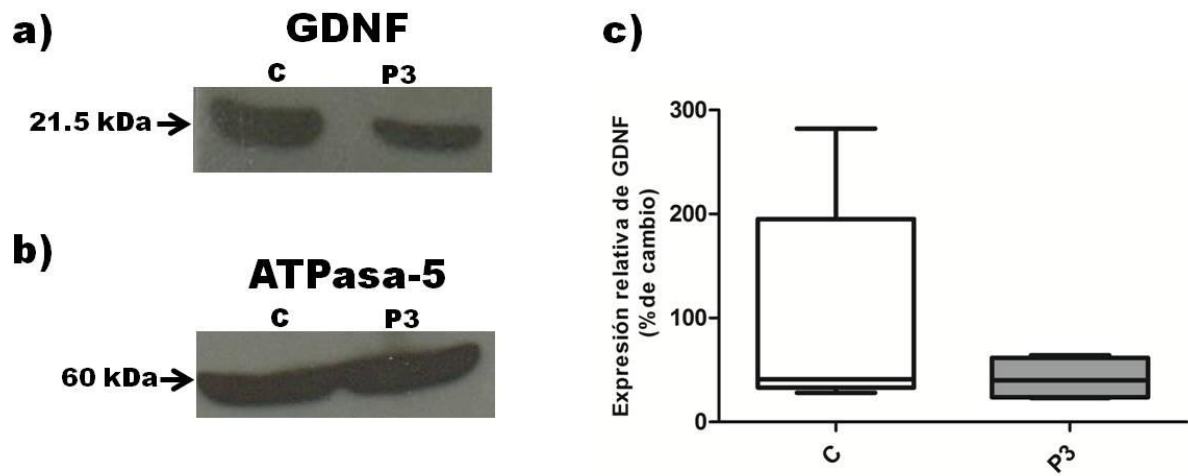


Figura 6. Placas representativas de los WB anti-GDNF vs ATPasa-5. a) grupo control (C), b) grupo primípara tres días posparto (P3). c) gráfico que muestra el porcentaje de cambio de la expresión de GDNF (*U de Mann Whitney*,  $P = 0.4127$ ).

### 7.1.2. Marcaje inmunohistoquímico anti-GDNF

Las neuronas de los ganglios paravaginales expresan marcaje anti-GDNF. El marcaje se observa en la periferia del citoplasma de las neuronas en los ganglios paravaginales carente en el núcleo. Comparando nuestros grupos el marcaje es más intenso en el grupo de primíparas 3 días posparto (P3) con respecto al grupo control (C, Figura 4).

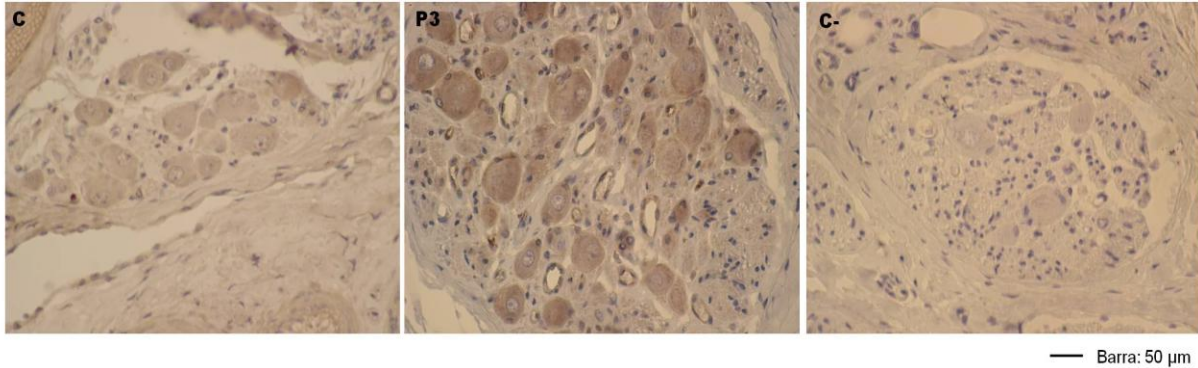


Figura 4- Fotomicrografías de ganglios paravaginales donde se muestra la inmunoreactividad anti-GDNF en conejas C y P3, C- control negativo. Las laminillas fueron contra-teñidas con hematoxilina.

## 7.2. Expresión del receptor $GFR\alpha-1$

### 7.2.1. Inmunodetección en fase sólida (WB) para anti- $GFR\alpha-1$

Los resultados fueron los siguientes:

Realice extractos de cerebro (C), hipotálamo (H), riñon (R) y vagina (V).

Se preparó un gel SDS-PAGE al 10%, se cargaron 100 $\mu$ g de proteína total, se hizo la separación electroforética, se realizó la electrotransferencia todo a 100 volts constantes. Se bloquearon uniones inespecíficas y se incubó con anticuerpo primario 1:100, el anticuerpo secundario fue diluido 1:1000 y se reveló la placa obteniendo lo siguiente Figura 8.

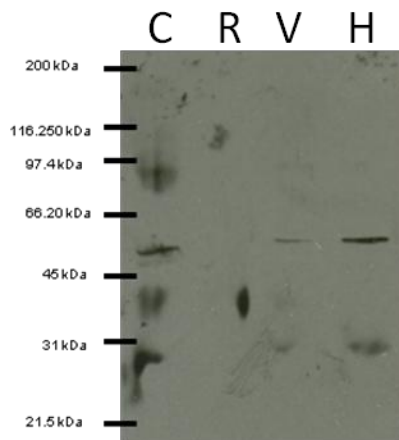


Figura 8: Placa fotográfica en la que se observa la expresión del receptor  $GFR\alpha-1$ .

Al realizar los experimentos con nuestros grupos la tendencia de los resultados era una mayor cantidad del receptor en las conejas control comparadas con las primiparas tres días posparto (P3). Al realizar la densitometría de las bandas dadas por  $GFR\alpha-1$  normalizadas contra bandas dadas por ATPasa-5. No obtuvimos diferencias (*U de Mann Whhitney*,  $P = 0.3429$ , Figura 9).

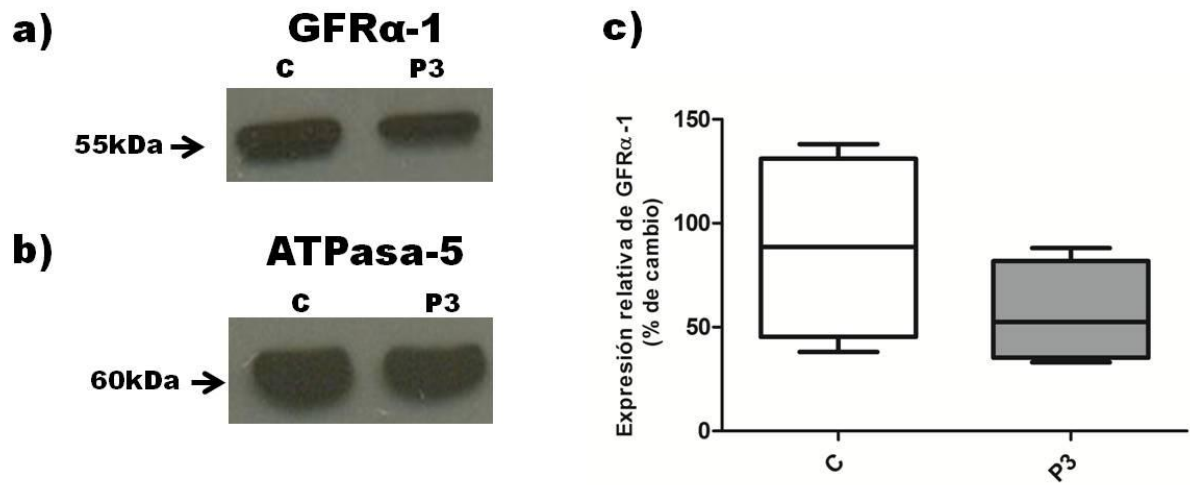


Figura 9. Placas representativas de los WB anti-GFR $\alpha$ -1 vs ATPasa-5. a) grupo control (C). b) grupo primípara tres días posparto (P3). c) gráfico que muestra el porcentaje de cambio de la expresión de GFR $\alpha$ -1 (*U de Mann Whitney*,  $P = 0.3429$ ).



### 7.2.2. Marcaje inmunohistoquímico anti-GFR $\alpha$ -1

Las neuronas de los ganglios paravaginales expresan marcaje anti-GFR $\alpha$ -1. En nuestros grupos experimentales el marcaje inmunohistoquímico es más intenso en nuestro grupo P3 con respecto al grupo C. Al igual que el marcaje anti-GDNF, la expresión del receptor solo se observó en la periferia de las neuronas de los ganglios paravaginales, (Figura 7).

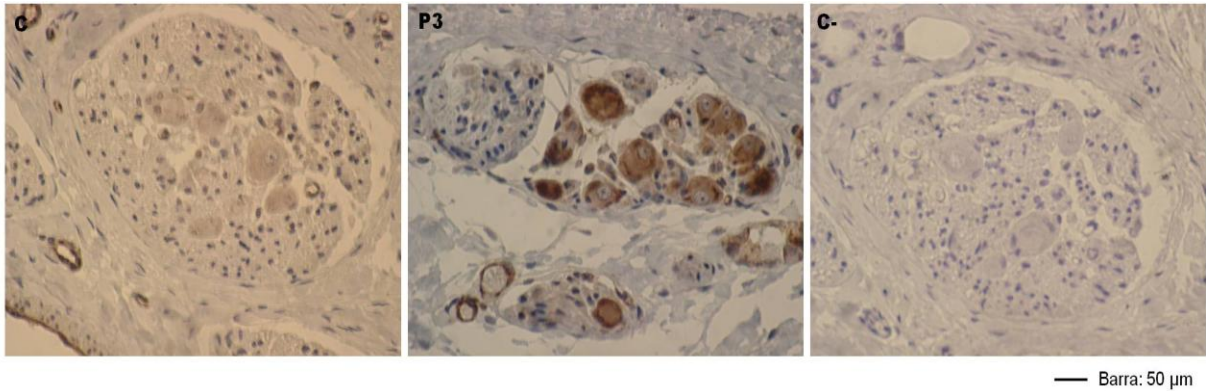


Figura 7. Fotomicrografías de ganglios paravaginales donde se muestra la inmunoreactividad anti-GFR $\alpha$ -1 en conejas C y P3. C-: control negativo. Las laminillas se contra-tiñeron con hematoxilina.

### 7.3. Número de células gliales satélite en los ganglios paravaginales

Al analizar las microfotografías observamos que el número de núcleos que se tiñen en cada ganglio (células gliales) era mayor en el grupo C con respecto al grupo P3, (Figura 10; a). Al contar el número de células no obtuvimos diferencias entre los grupos esto se corroboró con la prueba estadística (*t de Student*,  $P=0.2325$ , Figura 10; b). Cabe mencionar que el número de células es dependiente del tamaño del ganglio ya que ganglios más grandes tienen un mayor número de células gliales.

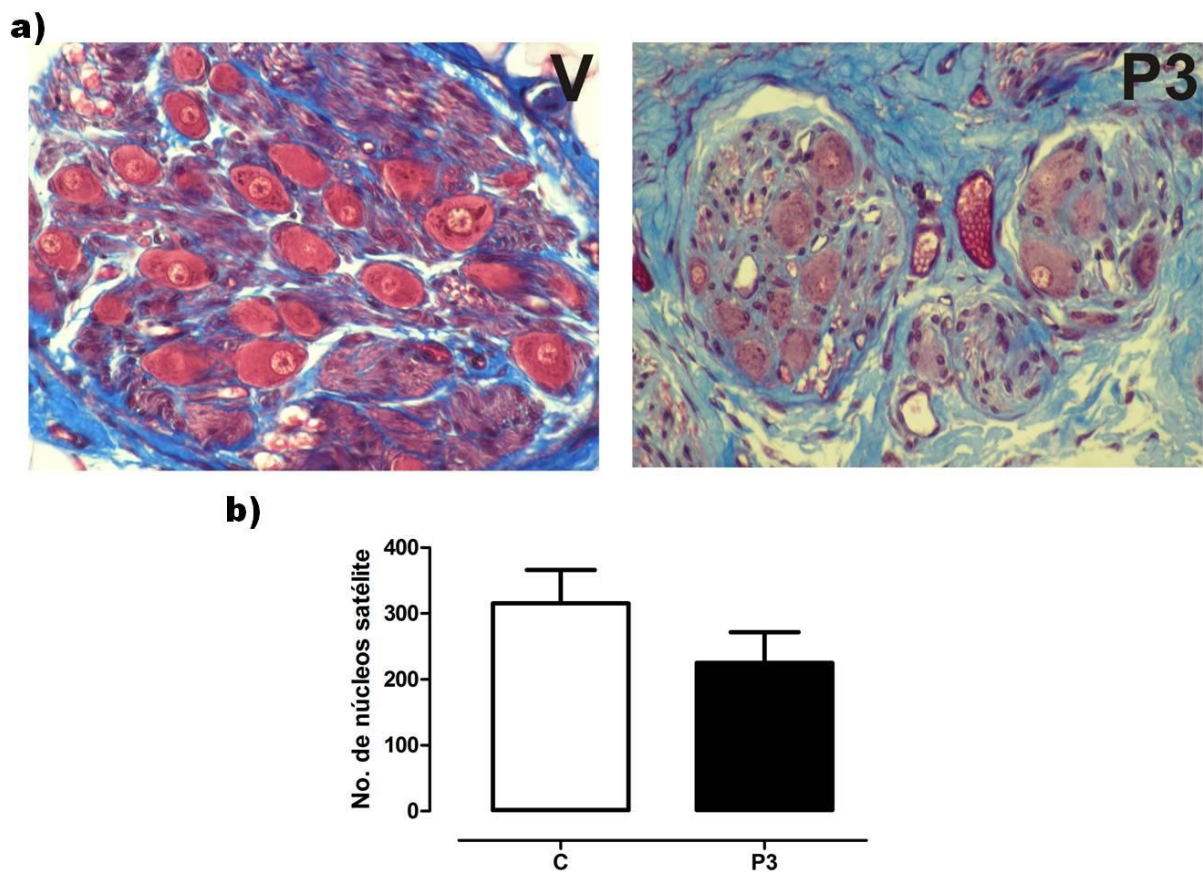


Figura 10. a) Fotomicrografías de ganglios paravaginales teñidas con tricrómica de Masson en conejas control (V) y primíparas 3 días posparto (P3). b). gráfico en el cual se muestra el número de núcleos de satélite en los ganglios paravaginales. (*t de Student*,  $P=0.2325$ ).

## 8. Discusión

Existen reportes sobre la expresión de factores de la familia de los GFLs, sobre sus efectos en diferentes tipos de poblaciones neuronales, así como el efecto de estos factores en tejidos no neuronales (Schuchardt y col. 1994, Moore y col. 1996, Cacalano y col. 1998, Baloh y col. 2000). Sin embargo no existen estudios sobre el efecto de estos factores en un modelo animal *in vivo* como el de la coneja ni mucho menos en modelos relacionados con la experiencia reproductiva. Este es el primer trabajo que demuestra la expresión del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y la de su receptor  $GFR\alpha-1$  en la vagina pélvica de la coneja.

A pesar de que la expresión en el marcaje inmunohistoquímico de GDNF se observaba más intenso en nuestro grupo de conejas primíparas tres días posparto (P3) con respecto a nuestro control, pero al cuantificarlo por medio de inmunodetección en fase sólida (western blot, WB) no hubo diferencias. Tal vez la cantidad liberada de ligando no se ve afectada porque la cantidad local que producen las neuronas puede estar mantenida con ayuda de la producción de factores propia de las células gliales mediante comunicación yuxtacrina además de que puede estar mantenida con los factores provenientes del torrente sanguíneo. Esto es porque el factor puede provenir de otros tejidos ya que todas las células de los tejidos que reciben inervación y todas las células del sistema nervioso producen factores neurotróficos (Bustamante 2007).

Se ha descrito que en el sistema nervioso central el GDNF se localiza en el soma neuronal, dendritas y axones de las neuronas (Kawamoto y col. 2000), lo cual nos puede dar idea del porque al cuantificar el número de núcleos totales los cuales nosotros inferimos son los núcleos de la células gliales, tal vez no tenga que ver con la cantidad de células presentes sino con la localización en el soma neuronal. Esto nos podría decir que si existe una estrecha comunicación entre las neuronas y las células gliales lo cual permite activar el mecanismo de plasticidad neuronal. La comunicación mediante factores neurotróficos denominada no neural entre las neuronas y células gliales, es esencial para la conducción axonal, la transmisión sináptica además del procesamiento de la información, mantenimiento y buen funcionamiento

del sistema nervioso durante el desarrollo y durante la vida adulta (Fields y Stevens-Graham 2002).

En el marcaje inmunohistoquímico anti-GFR $\alpha$ -1 la inmunoreactividad era mayor en las conejas control con respecto a las primíparas tres días posparto, sin embargo al cuantificar la cantidad del receptor no encontramos diferencias a pesar de que había una tendencia de las conejas primíparas tenían menor cantidad de receptor. Esto puede deberse al mecanismo de acción de GDNF. Ya que se sabe que la señalización de este es a través de un complejo receptor multicomponente que comprende la tirosina quinasa RET y un componente de unión al ligando de alta afinidad GFR $\alpha$ -1 el cual está unido a la superficie celular a través de un ancla de glucosilfosfatidilinositol (GPI; Airaksinen y col. 1999 y 2002).

Tal vez lo que se esté modificando sea la interacción del dímero GDNF-GFR $\alpha$ -1 con RET. Ya que se requiere del dímero GFLs-GFR $\alpha$  y RET para formar un receptor GFL funcional (Baloh y col. 2000). También pudiera ser que el mecanismo de acción por el cual esta señalizando GFLs-GFR $\alpha$  sea por medio de NCAM. En 2003, Paratcha y col. confirmó que la molécula de adhesión celular neuronal-140 (NCAM-140) podría actuar como un receptor transmembrana para la señalización de GDNF así como también puede activar la vía de señalización de NCAM. En otro estudio sugieren que GDNF está implicado en el crecimiento de neuritas en neuronas dopaminérgicas lesionadas esto mediante la activación de la vía de señalización de NCAM asociada a *Fyn* (Cao y col. 2008).

O tal vez el efecto del dímero GDNF-GFR $\alpha$  no esté mediado por ninguna de estas vías de señalización: RET y NCAM sino por la vía del proteoglicano heparan sulfato sindecano-3 (HSPGs). En un estudio reciente se observó que la familia de los GFLs (excepto persepina) puede utilizar un receptor de señalización diferente, es decir, pueden interactuar con heparan sulfato sindecano-3 mediante la unión con cadenas transmembrana de heparan sulfato. Esta vía de señalización promueve la propagación de neuronas así como el crecimiento de neuritas mediante la activación de *Src* quinasa. El GDNF promueve la migración de neuronas corticales dependiente de sindecano-3. En un estudio realizado en ratones que carecen de sindecano-3 o GDNF se encontró que tienen un número reducido de neuronas corticales que liberan ácido  $\gamma$ -aminobutírico por lo que se sugiere que ambas moléculas tiene una función

central en el desarrollo cortical. Por lo que ellos sugieren que de manera conjunta entre algún miembro de la familia de los GFLs y sindecano-3 se pueden transducir señales directamente o puede servir como co-receptor, presentando una señalización alternativa de la vía del receptor RET (Bespalov y col. 2011).

Los estrógenos son de particular importancia para la diferenciación y función de distintos sistemas neuronales (Zoubina y Smith 2002; Papka y Mowa 2004). Otra opción del porque no tuvimos diferencias en la expresión de ninguna de las moléculas utilizadas en este estudio, probablemente es que la expresión este modulada por el estado hormonal.

En un estudio realizado en cultivos neuronales encontraron que los efectos del estradiol en el desarrollo de células dopaminérgicas requieren de la coordinación oportuna y espacial de la expresión del GDNF. Además de que apoyan el concepto de que la interacción estrógenos-factor de crecimiento es de particular importancia para el desarrollo de células nerviosas (Ivanova y col. 2002).

Reportes recientes realizados en la glándula pituitaria en el cual evalúan diferentes etapas reproductivas muestran que las variaciones tanto en la expresión y localización subcelular de RET durante la gestación y la lactancia están temporalmente correlacionadas con los cambios en función pituitaria. Además demostraron que la señalización del GDNF por medio del receptor RET podría tener dos roles funcionales diferentes, dependiendo del estado fisiológico. Concluyen diciendo que la relación GDNF-RET. Es un factor pleiotrópico capaz de influir en la fisiología pituitaria durante un período de alta plasticidad (Guillou y col. 2011).

Con todo lo anterior podemos decir que son muchos factores los que están participando en la modulación de la plasticidad de los ganglios paravaginales aquí evaluados. El mecanismo por el cual los ganglios paravaginales están respondiendo a la plasticidad neuronal puede estar modulado por la vía de señalización, la fluctuación y concentración hormonal así como el estado reproductivo.

Lo que ahora se podría hacer es evaluar la concentración y expresión del factor (GDNF) y de su receptor ( $GFR\alpha-1$ ) en distintas condiciones reproductivas incluyendo un modelo artificial (ovariectomía). También se podría evaluar alguna de las vías de señalización

por medio de las cuales el GDNF y GFR $\alpha$ -1 están actuando sobre la plasticidad de los ganglios.

Se ha descrito que las familias del NGF y la de GFLs no funcionan simplemente como sistemas neurotróficos paralelas, sino que es probable que se superponen y se alternan en su influencia del desarrollo de neuronas periféricas (Snider 1997).

Existen numerosas similitudes y solapamientos potenciales con la familia del factor de crecimiento nervioso (NGF) ya que al igual que este regulan el desarrollo del sistema nervioso periférico (Baloh y col. 2000). Durante la vida postnatal, GDNF tiene un efecto trófico más potente que NGF en neuronas sensoriales del DRG (Wright y Snider, 1996, Molliver y col. 1997). Otra opción para complementar este trabajo es evaluando el efecto del GDNF y GFR $\alpha$ -1 conjuntamente con algunos otros factores neurotróficos, como por ejemplo con el NGF o algunos miembros de la misma familia de GFLs para observar como es la interacción entre estos factores.

### **8.1 Aplicaciones del modelo de estudio**

La utilización de la coneja doméstica como modelo de estudio nos permite conocer y dar una aproximación de lo que pudiese estar sucediendo en la mujer cuando se presenta el parto, y como es la recuperación de la fisiología y morfología del aparato urogenital. Además de que los datos obtenidos por análisis de biopsias de mujeres no aportan información suficiente sobre los mecanismos exactos que se modifican en condiciones de primiparidad. Sin contar que muchas técnicas experimentales no pueden ser replicables. Por otro lado las cuestiones bioéticas que no permiten practicar cierto tipo de estudios en humanos. Es por eso que la utilización de la coneja doméstica como modelo de estudio, nos permiten conocer mejor todos los mecanismos que implican la remodelación y plasticidad del tejido nervioso paravaginal, eso al poder obtener los tejidos y órganos de estudio que en la mujer son de difícil acceso.

Aunque la rata es el modelo de estudio más utilizado en laboratorio, el plexo nervioso es muy sencillo ya que está compuesto por un solo ganglio y no podríamos compararlo con el plexo nervioso de algunas otras especies de mamíferos y mucho menos con el de la mujer, es por eso que se utiliza la coneja como modelo de estudio porque la conformación de la inervación del aparato urogenital es similar al de la mujer.

## 9. Conclusiones

- ❖ La vagina pélvica de la coneja expresa el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y su receptor  $GFR\alpha-1$ .
- ❖ La expresión del GDNF y del  $GFR\alpha-1$  es similar en la pared dorsolateral de la vagina pélvica de conejas nulíparas y primíparas.
- ❖ La primiparidad incrementó la expresión del GDNF y del  $GFR\alpha-1$  en el citoplasma de las neuronas paravaginales y en el asociado con los núcleos de la glía satélite. Este último efecto es independiente del número de núcleos de la glía satélite.
- ❖ El sistema GDNF/ $GFR\alpha-1$  podría estar involucrado en la plasticidad morfométrica de las neuronas paravaginales debida a la experiencia reproductiva, posiblemente a través de la activación de células gliales.

## 10. Perspectivas

- ❖ Otra manera de saber cómo está actuando este complejo GDNF-GFR $\alpha$ 1 en la remodelación ganglionar sería evaluando la fosforilación del co-receptor RET.
- ❖ Evaluar la fluctuación y concentración de hormonas esteroides así se podrá determinar si la expresión de GDNF y GFR $\alpha$ -1 si son dependientes de estas hormonas.
- ❖ Evaluar la expresión del complejo GDNF-GFR $\alpha$ 1 conjuntamente con miembros de su misma familia o de alguna otra familia de factores como por ejemplo la familia del NGF.
- ❖ Evaluar la co-expresión de GDNF y GFR $\alpha$ -1 con marcadores neuronales y de células gliales en los ganglios paravaginales.



## 11. Referencias bibliográficas

Airaksinen, MS, Titievsky A y Saarma M. (1999). GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant?. *Mol. Cell. Neurosci.* 13, 313–325.

Airaksinen, MS y Saarma M. (2002) The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 383–394.

Alexander NJ, Baker E, Kaptein M, Karck U, Miller L and Zampaglione E (2004). Why consider vaginal drug administration? *Fertil Steril* 82(1): 1-12.

Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM Jr y Milbrandt J. (2000). The GDNF family ligands and receptors—implications for neural development. *Current Opinion in Neurobiology.* 10,103–110.

Barberini F, De Santis F, Correr S y Motta PM. (1992). The mucosa of the rabbit vagina: A proposed experimental model for correlated morphofunctional studies in humans. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 44(3): 221-7.

Bennett DL, Michael GJ, Ramachandran N, Munson JB, Averill S, Yan Q, McMahon SB y Priestley JV. (1998). A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury. *J Neurosci.* 18,3059-3072.

Bespalov MM, Sidorova YA, Tumova S, Ahonen-Bishopp A, Magalhães AC, Kuleskiy E, Paveliev M, Rivera C, Rauvala H y Saarma M. (2011). Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin. *The Journal of Cell Biology.* 192 (1): 153–169.

Buj-Bello A, Buchman VL, Horton A, Rosenthal A, Davies AM. (1995). GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. *Neuron.* 15, 821-8.

Bustamante Zuleta Ernesto (2007). En "El sistema nervioso: desde las neuronas hasta el cerebro humano".

Cao J-P, Hong-Jun Wang H-J, Yu J-K, Yang H, Xiao C-H y Gao D-S. (2008). Involvement of NCAM in the effects of GDNF on the neurite outgrowth in the dopamine neurons. *Neuroscience Research*. 61, 390–397.

Cacalano G, Farinas I, Wang LC, Hagler K, Forgie A, Moore M, Armanini M, Phillips H, Ryan AM, Reichardt LF y col. (1998). GFRa1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney. *Neuron*. 21, 53-62.

Chalazonitis A, Rothman TP, Chen J y Gershon MD. (1998). Age-dependent differences in the effects of GDNF and NT-3 on the development of neurons and glia from neural crest-derived precursors immunoselected from the fetal rat gut: expression of GFRa-1 *in vitro* and *in vivo*. *Dev Biol*. 204,385-406.

Cao JP, Wang HJ, Yu JK, Yang H, Xiao CH, Gao DS. (2008). Involvement of NCAM in the effects of GDNF on the neurite outgrowth in the dopamine neurons. *Neuroscience Research*. 61, 390–397.

Castelán F y col. (2008). Multiple deliveries affects the histological organization of paravaginal autonomic ganglia in rabbits. *Society for Neuroscience*

Castelán F, Xelhuantzi N, Hernández-Aragón LG, Rodríguez-Antolín J, Cuevas E, Martínez-Gómez M. (2013). Morphometry of paravaginal ganglia from the pelvic plexus: impact of multiparity, primiparity, and pregnancy.

Cruz Y, Hudson R, Pacheco P, Lucio RA, Martínez-Gómez M. (2002). Anatomical and physiological characteristics of perineal muscles in the female rabbit. *Physiology & Behavior*. 75, 33– 40.

de Groat WC. (2006). Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective. *British Journal of Pharmacology*. 147, S25–S40.

Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkenny C, Grigoriou M, Wartiwara K, Suvanto P, Smith D, Ponder B, Costantini F, Saarma M y col. (1996). GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature*. 381,789-793.

Enomoto H, Araki T, Jackman A, Heuckeroth RO, Snider WD, Johnson EM Jr, y Milbrandt J. (1998). GFRa1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron*. 21,317-324.

Ernsberger Uwe. (2009). Role of neurotrophin signalling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. *Cell Tissue Res*. 336,349–384.

Fields RD y Stevens-Graham B. (2002). New insights into Neuron-Glia communication. *Science*. 298(5593): 556–562.

García O, Massieu L. (2004). Interacción entre las células gliales y neuronales y su papel en la muerte y sobrevivencia neuronal. *Arch Neurocién*. 9(1):39-46

Giraldi A, Alm P, Werkstrom V, Myllymaki L, Wagner G and Andersson KE (2002). Morphological and functional characterization of a rat vaginal smooth muscle sphincter. *International Journal of Impotence Research: The Journal of Sexual Medicine*. 14(4): 271-82.

Guillou A, Romanò N, Bonnefont X, Le Tissier P, Mollard P y Martin AO. (2011). Modulation of the Tyrosine Kinase Receptor Ret/Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) Signaling: A New Player in Reproduction Induced Anterior Pituitary Plasticity?. *Endocrinology*. 152(2): 515–525.

Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, Armanini M, Simmons L, Moffet B, Vandlen RA, Simpson L, [corrected to Simmons et. al.]. (1994). GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science*. 266 (5187): 1062–1064.

Hernández-Aragón LG. (2012) Efecto de la gestación y el parto sobre la organización histológica de la vagina pélvica de la coneja. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias Biológicas. UATx.

Heuckeroth RO, Lampe PA, Johnson EM y Milbrandt J: (1998). Neurturin and GDNF promote proliferation and survival of enteric neuron and glial progenitors in vitro. *Dev Biol*. 200,116-129.

Hisasue S, Kato R, Suetomi T, Kato K, Suzuki K, Kobayashi K, Itoh N, Kiyama H, Tsukamoto T. (2006). Age-related alteration of neurturin receptor GFRA2 and nNOS in pelvic ganglia. *Neurobiol Aging*. 27(10): 1524-30.

Houdeau E, Prud'homme MJ, Rousseau A and Rousseau JP. (1995). Distribution of noradrenergic neurons in the female rat pelvic plexus and involvement in the genital tract innervation. *J Auton Nerv Syst*. 54(2): 113-25.

Ibáñez, CF. (1998). Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. *Trends Neurosci*. 21, 438–444.

Imai K, Furuya K, Kawada M, Kinugasa Y, Omote K, Namiki A, Uchiyama E y Murakami G. (2006). Human pelvic extramural ganglion cells: a semiquantitative and immunohistochemical study. *Surgical and Radiologic Anatomy*. 28(6): 596-605.

Ivanova T, Karolczak M y Cordian B. (2002). Estradiol stimulates GDNF expresión in developing hypothalamic neurons. *Endocrinology*. 143(8): 3175-3178.

Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R, Louis JC, Hu S, Altrock BW y Fox GM. (1996). GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell*. 85(7): 1113-24.

Kawakami T, Wakabayashi Y, Aimi Y, Isono T, Okada Y (2003). Developmental expression of glial cell-line derived neurotrophic factor, neurturin, and their receptor mRNA in the rat urinary bladder. *Neurobiol Urodyn*. 22, 83-8.

Keast JR (1999). Unusual autonomic ganglia: connections, chemistry, and plasticity of pelvic ganglia. *Int Rev Cytol*. 193, 1-69.

Keast JR. (2006). Plasticity of pelvic autonomic ganglia and urogenital innervation. *Int Rev Cytol*. 248, 141-208.

Kotzbauer PT, Lampe PA, Heuckeroth RO, Golden, J.P., Creedon, D.J., Johnson, E.M. & Milbrandt, J. (1996) Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature*, 384, 467–470.

Langley JN y Anderson HK. (1896). The Innervation of the Pelvic and adjoining Viscera. Part VII. Anatomical Observations. *J Physiol.* 20 (4-5): 372–406.

Laurikainen A, Hiltunen JO, Vanhatalo S, Klinge E y Saarma M. (2000). Glial cell line-derived neurotrophic factor is expressed in penis of adult rat and retrogradely transported in penile parasympathetic and sensory nerves. *Cell Tissue Res.* 302(3): 321-9.

Li MZ y Masuko S. (2001). Target specific organization and neuron types of the dog pelvic ganglia: a retrograde-tracing and immunohistochemical study. *Arch Histol Cytol.* 64(3): 267-280.

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science.* 260, 1130–1132.

Lo L y Anderson DJ. (1995). Postmigratory neural crest cells expressing c-RET display restricted developmental and proliferative capacities. *Neuron.* 15, 527-539.

Martínez-Gómez M, Lucio RA, Carro M, Pacheco P and Hudson R (1997). Striated muscles and scent glands associated with the vaginal tract of the rabbit. *Anat Rec* 247(4): 486-95.

Molliver DC, Wright DE, Leitner ML, Parsadanian AS, Doster K, Wen D, Yan Q y Snider WD. (1997). IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron.* 19, 849-861.

Moore MW, Klein RD, Farinas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, Reichart LF, Ryan AM, Carver-Moore K y Rosenthal A. (1996). Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature.* 382, 76-79.

Oh SJ, Hong SK, Kim SW y Paick JS (2003). Histological and functional aspects of different regions of the rabbit vagina. *Int J Impot Res* 15(2): 142-50.

Owman C y Sjöberg NO. (1966). Adrenergic nerves in the female genital tract of the rabbit. With remarks on cholinesterase-containing structures. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 74(2): 182-97.

Papka RE, Mowa CN (2004) Estrogen receptors in the spinal cord, sensory ganglia, and pelvic autonomic ganglia. *Int Rev Cytol.* 231, 91–127.

Paratcha y Ledda (2008). GDNF and GFRa: a versatile molecular complex for developing neurons. *Trends in Neurosciences.* 31(8).

Pessina M, Hoyt RF, Goldstein JI, y Traish AM (2006). Differential Effects of Estradiol, Progesterone, and Testosterone on Vaginal Structural Integrity. *Endocrinology* 147(1): 61–69.

Pichel JG, Shen L, Hui SZ, Granholm A-C, Drago J, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Saarma M, Hoffer BJ y col. (1996). Defects in enteric innervations and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature.* 382, 73-76.

Quartu M, Serra MP, Mascia F, Boi M, Lai ML, Spano A, Del Fiacco M. (2006). GDNF family ligand receptor components Ret and GFRalpha-1 in the human trigeminal ganglion and sensory nuclei. *Brain Res Bull.* 69(4): 393-403.

Ramírez-Corona E. (2011) Contribución de los estrógenos en la organización histológica de la vagina pélvica de la coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*) Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias Biológicas. UATx.

Rodríguez-Antolín J (2007) Estudio histológico del aparato urogenital inferior en la coneja doméstica: Relación con la multiparidad y la edad. Tesis de Doctorado en Neuroetología. Universidad Veracruzana.

Rodríguez-Antolín J, Xelhuantzi N, García-Lorenzana M, Cuevas E, Hudson R and Martínez-Gómez M (2009). General tissue characteristics of the lower urethral and vaginal walls in the domestic rabbit. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 20(1): 53-60.

Sanchez MP, Silos-Santiago I, Frisen J, He B, Lira SA y Barbacid M. (1996). Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature.* 382, 70-73.

Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F y Pachnis V. (1994). Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature.* 367 (6461): 380-3.

Shults CW, Kimber T y Martin D. (1996). Intrastratial injection of GDNF attenuates the effects of 6-hydroxydopamine. *Neuroreport*. 7, 627–31.

Schüssler B, Anthuber C y Warrell D. (1994). The pelvic floor before and after delivery. En: *Pelvic floor re-education. Principles and Practics*. Schüssler B Laycock J Norton P Stanton S (eds.) Editorial Springer Verlag. London. 105-110.

Snider WD. (1997). IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron*. 19, 849-861.

Wright DE, Snider WD (1996). Focal expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in developing mouse limb bud. *Cell Tissue Res*. 286(2): 209-17.

Sullivan AM y Toulouse A. (2011). Neurotrophic factors for the treatment of Parkinson's disease *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 22(3): 157-165.

Taraviras S, Marcos-Gutierrez CV, Durbec P, Jani H, Grigoriou M, Sukumaran M, Wang LC, Hynes M, Raisman G y Pachnis V. (1999). Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system. *Development*. 126, 2785-2797.

Takahashi M. (2001). The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 12, 361–373.

Theofilopoulos S., Goggi J., Riaz S.S., Jauniaux E., Stern G.M. y Bradford H.F. (2001). Parallel induction of the formation of dopamine and its metabolites with induction of tyrosine hydroxylase expression in foetal rat and human cerebral cortical cells by brain-derived neurotrophicfactor and glial-cell derived neurotrophicfactor. *Brain Res Dev Brain Res*. 127, 111–122.

Treanor JJS, Goodman L, Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, Gray C, Armanini MP, Pollock RA, Hefti F et al. (1996). Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature*. 382, 80-83.

Trupp M, Ryden M, Jornvall H, Funakoshi H, Timmusk T, Arenas E, Ibanez CF. (1995). Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *J Cell Biol.* 130, 137-48.

Vega Álvarez JA y Moris de la Tassa G. (2003). Factores neurotróficos: fundamentos para su aplicación clínica. *Neurología.* 18(1): 18-28.

Wanigasekara Y y Keast JR. (2005). Neurturin has multiple neurotrophic effects on adult rat sacral parasympathetic ganglion neurons. *European Journal of Neuroscience.* 22, 595–604.

Wake MH. (1992) The comparative anatomy of the urogenital system. En: Hyman's *Comparative Vertebrate Anatomy.* Wake MH (eds.) Editorial The University of Chicago Press. Chicago and London.

Xelhuantzi Arreguin N. (2012) Organización tisular del aparato urogenital inferior en conejas jóvenes múltiparas. Tesis de doctorado. Doctorado en Ciencias Biológicas. UATx.

Zoubina EV, Smith PG. (2002) Distributions of estrogen receptors alpha and beta in sympathetic neurons of female rats: enriched expression by uterine innervation. *J Neurobiol.* 52, 14–23.



## 12. Abreviaturas

GDNF: factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales

GFR $\alpha$ : receptor alfa de la familia de receptores de los GFLs

GFLs: familia de ligandos del GDNF

NRTN: neurturina

ARTN: artemina

PSPN: persepina

NGF: factor de crecimiento nervioso

NT-3: neurotrofina 3

NT-4: neurotrofina 4

P3: conejas primíparas tres días posparto

C: conejas vírgenes

WB: western blot (inmunodetección en fase sólida)

PBS: solución amortiguadora de fosfatos salina

kDa: kilodaltones

### 13. Anexos

#### 13.1. Anexo 1.- Tinción tricrómica de Masson

Después de obtener los cortes en el micrótopo se dejan secar mínimo por 24 h, posteriormente se tiñen con las diferentes soluciones en los siguientes tiempos.

Pasos	No.	Soluciones	Tiempo
Desparafinar	1	Xileno 1	5 min
	2	Xileno 2	5 min
	3	Xileno : Etanol 100%	5 min
Hidratación	4	Etanol 100%	5 min
	5	Etanol 100%	5 min
	6	Etanol 96%	3 min
	7	Etanol 80%	3 min
	8	Etanol 60%	3 min
	9	Agua destilada	3 min
Mordente	10	Fijador Bouin	12 hrs
Azuleamiento	11	Agua corriente	15-20 min
	12	Hematoxilina de Weigert	11 min
	13	Agua corriente	40 seg
	14	Agua destilada	40 seg
	15	Etanol amoniaco	2 min
	16	Agua corriente	40 seg
	17	Biebrich Scarlet-Fushina ácida	4 min
	18	Agua corriente	40 seg
Contraste	19	Ácido fosfomolibdico : Ácido fosfotúngstico	4 min
Doble contraste	20	Azul de anilina	3 min
	21	Etanol ácido	3min
	22	Agua corriente	40 seg
Deshidratación	18	Etanol 96%	40 seg
	19	Etanol 96%	40 seg
	20	Etanol 100%	30 seg
	21	Etanol 100%	30 seg
	22	Etanol : Xileno	10 seg
	23	Xileno 1	10 seg
	24	Xileno 2	10 seg

Finalmente sin dejarlos expuestos al ambiente, los portaobjetos se montan con Cytoseal TM 60 y se dejan secar.

13.2. Anexo 3.- Inmunohistoquímica anti-factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales (GDNF) y anti-receptor alfa de la familia de receptores de los GFLs (GFR $\alpha$ -1) en cortes transversales de la región pélvica de la vagina.

Desparafinar		
Destapar anticuerpos	Citrato de Sodio a pH 6 y 10mM	Tres noches
	Se ponen a temperatura ambiente	15 minutos
	Se calientan en el microondas a potencia 10	5 minutos
Marcar	Se secan y se hace el recuadro y se colocan en la cámara húmeda	
Lavados	PBS 1X (tres lavados)	10 minutos c/u
Bloquear peroxidadas	Agua Oxigenada al 30% en PBS 1X H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30 minutos
Lavados	PBS 1X (dos lavados)	10 minutos c/u
	PBS 1X + Triton al 0.3%	10 minutos
Bloquear uniones inespecíficas	Sol. De Bloqueo con suero de cabra	1 hora
Lavados	PBS 1X + Triton al 0.3% (tres lavados)	10 minutos c/u
Primer anticuerpo	Anticuerpo Primario 1:100 (GDNF y GFR $\alpha$ .1)	3 noches a 4°C, en la cámara húmeda
Lavados	PBS 1X + Triton al 0.3% (tres lavados)	10 minutos c/u
Segundo anticuerpo	Anticuerpo Secundario 1:250	2 horas A temperatura ambiente en la cámara húmeda
Lavados	PBS 1X-Triton al 0.3% (dos lavados)	10 minutos c/u
	PBS 1X	10 minutos
Complejo avidina-biotina-peroxidasa (abc)	ABC 1:200	1 hora
Lavados	PBS 1X (tres lavados)	10 minutos c/u
Revelar	Diaminobencidina	

Lavados	PBS 1X (tres lavados)	Por decantación
Contratinción	Hematoxilina de Harris	1 minuto
Lavados	Agua corriente	Por decantación

Finalmente sin dejarlos expuestos al ambiente, los portaobjetos se montan con Cytoseal TM 60 y se dejan secar.

## 14. Publicaciones

Cartel 29



### Expresión del factor neurotrófico derivado de células gliales y de su receptor $GFR\alpha-1$ en la pared dorsolateral de la vagina pélvica de conejas vírgenes y primíparas

Verónica García Villamar<sup>1</sup>, Eréndira Ramírez Corona<sup>2</sup>,  
Nikte Xelhuanzi Arreguin<sup>3</sup>, Arturo Ortega Soto<sup>4</sup>,  
Margarita Martínez Gómez<sup>5,6</sup> y Francisco Castelán<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx); <sup>2</sup>Doctorado en Neuroetología, Universidad Veracruzana; <sup>3</sup>Doctorado en Ciencias Naturales, UATx; <sup>4</sup>Depto. de Genética y Biología Molecular, Cinvestav; <sup>5</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Autónoma de México; <sup>6</sup>Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, UATx.

Los factores neurotróficos son proteínas que modulan el crecimiento, diferenciación, reparación y supervivencia neuronal. El factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales (GDNF) participa en el desarrollo, mantenimiento y plasticidad de neuronas simpáticas y parasimpáticas del plexo pélvico. Estos efectos ocurren a través de su interacción con receptores específicos ( $GFR\alpha 1-4$ ). Al estudiar la inervación paravaginal, perteneciente al plexo pélvico, de conejas vírgenes, gestantes, primíparas y múltiparas hemos encontrado modificaciones morfológicas que sugieren una remodelación de esta inervación. Ésta podría involucrar la señalización de factores como el GDNF. El objetivo de este trabajo es determinar la expresión del GDNF y del receptor  $GFR\alpha 1$  en la pared dorsolateral de la vagina pélvica de conejas vírgenes y primíparas. Para ello se utilizaran conejas vírgenes de 7 meses de edad y primíparas de 3 días. La cuantificación de ambas proteínas se analizará mediante inmunodetección en fase sólida. Para identificar las células que expresan el GDNF y el  $GFR\alpha 1$  se harán marcajes inmunohistoquímicos en cortes transversales del tejido paravaginal. Para encontrar diferencias ( $P < 0.05$ ) entre la expresión del GDNF y el  $GFR\alpha 1$  se utilizará una prueba t de Student para grupos independientes.

*Con financiamiento de PROMEP-SEP (UATLX-PTC-109) y PAPIIT-UNAM (228110 a MMG); y becas CONACYT a VGV y ERC (Reg. 261601, 329112).*

**Expresión del factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales y de su receptor GFR $\alpha$ -1 en la pared dorsolateral de la vagina pélvica de conejas vírgenes y primíparas**

García Villamar V<sup>1</sup>, Ortega A<sup>2</sup>, Martínez Gómez M<sup>3</sup> y Castelán F<sup>4</sup>



<sup>1</sup>Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx); <sup>2</sup>Depto. de Genética y Biología Molecular, Cinvestav; <sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); <sup>4</sup>Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, UATx.

Los factores neurotróficos son proteínas que modulan el crecimiento, diferenciación, reparación y supervivencia neuronal. El factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales (GDNF) participa en el desarrollo, mantenimiento y plasticidad de neuronas simpáticas y parasimpáticas del plexo pélvico. Estos efectos ocurren a través de su interacción con receptores específicos (GFR $\alpha$ 1-4). Los ganglios pélvicos proporcionan la mayor parte de la inervación autonómica a los órganos urogenitales y a diferencia de otros ganglios autónomos, estos se componen de una mezcla de neuronas postganglionares simpáticas y parasimpáticas. En la coneja, hemos encontrado que la experiencia reproductiva remodela la inervación paravaginal de la pared dorsolateral de la vagina pélvica, pertenecientes al plexo pélvico. Esta remodelación podría involucrar la señalización de factores neurotróficos. Por lo que la señalización de factores neurotróficos es relevante para la recuperación de lesiones que afecten la inervación simpática y parasimpática. En este contexto no hay información sobre la asociación de factores neurotróficos con la remodelación de ganglios pélvicos en hembras de mamíferos. Por lo cual el objetivo de este trabajo es determinar la expresión de GDNF y de su receptor GFR $\alpha$ -1 en la pared dorsolateral de la vagina pélvica de conejas vírgenes y primíparas. Las neuronas de los ganglios paravaginales expresan marcaje anti-GDNF y anti-GFR $\alpha$ -1. El marcaje en ambos casos se observa en el citoplasma de las neuronas siendo más intenso para el receptor GFR $\alpha$ -1. Es más intenso en las conejas primíparas (P3) con respecto a las vírgenes (V). Esto se observa para GDNF y GFR $\alpha$ -1. Referente a la cuantificación por western blot (WB) no existen diferencias entre los grupos en ninguno de los casos. En conclusión, el parto modifica la expresión de GDNF y de su receptor GFR $\alpha$ -1 en las neuronas paravaginales del plexo pélvico de la coneja.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
DIRECTORIO**

Dr. Víctor Job Paredes Cuahquentzi  
Rector

Mtro. René Elizalde Salazar  
Secretario Académico

Mtra. Dora Juárez Ortiz  
Secretaria de Investigación Científica y  
Posgrado

Mtro. Efraín Ortiz Linares  
Secretario de Extensión universitaria y Difusión  
Cultural

Mtro. Rubén Reyes Córdova  
Secretario Administrativo

Dr. Sergio Eduardo Algarra Cerezo  
Secretario Técnico

Mtro. Mauro Sánchez Ibarra  
Secretario de Autorrealización

Mtro. Adolfo Cuevas Sánchez  
Coordinación de la División de Ciencias  
Biológicas

Mtra. Samantha Viñas Landa  
División de Ciencias y Humanidades

Mtro. Marlon Luna Sánchez  
División de Ciencias Básicas, Ingeniería y  
Tecnología

Dra. Margarita Martínez Gómez  
Coordinadora del Centro Tlaxcala de Biología  
de la Conducta

M. C. Antonio Durante Murillo  
Coordinador General de Cuerpos Académicos