



# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Posgrado en Ciencias Biológicas

Plasticidad morfométrica de los ganglios  
paravaginales asociada con la experiencia reproductiva  
en la coneja:  
modificaciones que involucran a las células de la  
glía satélite

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Luisa Clara Regina Hernández Kelly

Director  
Dr. Francisco Castelán





# Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Posgrado en Ciencias Biológicas

Plasticidad morfométrica de los ganglios  
paravaginales asociada con la experiencia reproductiva  
en la coneja:  
modificaciones que involucran a las células de la  
glía satélite

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

**Luisa Clara Regina Hernández Kelly**

### Comité Tutorial

Director Dr. Francisco Castelán

Tutores

Dr. Pablo Pacheco Cabrera  
Dra. Margarita Martínez Gómez

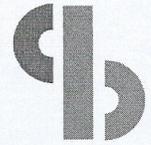
Tlaxcala, Tlax.

Diciembre 2016



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

Maestría en Ciencias Biológicas



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 **Luisa Clara Regina Hernández Kelly** 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: **“Plasticidad morfométrica de los ganglios paravaginales asociada con la experiencia reproductiva en la coneja: modificaciones que involucran a las células de la glia satélite”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., NOVIEMBRE 18 DE 2016

DR. PABLO PACHECO CABRERA

DRA. MARGARITA MARTÍNEZ GÓMEZ

DR. FRANCISCO CASTELÁN

DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO

DR. MIGUEL ANGEL LARA GARCÍA



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:  
ISO 9001:2008-NMX-CC-9001-IMNC-2008



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

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Bioquímica y Biología Tisular en las instalaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Periférica Tlaxcala del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del **Dr. Francisco Castelán**. El Comité tutorial que aportó toda su experiencia para el mejor desarrollo de este trabajo estuvo integrado por el Dr. Pablo Pacheco Cabrera, la Dra. Margarita Martínez Gómez, la Dra. Estela Cuevas Romero y el Dr. Miguel Angel Lara García.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi agradecimiento al Dr. Francisco Castelán por la dirección de esta tesis, la paciencia en todo momento, porque sin ella no habría sido posible la culminación de este trabajo, por sus consejos y sobre todo por su amistad.

Al todos los miembros de mi comité tutorial por toda la paciencia y sus comentarios para enriquecer mi trabajo y mi formación y a mi consejero el Dr. Jorge Rodríguez que siempre me ha recibido con una sonrisa y me ha ayudado en todo momento.

Mi agradecimiento a Jesús Ramsés Chávez Ríos y Laura García Rivera por su asistencia técnica en la realización de esta tesis.

Quiero agradecer a mis compañeros del laboratorio que siempre están ahí para ayudarme, a Laura, Angeles, Lupita y los del otro laboratorio que por buenos a malos han hecho que mi tiempo haya sido el más valorado por mí; a Luis y Blanca, a mis amiguitos, a veces hijos a veces gremlins, no se que es peor, pero que los quiero mucho y ellos saben quienes son.

De manera especial quiero agradecer a mi maestra Verónica García Villamar por todo el tiempo compartido, su apoyo y su amistad. Gracias Vero.

A los Doctores: Marco, Rossana, Elba, Claudia, Zila, Marc, Edna y Donnají por toda la paciencia y amistad que me prestan, por los malos pero sobre todo por los buenos momentos compartidos.

## DEDICATORIAS

Esta tesis se la dedico a mi familia toda toda:  
A mis Papás que no están físicamente pero  
siguen con nosotros a mis hermanos Betty,  
Memo, Martha y Vero y a mi gran familia tíos,  
primos y sobrinos que siempre me  
apapachan.

A Arthur que hemos compartido momentos muy muy especiales y otros muy muy difíciles pero que siempre ha estado ahí, para mostrarme que a pesar de todo, con trabajo, disciplina y constancia se pueden lograr nuestros objetivos

## RESUMEN

Los ganglios pélvicos proveen la mayoría de la inervación autonómica que recibe el aparato urogenital. Hallazgos previos de nuestro grupo de trabajo demostraron que durante la gestación ocurre una reducción transitoria del área del soma neuronal que es revertido en el período postparto de la coneja. Utilizando diseños experimentales complementarios se ha buscado aproximarnos a conocer el mecanismo involucrado. En este estudio se tuvo como objetivo determinar la influencia que la experiencia reproductiva ejerce sobre las células de la glía satélite (SGC) localizadas en los ganglios paravaginales de la coneja. Con tal fin se utilizaron conejas controles (C), gestantes a término (G) y primíparas (P) en el día 3 postparto en las que se realizó una caracterización de las SGC basada en la inmunorreactividad anti-vimentina y anti-GFAP, así como en la organización histológica revelada mediante tricrómica de Masson. Los datos mostraron que las SGC expresan vimentina y GFAP. En comparación con el grupo C, la gestación y la primiparidad incrementaron la intensidad del marcaje inmunorreactivo anti-GFAP. Aunque el número promedio de SGC por neurona fue similar entre ambos grupos, se encontró que la gestación modifica la proporción de neuronas rodeadas por más de 2 SGC. Estos hallazgos sugieren que la interacción neurona-glía es relevante para la plasticidad morfométrica de las neuronas de los ganglios paravaginales de la coneja.

# INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Sistema Nervioso.....	1
1.2 Células gliales .....	2
1.2.1. Células Gliales de Sistema Nervioso Central .....	3
1.2.1.1. Astrocitos.....	3
1.2.1.2 Oligodendrocitos .....	4
1.2.1.3. Glía radial .....	5
1.2.1.4. Microglia.....	8
1.2.2. Células gliales del sistema nervioso periférico.....	9
1.2.2.1. Células de Schwann .....	10
1.2.2.2. Glía entérica .....	10
1.2.2.3. Glía satélite .....	12
1.3. Sistema nervioso y experiencia reproductiva.....	13
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>15</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>21</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>22</b>
<b>5. OBJETIVO.....</b>	<b>23</b>
5.1 Objetivo General .....	23
5.2 Objetivos particulares .....	23
<b>6. METODOLOGÍA .....</b>	<b>24</b>
6.1 Animales y grupos.....	24
6.2 Condición fisiológica .....	24
6.3 Obtención de la vagina pélvica .....	24
6.4 Análisis histológico .....	25
6.5 Inmunohistoquímica .....	25
6.6 Inmunofluorescencia.....	26
6.7 Tinción tricrómica de Masson .....	27
6.8 Análisis estadístico. ....	27
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>41</b>
<b>10. ANEXO 1 .....</b>	<b>49</b>



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Sistema Nervioso

El sistema nervioso está organizado en dos partes: el sistema nervioso central (SNC) formado por el cerebro y la médula espinal y el sistema nervioso periférico (SNP) formado por los nervios que emergen de la médula espinal y conectan el SNC con todo el organismo. El SNP puede clasificarse en somático y autonómico y éste último en simpático y parasimpático (Fig. 1) (Kenney y Ganta, 2014).

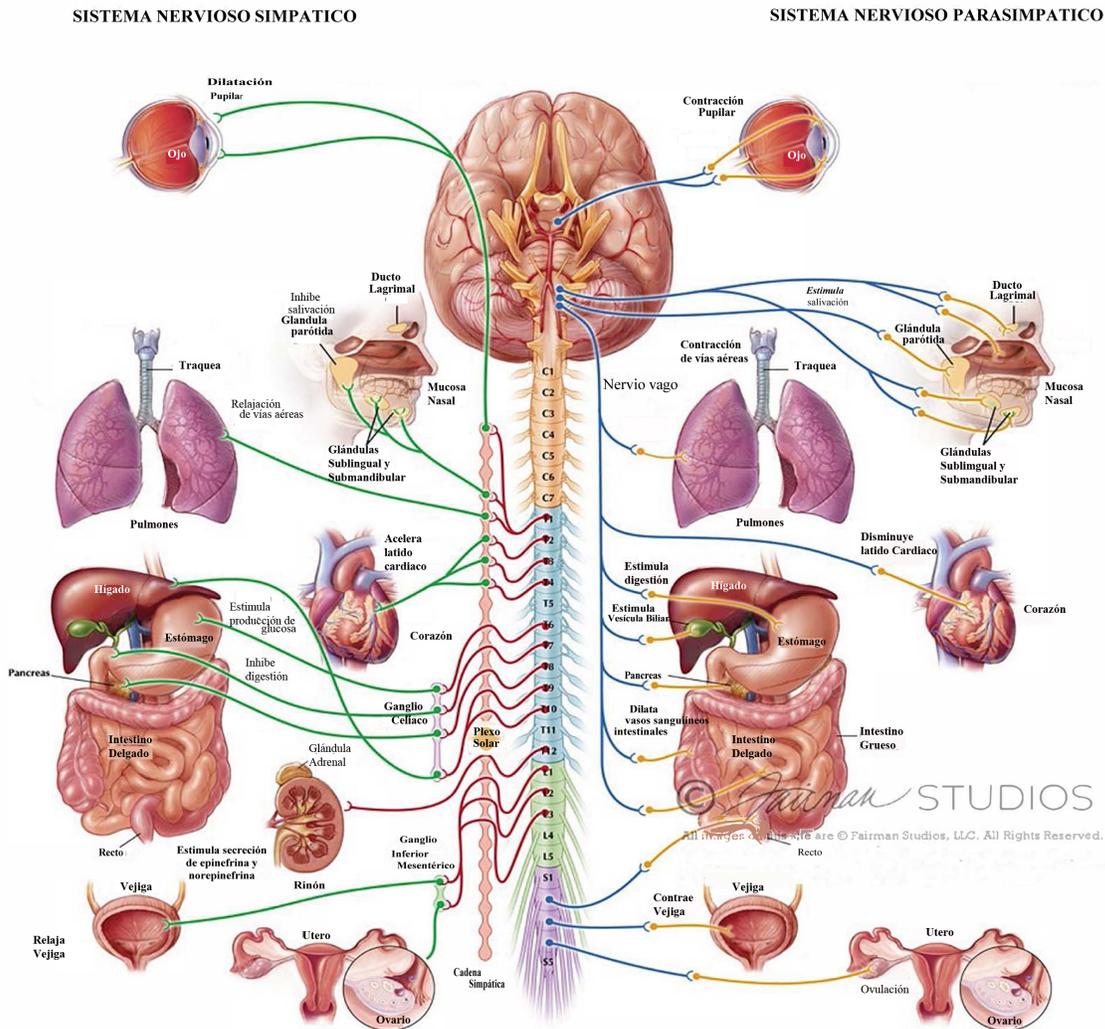


Figura. 1 División del Sistema Nervioso Autónomo (modificada de Fairman Studios 2003).

Los dos principales tipos celulares que constituyen el sistema nervioso son las neuronas y las células gliales (Bramanti, y cols., 2010). Las neuronas están involucradas en la generación y propagación de potenciales de acción. Las células gliales, que en todo el sistema nervioso exceden en número a las neuronas, son más pequeñas que estas y aunque no participan directamente en la conducción de impulsos nerviosos, sus funciones de soporte ayudan en la definición, establecimiento y mantenimiento de los contactos sinápticos y la habilidad de señalización neuronal; carecen de axones y dendritas y aún cuando extienden procesos complejos de sus cuerpos celulares; éstos, son menos prominentes que los de las neuronas y no tienen las funciones de los axones y las dendritas; sin embargo, llevan a cabo funciones indispensables durante el desarrollo y en el funcionamiento normal del sistema nervioso maduro (Jessen, 2004; Jessen y Richardson, 2001; Dale Purves, Augustine, y Fitzpatrick, 2004).

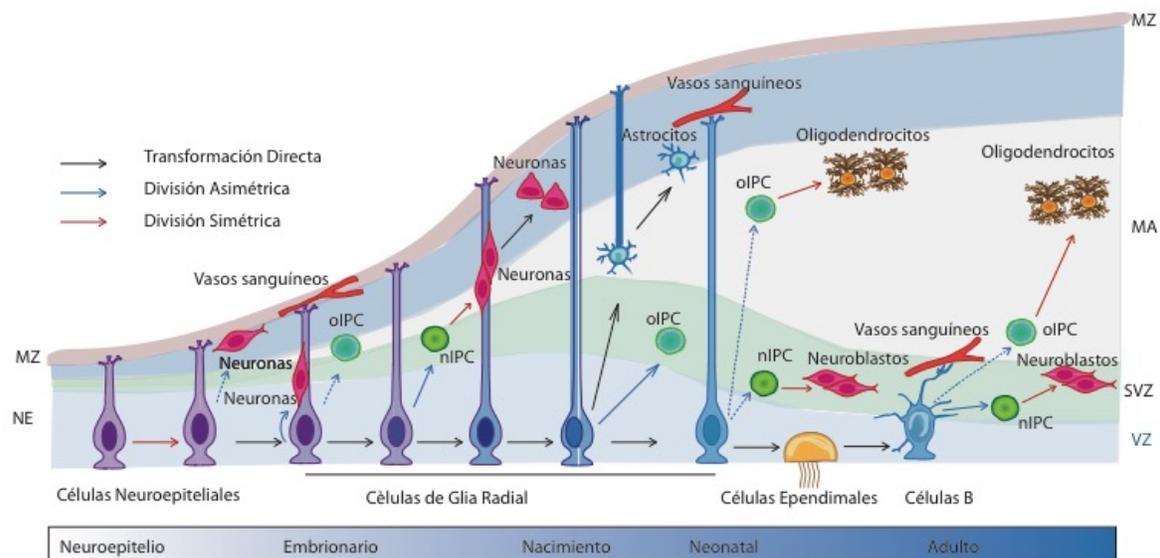
Durante el desarrollo postnatal del sistema nervioso ocurren diversas interacciones celulares imprescindibles para la consolidación de circuitos fundamentales para su funcionamiento (Purves, Snider, y Voyvodic, 1988). En el establecimiento y mantenimiento de los contactos sinápticos, los factores tróficos son cruciales, permitiendo el intercambio y señalización de esta interacción neurona-neurona en el SNC. En cambio, las interacciones entre las neuronas y las células blanco, como las glandulares y las musculares, son decisivas para la organización del SNP. En ambos casos, la estrecha relación entre las neuronas y las células gliales es crítica para la organización y función del sistema nervioso.

## **1.2 Células gliales**

El término *glía* procede del griego "glía" que significa pegamento, presunción del siglo XIX de que estas células mantenían unido, de alguna manera, a todo el sistema nervioso; este vocablo ha sobrevivido a pesar de carecer de alguna evidencia que la unión del sistema nervioso sea una entre tantas funciones de las células gliales. El papel de la glía está bien establecido e incluye: en el desarrollo del sistema nervioso, provee el andamiaje para la migración y establecimiento de las neuronas; en el adulto, actúa en el mantenimiento del entorno iónico de las células, modificando la propagación de la señal al estar implicadas en la mielinización, modulan la sinapsis al capturar el neurotransmisor, son

capaces de transmitir señales a largas distancias in forma de ondas de calcio, proporcionan soporte metabólico a las neuronas y forman parte en la regulación del flujo sanguíneo, así como ayudan en la recuperación de daño neuronal, son consideradas reservorio de progenitores neuronales y en el sistema nervioso periférico, participan en la compartimentalización de los axones, envolviendo los de las motoneuronas y las neuronas sensoriales; en la axonogénesis y una vez que estos han madurado, en la generación de células gliales (Fig. 2) (Barry, Pakan, y McDermott, 2014; Garratt, y cols., 2000; Halassa, Fellin, y Haydon, 2007; Marina, y cols., 2016; Purves y cols., 2004; Scemes y Giaume, 2006; Taveggia, 2016).

Las células gliales del SNC son astrocitos, oligodendrocitos, glía radial, y microglía (Fig. 3), mientras que en el sistema nervioso periférico se encuentran las células de Schwann que recubren a las fibras nerviosas, células de glía entérica que están en el sistema nervioso entérico y las células de glía satélite, que es una glía especializada que se encuentra en ganglios sensoriales y ganglios simpáticos y parasimpáticos ( Hanani, 2010).



**Figura. 2** Diferenciación de las células gliales (Modificada de Bayraktar y cols., 2015).

## 1.2.1. Células Gliales de Sistema Nervioso Central

### 1.2.1.1. Astrocitos

Los astrocitos son las células gliales más abundantes en el SNC, están restringidas a cerebro y médula espinal, prácticamente constituyen un tercio de las células del cerebro y

ocupan territorios definidos por dominios funcionales (Chung y cols., 2013), tienen una apariencia de estrella por los procesos que elaboran (de ahí su prefijo astro). Como todas las estirpes de glía, los astrocitos fueron considerados durante mucho tiempo elementos pasivos que mantenían a los circuitos neuronales proveyendo soporte estructural y metabólico a las neuronas. Actualmente se considera que la principal función de los astrocitos es mantener, de una manera diversa, un apropiado ambiente químico para la señalización neuronal (Clarke y Barres, 2013). En los años 90 estudios en cultivo de astrocitos revelaron que mostraban una forma de excitabilidad basada en variación de concentraciones de calcio; así, en los últimos 20 años se ha acumulado evidencia que permite establecer el concepto de sinapsis tripartita, en el que estas células son reconocidas como potentes reguladores de la comunicación sináptica y la plasticidad que están directamente involucradas en el procesamiento y almacenamiento de la información (Perea y col., 2009). Como resultado de una compleja interacción con elementos tanto pre- como post-sinápticos, los astrocitos remueven el exceso de neurotransmisor en la comunicación sináptica (Pellerin y cols., 2007; Zuchero y Barres, 2015). Los astrocitos forman mecanismos de defensa antioxidantes, actuando como mediadores de la sobrevivencia de las neuronas, participan en la regulación del  $K^+$  y proveen soporte metabólico a las neuronas (Allen, 2014; Jessen, 2004; Karki y cols., 2014). Están localizados junto a las neuronas, tienen procesos radiales que les permiten estar en contacto con los somas de las neuronas así como con sus prolongaciones, y presentan heterogeneidad en el perfil de expresión de acuerdo a la región del SNC que ocupan (Bayraktar, y cols., 2015). Los astrocitos no solo participan en la fisiología normal, como podría ser la formación de sinapsis y establecimiento de espinas dendríticas durante el desarrollo del cerebro, además están involucrados en lesiones agudas y procesos patológicos crónicos en el SNC (Attwell y cols., 2011; Bushong, y cols., 2002; Garden y Campbell, 2016; Halassa y cols., 2007; Marina y cols., 2016; Zuchero y Barres, 2015).

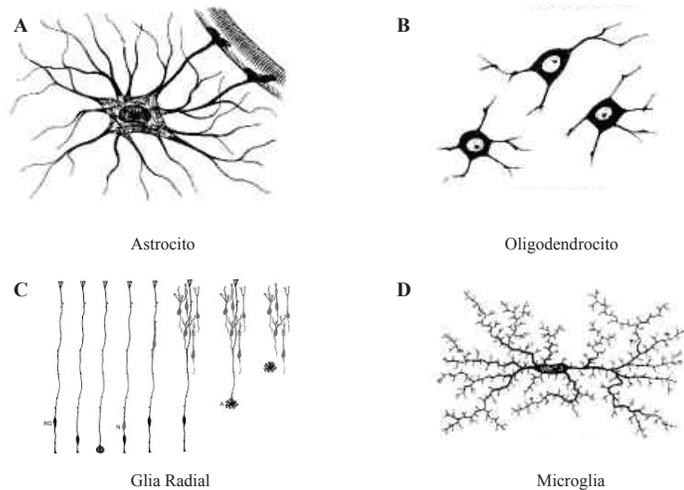
### **1.2.1.2 Oligodendrocitos**

En el SNC los oligodendrocitos envuelven múltiples axones neuronales con mielina, una estructura membranal de capas concéntricamente acomodadas que están íntimamente

relacionadas con los axones (Barbarese y Pfeiffer, 1981; Hughes y Appel, 2016). La longitud y grosor de estas capas en un solo oligodendrocito puede variar de manera considerable; esta mielina ayuda a la rápida transmisión sináptica, reduce costos energéticos neuronales y provee soporte metabólico a los axones (Lee y cols., 2012). Dentro del oligodendrocito el programa de mielinización es controlado por el núcleo, pero puede también estar controlado localmente por la dependencia de la actividad sináptica, los transcritos de la proteína básica de mielina (MBP) son transportados a los procesos de los oligodendrocitos y traducidos próximos al contacto con el axón (Ainger y cols., 1993). La MBP es utilizada como biomarcador de oligodendrocitos, le confiere la característica a la materia blanca y se ha utilizado como un marcador en daño isquémico o lesiones traumáticas o degeneración en el cerebro (Garden y Campbell, 2016). Durante el desarrollo los oligodendrocitos son generados de células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) generadas en zonas específicas de la corteza cerebral y de la médula espinal de donde migran y posteriormente proliferan para poblar el sistema nervioso completamente (Crawford, y cols., 2016; Hughes y Appel, 2016).

### **1.2.1.3. Glía radial**

En el SNC, las células son generadas en diferentes sitios de aquellos donde residirán más tarde. En los estadios iniciales del desarrollo se favorece una migración radial: en la corteza cerebral las neuronas jóvenes migran a través de la guía de la glía radial, tomando su posición final a lo largo de su vector radial lo que puede verse influenciado por axones aferentes (Götz y Huttner, 2005; Kriegstein y Alvarez-buylla, 2011). En el cerebelo en desarrollo es esencialmente similar, aun cuando la migración de las células granulares es en dirección reversa desde la superficie externa hacia el interior pasando por las dendritas y somas de las células de Purkinje, hasta su lugar y esta guía radial la llevan a cabo las células gliales de Bergmann (Sidman y Rakic, 1973).



**Figura 3.** Las células gliales del SNC son: A) astrocitos, B) oligodendrocitos, C) glía radial y D) microglía,

En la corteza cerebral de mamíferos en desarrollo, las células de glía radial son resultado de la transición de las células neuroepiteliales. Estas dejan de expresar características de células epiteliales y empiezan a presentar marcadores de astrogliá y empiezan su transformación a glía radial presentando gránulos electrodensos de glucógeno y la expresión de proteínas específicas de astrocitos como transportadores a glutamato (p.ej. GLAST), S100 $\beta$ , vimentina y la proteína de cerebro que une lípidos (BLBP por sus siglas en inglés)(Campbell y Götz, 2002; Götz y Huttner, 2005). La emergencia de la glía radial apical ocurre en la zona ventricular, donde se forman progenitores intermedios que migran formando la zona subventricular pero aún están ancladas a la parte apical; una vez que retraen este proceso apical estos progenitores intermedios pueden formar neuronas (De Juan Romero y Borrell, 2015).

La glía radial es fundamentalmente transitoria en los mamíferos y actúa como progenitores de componentes estructurales y funcionales del desarrollo del SNC. La diferenciación de la glía radial puede dar origen a astrocitos y células endimales en el estado adulto(Chanas-Sacre, y cols., 2000; Götz y Huttner, 2005; Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009; Malatesta, y cols., 2000). Sin embargo, en algunas zonas del sistema nervioso adulto, pueden ser encontradas en nichos muy especializados en donde funcionan como progenitores celulares (p.ej. las llamadas células B de la zona subependimal en el ventrículo lateral, las células tipo1 de la zona subgranular del giro dentado del hipocampo, o los

tanicitos que bordean el ventrículo hipotalámico) (Anthony y cols., 2004; Hartfuss y cols., 2001; Rakic, 2003) atos recientes implican a la glía radial en la vascularización de la corteza cerebral (Dimou y Götz, 2014; Morrens, van den Broeck, y Kempermann, 2012).

En el cerebelo, las células gliales de Bergmann presentan múltiples procesos ascendentes que cruzan la capa molecular formando palizadas paralelas a lo largo del eje longitudinal de la folia, en el desarrollo estas células proveen la guía para la migración de los distintos tipos celulares pero también regulan la elongación bidireccional de axones y dendritas (Carletti y Rossi, 2007; Eiraku y cols., 2005; Rakic y Sidman, 1973; Rakic, 1971). En el estado adulto, las células gliales de Bergmann hacen contacto con los vasos sanguíneos y por otra parte envuelven completamente la sinapsis entre las fibras paralelas o las fibras trepadoras y las células de Purkinje por lo que en esta posición estratégica las células gliales de Bergmann son capaces de detectar la actividad sináptica y tener una conexión con la circulación local (Buffo y Rossi, 2013; Carletti y Rossi, 2007; Yamada y Watanabe, 2002). En la retina, las células gliales de Müller, nombradas así por su descubridor Heinrich Müller en el siglo XIX, representa la glía que extiende sus procesos a todo lo largo de la retina, desde la membrana exterior hasta la membrana interna (Goldman, 2014; Surzenko, y cols., 2013). Las células gliales de Müller presentan una serie de funciones que van desde andamios en la organización de la retina, como transductor de la luz hasta la formación de la barrera hemato-retina, además de jugar un papel importante en la salud y enfermedad de la retina, también sirve como proveedor de alimento y reserva de energía y mantenimiento de la homeostasis celular (Faissner y Reinhard, 2015).

Aparte de papel como progenitores o reservorios neuronales y de guías en la migración neuronal, la glía radial también facilita la formación y compartimentalización de la materia blanca y en la médula espinal, finamente organizada los procesos de la glía radial, crean límites que separan a los axones nacientes del tracto dorsal emergente y la materia blanca lateral, permitiendo primeramente la organización de la axogénesis y cuando este tracto axonal ha madurado genera células gliales (Barry y cols., 2014; Ma y cols., 2013).

#### **1.2.1.4. Microglia**

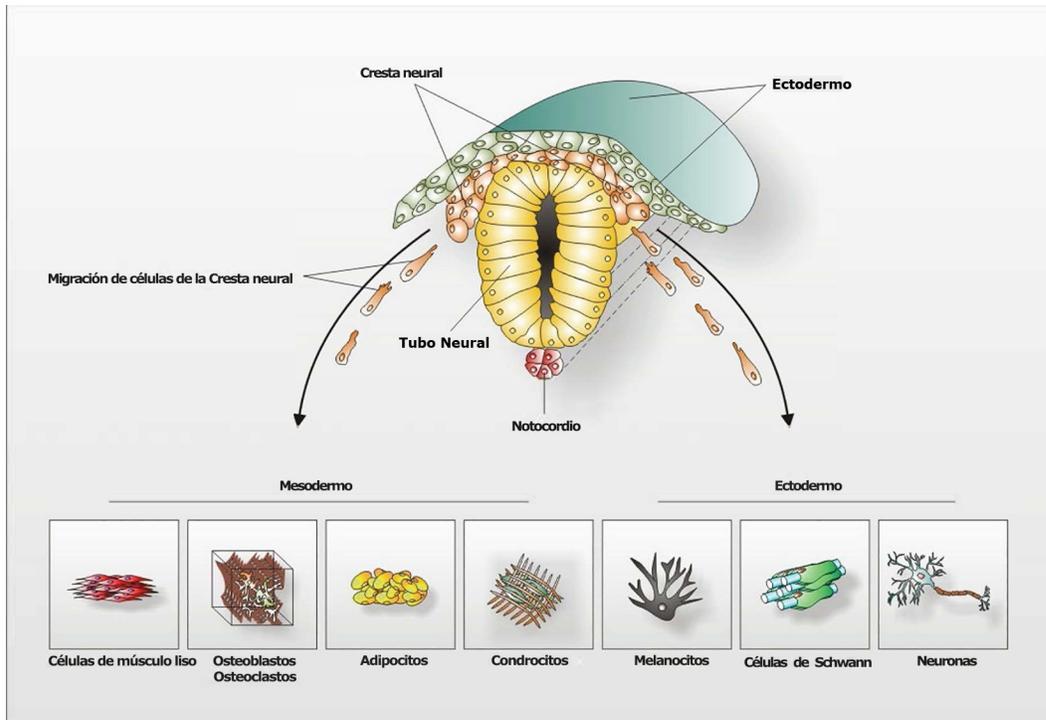
Pío del Río Hortega introdujo el concepto de microglia como un elemento celular definido en el SNC, en un capítulo del libro “Citología y patología celular del sistema nervioso” publicado en 1932. Las células de la microglia juegan un papel crítico como células inmunocompetentes y fagocíticas en el SNC, participan en eventos de respuesta inmune innata, participan en la respuesta a infección, inflamación, trauma, isquemia y neurodegeneración todo esto a través de una serie de sistemas de señalización (Rivest y ElAli, 2016; Tong y Vidyadaran, 2016; Xiong, Liu, y Yang, 2016). Cuando estas señales son recibidas, la microglia responde rápidamente cambiando su morfología, función y expresión de genes. El comportamiento de la microglia en respuesta a señales inflamatorias ha sido denominado como activación de la microglia (Thomas, 1992; González-Scarano y Baltuch, 1999; Kettenmann, y cols., 2011; Kreutzberg, 1996; McGeer y McGeer, 1995; Perry y Gordon, 1988).

Las células de microglia son de origen mesodérmico derivadas de monocitos circulantes o de células precursoras del linaje monocítico-macrófago que se origina en la médula ósea y que ingresan al SNC en la embriogénesis muy temprana y se transforman en una forma celular relajada y ramificada de microglía en el CNS maduro (Kim y Cho, 2016; Rivest y ElAli, 2016) Esta constituye de 5 a 20% de la población de glía, se encuentra en menor cantidad en la materia blanca que en la gris y de acuerdo con el microambiente su morfología y expresión de antígenos de superficie celular cambia (Marina y cols., 2016). La microglía comparte algunos marcadores del linaje de células del sistema inmune como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD45, el antígeno común de linfocitos (LCA) y moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) del tipo I y tipo II, por lo que son conocidas como células presentadoras de antígenos; elaboran y secretan citoquinas, proteínas de bajo peso molecular entre las que se encuentra Interleucinas (ILs), interferones (IFNs), factores de necrosis tumoral (TNFs), factores estimulantes de colonias (CSFs), factores de crecimiento transformantes (TGFs) entre otros (Aloisi y cols., 1997; Chao y cols., 1992; Chauvet y cols., 2001; Domingues y cols., 2016; Koka y cols., 1995; Marina y cols., 2016; Nagai y cols., 2001; Stalder y cols., 1997). Estas citoquinas pueden participar en una gran variedad de respuestas biológicas entre las que se incluyen crecimiento desarrollo y modulación de la inflamación y de la respuesta inmune y la

regulación de la homeostasis (Garden y Campbell, 2016; Kim y de Vellis, 2005; Marina y cols., 2016).

### 1.2.2. Células gliales del sistema nervioso periférico

El SNP tiene su origen en las células de la cresta neural, estas se localizan en el borde de los dobleces del tubo neural que se fusionan y forman el tubo y la cresta neural y se separan ambos del ectodermo del cual se derivan; estas poblaciones celulares fueron observadas por Wilhem His a mediados del siglo XIX (Le Douarin y Dupin, 2016). De estas células derivan las neuronas sensoriales, neuronas postganglionares, células de Schwann, células satélites de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) y ganglios autonómicos (Fig. 4). Las células de la cresta neural migran de tres vías, la ruta más dorsal da origen a los melanocitos, la vía intrasomática genera los ganglios de la raíz dorsal compuesta de células sensoriales y sus células satélites y la migración ventromedial permite la formación de ganglios autonómicos (Catala y Kubis, 2013; Kaltschmidt y cols., 2012; Lee y cols., 2003).



**Figura 4.** Origen de las células del SNP (modificada de Kaltschmidt y cols., 2012)

### **1.2.2.1. Células de Schwann**

Las células de Schwann se originan en la cresta neural ( Jessen y Mirsky, 1994), durante el desarrollo la mayoría de las células emergen de la parte dorsal del tubo neural, a partir de una población migratoria pluripotente denominada células de Schwann precursoras (SCP), en roedores aparece entre los días del estado embrionario 12 y 14 ; se transforman en las células de Schwann inmaduras entre los días 13 y17 dependiendo del roedor que hablemos, su diferenciación final forma dos distintas poblaciones de células de Schwann maduras que son dependientes de manera muy importante de las señales; ya sea de factores de sobrevivencia, mitogénicos y de señales de diferenciación que envían los axones con los cuales están asociadas (Corell y cols., 2010; Le Douarin y Dupin, 2016; Stewart y cols., 1995; Woodhoo y Sommer, 2008).

Una característica notable en estas células es la plasticidad, pues estas células maduras mielinizantes o no, pueden revertir su fenotipo a un fenotipo similar al de células de Schwann inmaduras como respuesta a un daño en los nervios (Armati y Mathey, 2013). Entre los marcadores utilizados para estas células se encuentran AP2 $\alpha$ , Cad19 y otros más que se utilizan para conocer el estado de maduración de las células de Schwann (Jessen y Mirsky, 2013; Jessen y Mirsky, 1983; Woodhoo y Sommer, 2008). La mielina es una adaptación fundamental de los vertebrados (Glenn y Talbot, 2013; Stolt y Wegner, 2015). Las fibras mielinizadas son esenciales para la propagación eficiente del impulso nervioso a lo largo de los axones, que mantienen una comunicación permanente y continua con las células gliales para el correcto desarrollo del sistema nervioso y de esta manera asegurar la transmisión eficiente del impulso eléctrico (Auld y Robitaille, 2003; Mirsky y Jessen, 2009; Stolt y Wegner, 2015). Los axones proveen de factores tróficos y mitogénicos a las células de Schwann que participan en el desarrollo, sobrevivencia del axon y en la formación de nodos de Ranvier, así como mantener la posición de las motoneuronas en la médula espinal. En el SNP quien controla la mielinización axonal es la neuregulina 1 tipo III (NRG1) (Garratt y cols., 2000; Nave y Salzer, 2006; Taveggia, 2016).

### **1.2.2.2. Glía entérica**

El sistema nervioso entérico, descrito a finales del siglo XIX, es la más grande división del sistema nervioso autónomico y consiste de unas 100 millones de neuronas

entéricas rodeadas por hasta siete veces más de células gliales, contenidas en dos principales plexos (submucosomal y mientérico) en la pared del intestino (Cabarrocas y cols., 2003; Furness y cols., 2014a). Este sistema controla el peristaltismo, el intercambio de fluidos a través de la mucosa y la regulación del flujo sanguíneo (Furness y cols., 2014b; Neunlist y cols., 2014). La primera observación de las células de glía entérica fue reportada en 1899 por Dogiel y por muchos años fueron consideradas como células de Schwann. A principios de la década de 1970, Gabella estableció que eran un tipo de glía único diferenciándolas de otras en el sistema nervioso periférico para 1981 y las denominó como glía entérica (Gabella, 1981; Gulbransen y Sharkey, 2012; Jessen y Mirsky, 1980; Sharkey, 2015). La glía entérica es una población de células de glías no mielinizantes, con forma estrellada irregular, pequeñas y que están asociadas con los cuerpos de las neuronas, son derivadas de precursores gliales originados de la cresta neural que colonizan el tracto intestinal en el estado embrionario y que en estado embrionario avanzado ya se diferencian a glía (Jessen y Mirsky, 1980). Las células de la glía entérica expresan marcadores o proteínas específicas de células gliales como proteína glial fibrilar ácida (GFAP) y requiere de neuregulina para señalizar vía el receptor ErbB3 cuando son inmaduras; al alcanzar la madurez expresan además vimentina (proteína de filamentos intermedios), conexina 43 (Cx43) proteína que forma parte de los hemicanales, S100 $\beta$  proteína que une calcio y expresan algunas moléculas no astrocíticas como Sox8,9 y Sox10 que actúan como factores de transcripción propio de oligodendrocitos (Ferri y cols., 1982; Gershon, 2011; Grubišić y Gulbransen, 2016; Jessen y Mirsky, 1983; Lake y Heuckeroth, 2013). Las células de la glía entérica expresan además algunos subtipos de receptores purinérgicos, colinérgicos, catecolaminérgicos, glutamatérgicos y serotoninérgicos entre otros (Boesmans y cols., 2013; Gulbransen y Sharkey, 2012; Jessen y Mirsky, 1983). Entre sus funciones, entre tiene un papel activo con los circuitos neurales que controlan motilidad y secretan factores que son importantes para la diferenciación, adhesión, migración y proliferación de las células epiteliales así como para la regulación de la función de barrera intestinal (Coelho-Aguiar y cols., 2015; Grubišić y Gulbransen, 2016; Gulbransen y Sharkey, 2012; Jessen y Mirsky, 1983; Sharkey, 2015).

### **1.2.2.3. Glía satélite**

El SNP no solo está formado de fibras nerviosas, incluye ganglios que pueden ser divididos en sensoriales y autonómicos, y en estos ganglios se encuentran los cuerpos de las neuronas y un tipo especializado de células gliales, las células de glía satélite (SGC) que rodean las neuronas de ganglios sensoriales, simpáticos y parasimpáticos, cada una de las neuronas de estos ganglios se encuentra rodeada por más de una SGC y constituyen una distinta unidad funcional (Pannese, 1981). Las SGC se encuentran conectadas entre ellas por uniones comunicantes y adhesivas y separadas de las vecinas por tejido conectivo (Pannese, 1981; Pannese, 2010).

Las SGC se derivan de las células pluripotentes de la cresta neural (como las células de Schwann), su morfología es laminar, de forma irregular que no tiene procesos, son mononucleares (Hanani, 2005). Cada neurona sensorial está envuelta con su o sus propias células de glía satélite y hasta la porción proximal del axón, en los ganglios autonómicos simpáticos y parasimpáticos las neuronas también están envueltas en SGC, pero esta glía también rodea las terminales axónicas que hacen contacto sináptico con los somas de las neuronas ganglionares (Hanani y cols., 1999). La función de las SGC es la de mantener las características fenotípicas de las neuronas ganglionares. Cada cuerpo neuronal está rodeado de SGC conformando una unidad distinta morfológica y funcionalmente (Costa y Neto, 2015; Hanani y cols., 2002). Las SGC están conectadas entre sí por uniones comunicantes y adhesivas, fisiológicamente se comportan como los astrocitos de SNC, comparten con estas la regulación de la concentración de iones del espacio extracelular y el reciclamiento de neurotransmisores ( Hanani, 2005; Huang y cols., 2013). La distancia entre la célula glial y la neurona que envuelve es de aproximadamente 20nm, pero aun cuando están cercanas existe el intercambio de moléculas entre ambas células y una mínima cantidad de estas sustancias podría llevar un gran cambio, pero volúmenes pequeños hacen más efectivo el control del ambiente extracelular entre ambas células (Hanani, 2010).

El grosor de la envoltura de SGC es altamente variable y puede ir de una simple capa o hasta diez capas, cada capa tiene un grosor de 0.1 $\mu$ m y puede envolver algunas sinapsis axo-dendríticas muy cercanas al soma de la neurona y sinapsis axo-somáticas (Hanani, 2010) . Se ha sugerido que las SGC están involucradas en el mantenimiento y remodelación de las sinapsis, en la regulación de iones y el reciclamiento de neurotransmisores (Costa y Neto, 2015; Hanani, 2005, 2010; Pomeroy y Purves, 1988); en

la nutrición neuronal, en la homeostasis y en los procesos apoptóticos (Siemionow, y cols., 2009). Los diferentes marcadores de las SGC incluyen GFAP, glutamina sintetasa (GS), S100 $\beta$ , vimentina, canales de potasio tipo Kir4.1, receptores P2Y, P2X<sub>7</sub>, péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), sustancia P, receptores de citoquinas y quimiocinas (TNF $\alpha$ , IL-1 y endotelina-B) y receptores NMDA y transportadores de GABA (Callahan y cols, 2008; Costa y Neto, 2015). El ATP parece ser un mediador entre las neuronas y las células gliales, y expresan el receptor nicotínico para acetilcolina (Hanani, 2010).

### **1.3. Sistema nervioso y experiencia reproductiva**

El repertorio funcional del SNA tiene un papel esencial en la regulación, integración y orquestación de los procesos entre los diversos sistemas fisiológicos. Los sistemas simpático y parasimpático trabajan en conjunto para regular las funciones viscerales como la respiración, funciones cardiovasculares, digestivas y endócrinas. El sistema nervioso simpático inerva muchos órganos blanco que son tónicamente activos regulando de forma selectiva los niveles y frecuencia de respuesta de los órganos que controla. El sistema nervioso parasimpático inerva múltiples órganos y sistemas y juega un importante papel en la regulación de las funciones fisiológicas, tiene proyecciones extensas pero que no afectan sus funciones en el control del sistema cardiovascular, en el control de la musculatura del ojo, en la función de glándulas en la cabeza como las salivales o lacrimales, en los sistemas digestivo y broncopulmonar, ni en el control de las funciones renales y pélvicas (Kenney y Ganta, 2014; Taylor y cols., 2014).

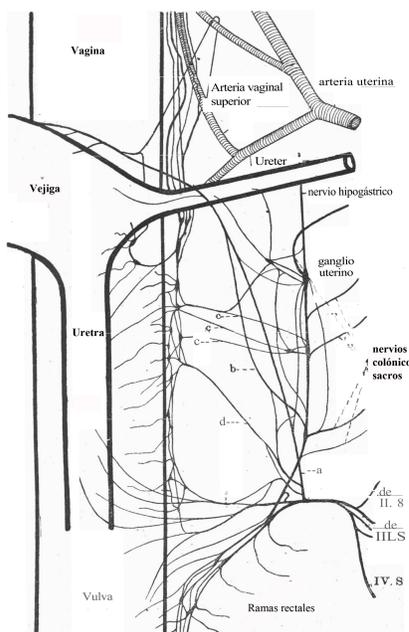
Las neuronas preganglionares del Sistema Nervioso Autonomo parasimpático o sistema cráneo-sacral, están localizadas en los núcleos de los nervios craneales III, VII, IX y X y en la materia gris intermedia de los nervios sacroespinales S2 a S4 y finalizan en los ganglios viscerales o intramurales, cerca de los órganos que innervan. Estas neuronas preganglionares utilizan acetilcolina (ACh), como principal neurotransmisor en las sinapsis ganglionar, activando receptores nicotínicos y permitiendo una respuesta rápida. Las neuronas postganglionares también utilizan ACh pero éste neurotransmisor se une a receptores muscarínicos en el tejido blanco (Catala y Kubis, 2013; Furness, 2006).

Los ganglios pélvicos contienen una mezcla de neuronas postganglionares simpáticas (mayoritariamente noradrenérgicas) y parasimpáticas (colinérgicas); en la mayoría de los mamíferos, forman un plexo que se distribuye a los órganos pélvicos, en los roedores las neuronas se concentran en un ganglio que inerva una proporción de los órganos pélvicos. Tanto en aves como en mamíferos estas neuronas simpáticas y parasimpáticas del plexo pélvico se originan en las células de la cresta neural sacral (Furness, 2006; Young y cols., 2011)

La plasticidad es una propiedad intrínseca del sistema nervioso que le confiere la capacidad de reorganización estructural y/o funcional en respuesta a estímulos internos y externos recibidos a lo largo de la vida de un individuo. Puede ocurrir a nivel central y periférico permitiéndole conseguir adecuadamente las conexiones entre neuronas y efectores como músculos y glándulas. Esta propiedad es particularmente importante ya que permite la adaptación del sistema nervioso periférico de acuerdo con el crecimiento y las distintas etapas del desarrollo de los organismos. Entre estas últimas, la experiencia reproductiva de las hembras de mamíferos implica una serie de cambios corporales transitorios que ponen a prueba la plasticidad del sistema nervioso periférico.

## 2. ANTECEDENTES

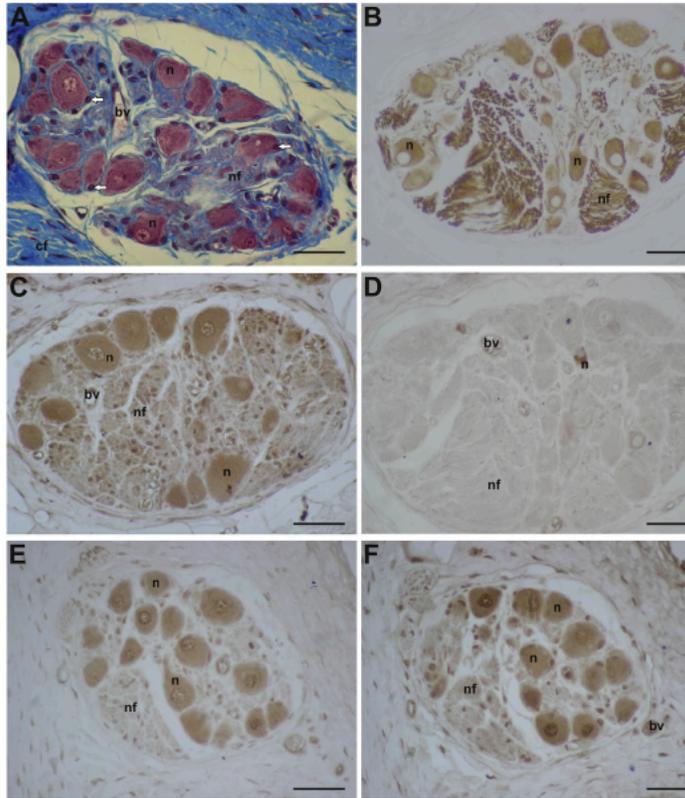
La mayor parte de la innervación autonómica del aparato urogenital proviene del plexo pélvico, formado por nervios y ganglios adosados a las vísceras pélvicas ( Keast, 2006). En la mujer esta plexo se conoce como plexo hipogástrico inferior mientras que en la gata, la coneja y la perra se denomina plexo pélvico (Dail, 1996; Imai y cols., 2006; Langley y Anderson, 1896; Li y Masuko, 2001). Especies de roedores como la rata y el ratón se caracterizan por la presencia de agrupaciones ganglionares macroscópicas, como el ganglio pélvico principal en la rata macho y el ganglio paracervical en la rata hembra (Dail 1996). De manera general, los ganglios del plexo pélvico se conocen como ganglios pélvicos. Estos reciben conexiones de los segmentos sacros de la médula espinal (a través del nervio pélvico en animales y del esplácnico en el humano) y de los segmentos lumbares (a través del nervio hipogástrico) como se muestra en la Figura 5. Por lo tanto, son ganglios mixtos que contienen neuronas simpáticas y parasimpáticas. Algunos de ellos están adosados o dentro del órgano blanco y de ahí reciben su nombre (Jobling, y cols., 2014), como el ganglio vesical, el ganglio prostático, el ganglio paracervical y los ganglios paravaginales, estos últimos en el tejido adventicio adosado a la pared dorsolateral de la vagina en el galago (Kanagasuntheram y Verzin, 1964) y el conejo (Langley y Anderson, 1896).



**Figura 5.** Esquema del plexo pélvico de la coneja a) rama vesical, b) fibra vesical c) nervio pélvico d) filamentos posteriores del nervio pélvico. S) fibras provenientes de la raíz dorsal de las vertebrales sacras (Tomada de Langley y Anderson, 1896).

La mayoría de las neuronas pélvicas son colinérgicas o noradrenérgicas y solo una minoría de ellas expresan ambos o ninguno de ellos (Jobling y cols., 2014). Además de estos dos neurotransmisores, las neuronas pélvicas sintetizan o almacenan otros neuromoduladores. En general, las neuronas pélvicas noradrenérgicas expresan el neuropéptido Y (NPY), mientras que las colinérgicas expresan el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y la sintetasa del óxido nítrico y algunas otras utilizan ATP como neurotransmisor (Jobling y cols., 2014). El patrón de expresión de esos neurotransmisores puede variar en función del género y la especie, por ejemplo el NPY se expresa en todas las neuronas simpáticas y parasimpáticas que inervan vejiga y recto, pero no expresan somatostatina que si la expresan las neuronas de los cobayos y los cerdos (Keast, 2006). Además existen diferencias en el tamaño y forma, mientras en el ganglio pélvico de la rata, sus neuronas noradrenérgicas son mucho más grandes que las colinérgicas, para lo que no se ha encontrado una clara explicación, en tanto que la forma de éstas es mayormente monopolar, en tanto que en cobayo donde si existe un plexo muchas de sus neuronas tienen dendritas (Hondeau y cols, 1995; Kanjhan y cols., 2003; Keast, 1995) .

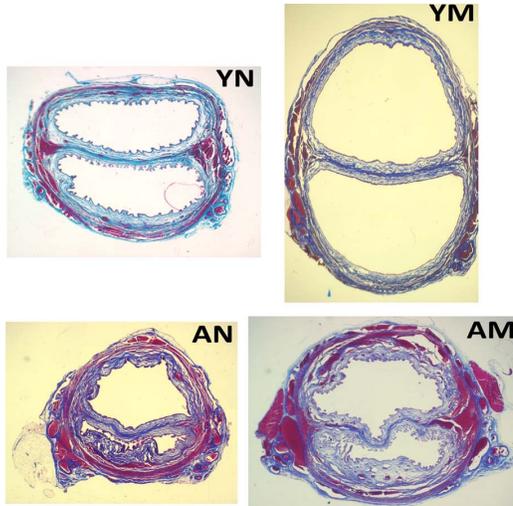
En nuestro grupo de investigación hemos observado consistentemente nervios y ganglios en el tejido paravaginal dorsolateral de la coneja (Castelán y cols., 2013). Los ganglios paravaginales forman parte del plexo pélvico (Langley y Anderson, 1896). Frecuentemente se observan con formas circulares y ovales, aunque en ocasiones tienen una forma de bastón. Con prolongaciones citoplásmicas escasas, la mayoría de las neuronas ganglionares son de tamaño diverso, y presentan forma poligonal u ovoide. Los núcleos de las células de la glía satelital ganglionar se observan alrededor de los somas de las neuronas y en el espacio entre estos. La inmunoreactividad anti- $\beta$ -tubulina III evidencia axones cortados transversal y longitudinalmente. Los ganglios paravaginales contienen neuronas noradrenérgicas presentando inmunoreactividad positiva para tirosina hidroxilasa y colinérgicas que muestran inmunoreactividad positiva para acetilcolina transferasa, siendo estas últimas las que predominan (Fig. 6) (Castelán y cols., 2013).



**Figura 6.** Fotografía que muestra ganglios paravaginales que forman parte del plexo pélvico de la coneja en el panel A se muestra una tinción tricrómica de Masson, en el panel B se observan las neuronas que son inmunoreactivas a  $\beta$ -Tubulina III; en el panel C se pueden observar las neuronas parasimpáticas que son reactivas a Acetil Colina Transferasa y en el panel D se observan aquellas neuronas que son simpáticas, correspondientes a las inmunoreactivas a Tirosina Hidroxilasa; y en el panel E y F se muestra inmunoreactividad a receptores de Estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente (Tomada de Castelán y cols., 2013)

La experiencia reproductiva produce cambios en los ganglios paravaginales, particularmente en aquellos localizados alrededor de la desembocadura uretral en la vagina pélvica (Castelán y cols., 2013). Datos obtenidos por nuestro grupo de investigación muestran que la multiparidad, después de cuatro partos consecutivos, promueve un desarreglo en la matriz extracelular y contenido de colágeno de los ganglios paravaginales (Fig. 7), el área de las neuronas ganglionares es mayor en comparación con la de conejas vírgenes y lo mismo se observó para los nervios localizados en el mismo campo que los ganglios (Xelhuantzi y cols., 2014). De manera interesante, se encontró un 30% menos de neuronas ganglionares en los ganglios de las conejas múltiparas de la misma edad (Castelán y cols., 2013). La gestación y el parto afectan la morfología de las neuronas ganglionares.

Se ha reportado 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 pero que tanto el área del soma de la neurona así como el área ganglionar es menor (Castelán y cols., 2013).



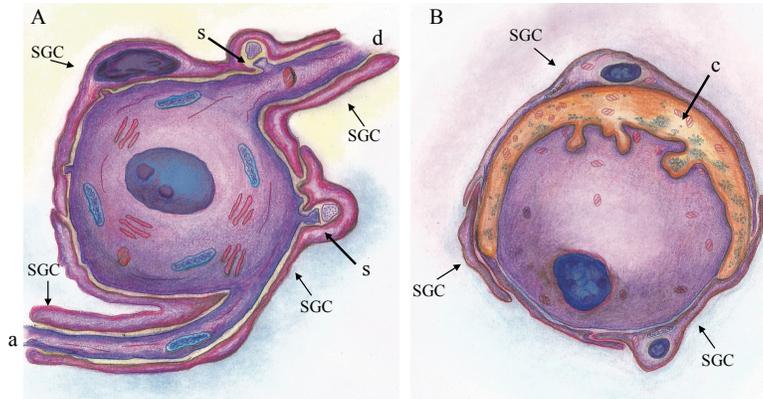
**Figura 7.** Fotografía representando las características histológicas de un corte cranial uretral de la vagina pélvica de las conejas. Nomenclatura **Y** para jóvenes **A** para adultas mayores, **N** para nulíparas y **M** para múltiparas (Modificada de Xelhuantzi y cols., 2014).

En un modelo artificial en el cual se utilizaron conejas ovariectomizadas y ovariectomizadas con reemplazo hormonal se observó que el área del ganglio es menor en el grupo ovariectomizado con respecto al grupo control y el reemplazo hormonal no revierte tal efecto; para el área del soma de las neuronas también se observó una disminución en el grupo ovariectomizado con respecto al grupo control y este parámetro es revertido con el reemplazo hormonal. Dado que las neuronas paravaginales expresan receptores de estrógenos (RE) de los subtipos alfa y beta es posible proponer que esta plasticidad morfométrica está relacionada con la sensibilidad estrogénica neuronal. Sin embargo, las células de la glía satélite también podrían estar involucradas ya que son igualmente sensibles a estrógenos y, al parecer, su respuesta podría estar relacionada con la expresión de factores neurotróficos capaces de influir en la plasticidad morfométrica de los ganglios paravaginales (observaciones preliminares).

Las células de glía satélite, son células laminares, de forma irregular, generalmente mononucleares, no presentan procesos como tal, se encuentran envolviendo a las neuronas

en los ganglios, estas envolturas de varias células de glia satélite forman capas continuas que rodean a una neurona y forman una unidad morfológica y funcional (Fig.8) (Siemionow y cols., 2009). Las células satélite expresan glutamina sintetasa (GS), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteínas S100, receptores para endotelinas, receptores a bradikinina, receptores PY2, receptores a NGF, receptores a acetilcolina, receptor a eritropoyetina, transportadores de GABA y de Glutamato (Hanani, 2005). Al estar alrededor de las neuronas permitirían un mayor aislamiento de las neuronas para los cambios que pudieran tener lugar en el ambiente circundante ( Hanani, y cols., 1999). GFAP ha sido usado como un indicador de respuesta de las células gliales a daño en el SNC (Gonca y cols., 2005) y su expresión aumenta en procesos de inflamación en las células de glia satélite de los ganglios de la raíz dorsal, indicando el papel de las SGC en la recuperación después de una lesión, en algunos modelos animales de dolor, sobre todo en roedores se ha visto que las lesiones por axotomía, inflamación o constricción no solo se induce cambios en las neuronas sino también en las SGC (Costa y Neto, 2015; Siemionow y cols., 2009).

En los ganglios espinales de conejos la relación cuantitativa entre neuronas y SGC está altamente controlada a lo largo de la vida, sugiriendo que las neuronas liberan señales que influyen en el volumen de sus SGC asociadas, como estas tiene un papel muy importante en el soporte metabólico de las neuronas que rodean, se ha observado que una reducción en el volumen de estas SGC en la edad avanzada, acompañada de una reducción en las funciones que juegan, con consecuencias negativas para la actividad neuronal (Martinelli, y cols., 2006).



**Figura 8.** Esquemas representando neuronas rodeadas con células de glia satélite (SGC) en el panel **A** ganglio simpático (a) axón (d) dendrita (s) sinapsis, en el panel **B** ganglio parasimpático (c) calix (modificado de Hanani 2010).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Las células gliales son importantes en el desarrollo del sistema nervioso y en la formación de contactos sinápticos o en la remodelación sináptica (Pomeroy, y cols., 1996), pero su papel en los ganglios autonómicos no es entendido, por lo que resulta pertinente estudiarlas en procesos de cambios estructurales de estos ganglios.

#### **4. HIPÓTESIS**

La experiencia reproductiva modifica el número de células de la glía satélite asociadas con las neuronas paravaginales de la coneja.

## **5. OBJETIVO**

### **5.1 Objetivo General**

Determinar la influencia que la experiencia reproductiva ejerce sobre las células de la glía satélite localizadas en los ganglios paravaginales de la coneja.

### **5.2 Objetivos particulares**

**5.2.1.** Establecer las condiciones experimentales para identificar las células de la glía satélite de los ganglios paravaginales mediante marcaje inmunohistoquímico.

**5.2.2.** Cuantificar el número de células de la glía satélite asociadas con las neuronas paravaginales en conejas nulíparas, gestantes y primíparas.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1 Animales y grupos**

Se utilizaron conejas (*Oryctolagus cuniculus*) de la raza Chinchilla de 6 meses de edad, que fueron mantenidas en el bioterio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Las conejas fueron alojadas 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) y se alimentaron con croquetas (Conejina Purina) y agua *ad libitum*. Se tuvieron 3 grupos (n=6, c/u): conejas vírgenes (V); conejas gestantes a término (G) y primíparas de 3 días posparto (P3). El uso y manejo de estos animales para experimentación fué aprobado por la Comisión de Bioética sobre el Uso de Animales de Laboratorio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

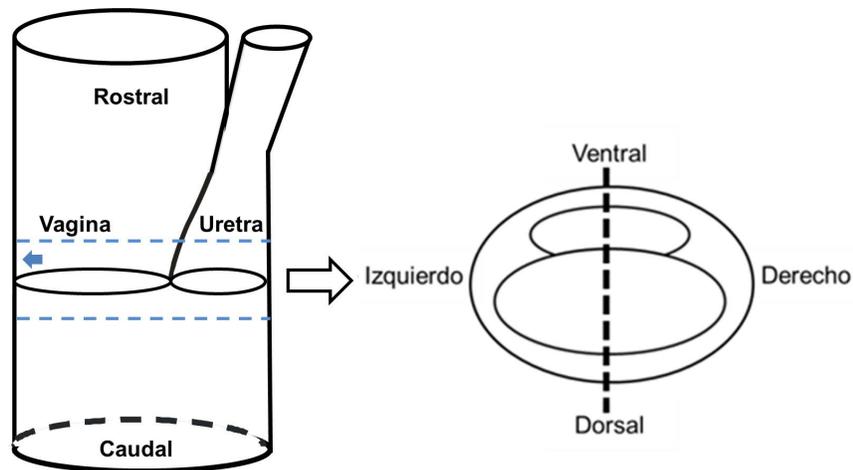
### **6.2 Condición fisiológica**

Las conejas gestantes y primíparas tuvieron su primera cópula (día 0 de gestación) a los seis meses de edad con machos de la colonia, durante 30 minutos. Las conejas vírgenes fueron sacrificadas a los 7.5 meses de edad, la edad promedio de las conejas gestantes y primíparas. Las conejas de los tres grupos fueron sacrificadas con pentobarbital sódico (100 mg / Kg de peso, i.p.).

### **6.3 Obtención de la vagina pélvica**

Una vez sacrificadas se realizó la disección de la vagina pélvica, se hizo una incisión sobre la línea media, desde la cavidad abdominal hasta la vagina perineal. De acuerdo con el protocolo descrito por Rodríguez-Antolín y cols. (2009), los músculos abdominales y el tejido adiposo del área fueron removidos. Después se removieron los huesos isquion y pubis, así como los músculos obturadores externos e internos. Se ligaron las venas y arterias que irrigan al plexo venoso para evitar hemorragias y se extrajo el segmento pélvico de la vagina. Usando la desembocadura uretral como referencia se cortó el segmento vaginal pélvico comprendido 3 cm en dirección craneal y 3 cm en dirección

caudal. De este segmento se obtuvo la vagina pélvica y se cortará longitudinalmente. Considerando que no existen diferencias significativas en el número de neuronas ganglionares del fragmento derecho e izquierdo, se utilizará el primero para cumplir los objetivos particulares que requieren de la técnica histológica (Figura 9; Castelán y cols. 2013).



**Figura 9.** Esquema que representa la incisión en la vagina para la obtención de los fragmentos, modificado de Castelán y cols. 2013).

#### 6.4 Análisis histológico

La vagina pélvica se sumergió en fijador de Bouin-Duboscq durante 24 h. Posteriormente, el tejido fué deshidratado con etanol de concentración ascendente (70, 80, 96 y 100%), aclarado en xileno e incluido en parafina para obtener cortes transversales (7  $\mu$ m) en un microtomo, que fueron recolectados formando series de 3 en portaobjetos preparados con poli-lisina. 10 cortes (seleccionando cinco de cada 10 en la serie) en dirección craneal y otros 10 en dirección caudal, considerando la desembocadura uretral como punto de referencia.

#### 6.5 Inmunohistoquímica

Con el fin de establecer la identidad de las SGC en las neuronas paravaginales, se empleó el anticuerpo anti-GFAP (sc-6170) Santa Cruz Biotech. Después de desparafinizar y hacer la re-exposición de los antígenos, los cortes del conducto vaginal fueron incubados con una solución de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 3% en PBS 0.1 M pH 7.4 durante 30

min. A continuación, se incubaron con una solución 5% de suero normal de burro (NDS) en 0.3 % de tritón x-100 en PBS, durante 1 hora, para bloquear uniones inespecíficas.

Posteriormente, los cortes se incubaron con el primer anticuerpo (anti-GFAP 1:100) diluido en una solución de 0.3 % triton x-100 en PBS, durante 72 horas a 4°C. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-IgG biotinilado) diluido 0.3 % triton x-100 en PBS, durante 2 h a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación del anticuerpo secundario, los cortes se lavaron con PBS y se incubaron con el complejo avidina-biotina-HRP (ABC Vector) Vector Labs. Burlingame CA.USA, diluido 1:200 en PBS, durante 1 h. Finalmente, se realizó el revelado en una solución de DAB Sigma-Aldrich al 0.05% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.02% en PBS, hasta obtener el marcaje de las células. La reacción se detuvo haciendo varios lavados con PBS 0.1 M. Una vez detenida la reacción se le agregó a los cortes Hematoxilina de Mayer por 5 minutos, una vez terminado este tiempo se enjuagaron con agua corriente. Los cortes fueron deshidratados en alcoholes de 70, 96 y 100%, cubiertos con medio de montaje y un cubreobjetos. Se dejaron secar 24 horas antes de su analisis en microscopio

## **6.6 Inmunofluorescencia**

Para realizar esta técnica primero tomamos un corte de una coneja control, después de desparafinizar y hacer la re-exposición de los antígenos, los cortes del conducto vaginal fueron incubados con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en PBS 0.1 M pH 7.4 durante 30 min. A continuación, se incubaron con una solución 5% de suero normal de burro (NDS) en 0.3 % de tritón x-100 en PBS, durante 1 hora, para bloquear uniones inespecíficas. Posteriormente, los cortes se incubaron con el primer anticuerpo (cabra anti-GFAP 1:100 y anti b-Tubulina III 1:100) diluido en una solución de 0.3 % triton x-100 en PBS, 72 horas a 4°C. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario (IgG anti-cabra conjugado con Alexa Fluor 488 cat. A11055 IgG cabra anti-ratón TRITC zymed) diluido 0.3 % triton x-100 en PBS, durante 2 h a temperatura ambiente. Después, los cortes se lavaron con PBS y se cubrieron con medio de montaje fluoroshield-DAPI sigma cat. F6057 y un cubreobjetos, se sellaron con barniz y se dejaron secar 24 horas antes de su analisis en el microscopio.

## **6.7 Tinción tricrómica de Masson**

Los cortes fueron teñidos con una tinción básica (tricrómica de Masson) ver Anexo 1. Las preparaciones histológicas fueron observadas con el microscopio Nikon Y-TU55 (Nikon, Japón) a 40 aumentos totales. Se tomaron fotografías con una cámara Nikon DS-Ri2 (Nikon, Japón) y estas se utilizaron para contar el número de las células de glía satélite.

## **6.8 Análisis estadístico.**

La cuantificación de las células de glía satélite en el segundo objetivo particular se hizo mediante una prueba ANOVA de una vía seguida de una Newman-Kleus para el número de neuronas analizadas y para identificar las diferencias entre las distribución entre grupos se utilizó una  $\chi^2$ . Con tal fin se usó el programa de análisis estadístico Prism (v.5) para Mac (GraphPad).

## 7. RESULTADOS

### Análisis cualitativo

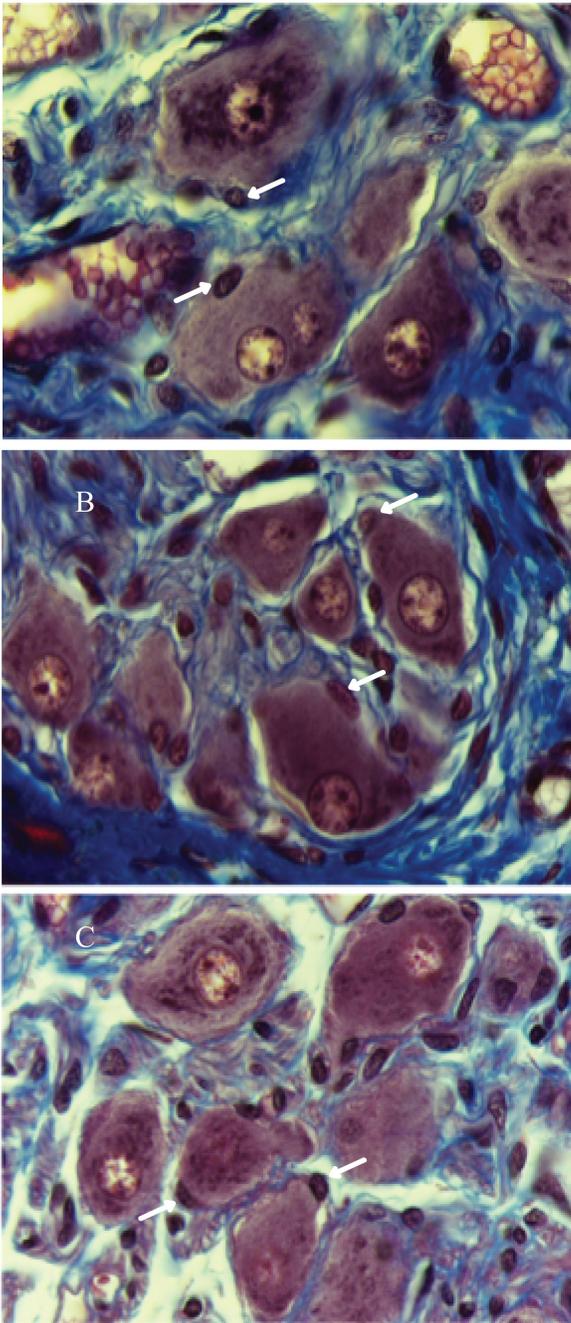
Se realizaron diferentes métodos de tinción para tratar de establecer el más adecuado para contar las SGC en los ganglios paravaginales de la coneja. En este primer apartado se mostrarán los resultados obtenidos para el establecimiento de las condiciones experimentales para identificar las SGC. En la Figura 10 se muestran las células teñidas con la tinción tricrómica de Masson. Como puede observarse en la imagen pueden distinguirse los núcleos de las células SGC teñidos en café, y aun cuando los somas no se distinguen, tomando los núcleos como referencia pudimos contar en 40X el número de SGC que rodean a las neuronas en los ganglios paravaginales.

Nuestro siguiente intento fue teñir las células de glía satélite de manera fluorescente y para ello utilizamos un anticuerpo para identificar vimentina y como puede observarse en la Figura 11, existe una mejor señal. Sin embargo no es posible distinguir el número de células gliales que rodean a cada neurona. Por otro lado, el marcaje anti-vimentina también se observa en capilares.

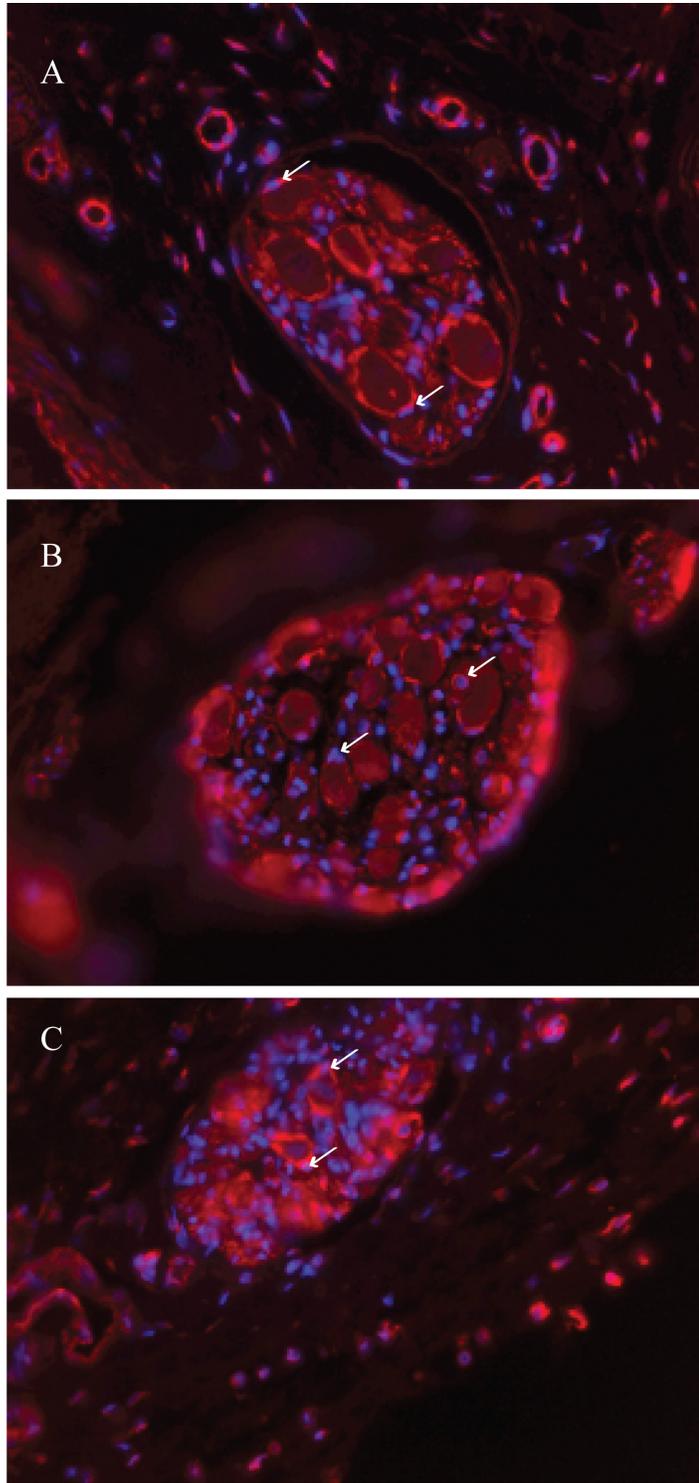
Tratando de obtener una mayor información, realizamos el marcaje inmunohistoquímico, utilizando el anticuerpo anti-GFAP. La inmunorreactividad anti-GFAP (Fig. 12) se observó alrededor de las neuronas, revelando la presencia de células de la glía satélite (Figura 13).

En la Figura 14 se observa el marcaje anti-GFAP (revelado con un anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína) en ganglios paravaginales de coenjas del grupo control así como el marcaje anti- $\beta$ -tubulina III (revelado con un anticuerpo secundario acoplado con Texas Red); los núcleos fueron teñidos con DAPI (en azul). Una fotocomposición realizada con la superposición de las tres imágenes tomadas con los tres diferentes filtros para observar en el panel inferior derecho de la figura muestra claramente que el marcaje de GFAP se observa en unas cuantas neuronas indicadas por las flechas blancas, el aumento es de 40X.

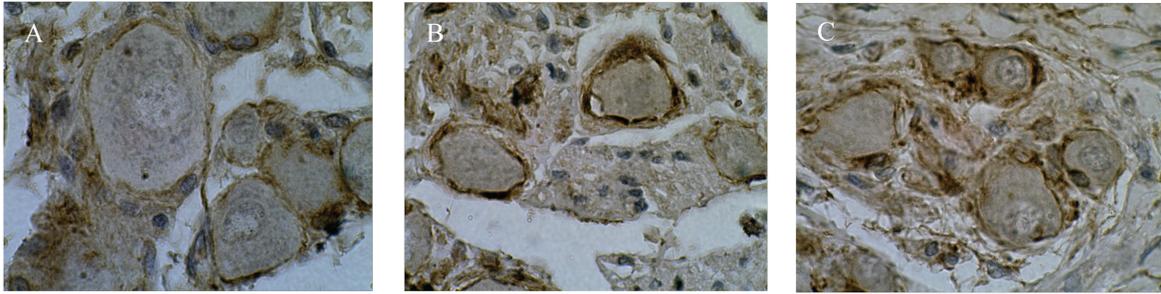
Al examinar el marcaje anti-GFAP en los 3 grupos experimentales se observó una mayor intensidad en el correspondiente a los grupos G y P (Figura X).



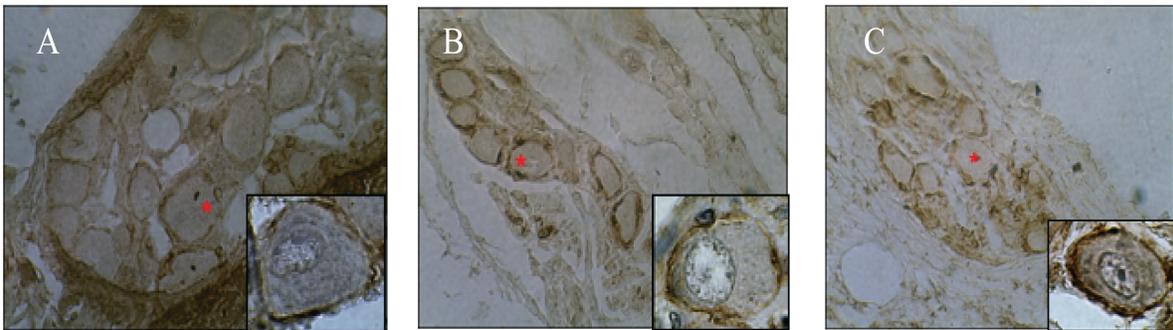
**Figura 10.** Imagen mostrando los núcleos de las SGC marcadas, sus núcleos se observan marcados en café con la tinción tricómica de Masson. en el panel A un neuronas de un ganglio de una coneja control, en el panel B neuronas y SGC de un ganglio de una coneja gestante a término y en el panel C neuronas con SGC de una coneja primípara.



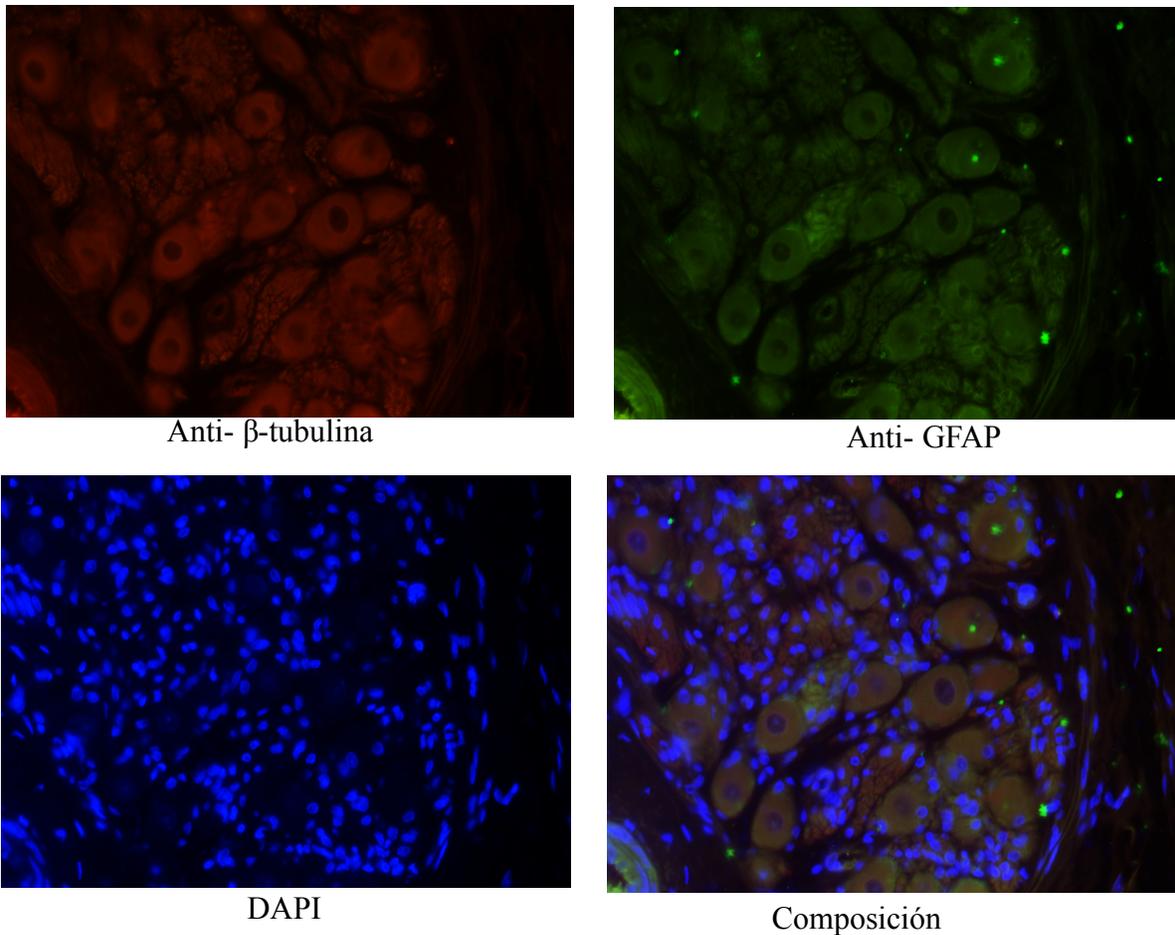
**Figura 11.** Imagen mostrando las SGC marcadas con Vimentina, en el panel A un ganglio de una coneja control, en el panel B un ganglio de una coneja gestante a término y en el panel C el de una coneja primípara.



**Figura 12.** La inmunorreactividad a GFAP revela la presencia de células de la glía satélite (*café*) alrededor de las neuronas. Contratinción, hematoxilina de Mayer. Panel A se representa una imagen de lo observado en el grupo de conejas control, en el panel B de conejas gestantes a término y en el panel C de primípara 3 días post-parto. Magnificación, 100X.



**Figura 13.** Imagen mostrando las SGC marcadas en café y los núcleos en azul a un aumento 40X en el recuadro grande y acercamiento digital en el recuadro pequeño, el asterisco rojo muestra la célula que se ha aumentado. Panel A se representa una imagen de lo observado en el grupo de conejas control, en el panel B de conejas gestantes a término y en el panel C de 3 días post parto

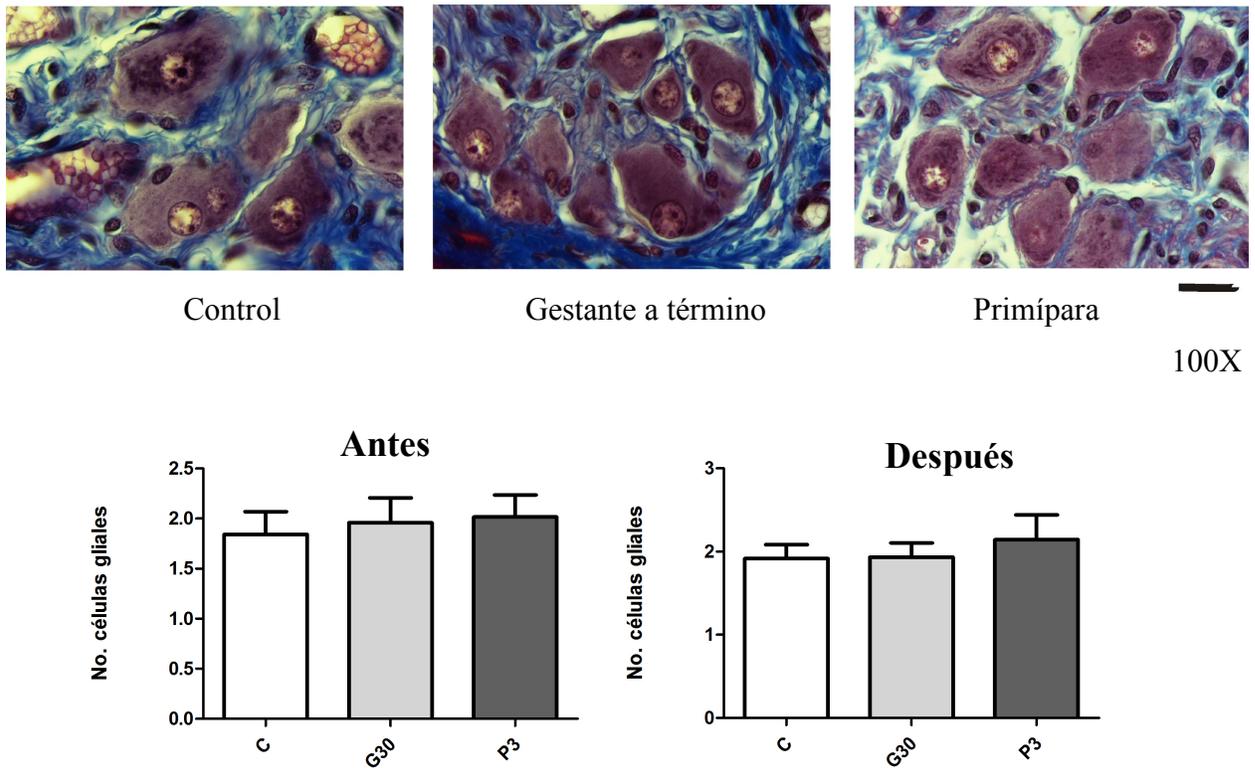


**Figura 14.** Imagen mostrando las SGC marcadas con inmunofluorescencia en el panel superior izquierdo en rojo se marcaron las neuronas con anti- $\beta$  tubulina III, en el panel superior derecho en verde se marcaron a SGC y en el inferior izquierdo se marcaron los núcleos de todas las células. Finalmente en el panel inferior derecho se puede observar una composición de los tres paneles anteriores.

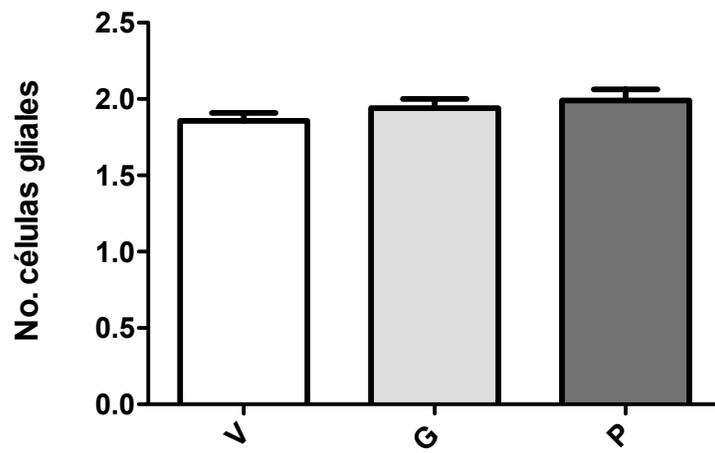
### **Análisis cuantitativo**

Para el conteo de las células de glía satélite se utilizaron los cortes teñidos con tricrómica de Masson. Se contaron los núcleos alrededor de las neuronas ganglionares cuya localización coincidiera con el perímetro del soma neuronal. El análisis se realizó utilizando dos cortes (uno antes y otro después de la desembocadura uretral) por coneja por grupo. Los datos obtenidos mostraron que el número de SGC por neurona es similar entre los grupos C, G30 y P ( $F_{(2,12)}=0.3048$ ; Figura 15). Este resultado fue consistente al hacer el análisis por separado las neuronas localizadas antes ( $F_{(2,12)}=0.1452$ ,  $P>0.05$ ) y después ( $F_{(2,12)}=0.3276$ ; Figura 15) de la desembocadura uretral.

Al analizar 10 cortes, 5 antes y 5 después de la desembocadura uretral en dos conejas de cada grupo experimental, se muestrearon 957 (C), 1012 (G) y 872 somas neuronales. La Figura 16 representa la distribución de frecuencia de neuronas asociadas con  $<2$ ,  $=2$  y  $>2$  SGC. Mientras la diferencia entre las distribuciones de los grupos C y G fue estadísticamente significativa ( $\chi^2=6.692$ ,  $P=0.0352$ ), no hubo diferencia entre la de los grupos C y P ( $\chi^2=5.412$ ,  $P=0.0668$ ) ni entre la de los grupos G y P ( $\chi^2=0.114$ ,  $P=0.9446$ ).



**Figura 15.** El promedio de número de SGC con respecto a las neuronas analizadas no presenta algún cambio en la localización de los ganglios, tomando como referencia el orificio donde se une la uretra. Los datos representan la media [más-menos] SEM (n = 6 por grupo).



**Figura 16.** Proporción de neuronas rodeadas por diferente número de células de glía satélite del grupo control (V), gestantes (G) y primíparas (P).

## 7. DISCUSION

Los hallazgos de esta tesis demuestran que la plasticidad del área del soma de las neuronas paravaginales (Castelán y col. 2013) está relacionada con alteraciones que involucran a las SGC. Por un lado, la gestación incrementó la intensidad del marcaje anti-GFAP e incrementó la proporción de SGC por neurona. Mientras que la intensidad del marcaje anti-GFAP persistió en las conejas primíparas en comparación con el grupo C, la proporción de SGC por neurona fue restablecida.

Con el fin de identificar a las SGC se utilizaron 2 marcajes inmunohistoquímicos (anti-vimentina y anti-GFAP) y la tinción tricrómica de Masson. Los dos primeros son considerados marcadores de células gliales (Castelán y cols. 2013, Johnson y cols. 2016, Pérez-Sala y cols. 2015). El patrón de distribución de la inmunorreactividad correspondiente, localizada en la periferia de las neuronas paravaginales, apoyan su utilidad como marcadores de SGC. Vimentina es una proteína estructural que pertenece al tipo III de filamentos intermedios, esta proteína juega un papel clave en la arquitectura como parte de la red de citoesqueleto, con filamentos sólidos que se extienden de la periferia del núcleo a la membrana celular; determinando la morfología celular, las propiedades de resistencia mecánica de la célula (Pérez-Sala y cols., 2015; Robert, y cols., 2015). Vimentina no solo tiene función estructural, su participación es clave en el posicionamiento de los organelos, adhesión y migración celular, así como en la señalización participando en la modulación de la cascada de las MAP cinasas (MAPK), está involucrada en la transición epitelial-mesenquimal explicando la expresión de vimentina en células mesenquimales, se puede encontrar en células que forman vasos sanguíneos, fibroblastos, células ependimales y astrocitos (Pérez-Sala y cols., 2015; Schnitzer, Franke, y Schachner, 1981). No obstante, el marcaje anti-vimentina también se identificó en capilares dentro y en el exterior de los ganglios. De tal manera que el marcaje se utilizó sólo con fines de caracterización de SGC.

En contraste, el marcaje anti-GFAP se identificó exclusivamente en el perímetro externo a la neurona paravaginal, en una relación cercana con los núcleos satélite que rodean al soma neuronal. Nosotros utilizamos el marcaje de GFAP por inmunofluorescencia para asegurarnos que estábamos observando solo células de glía satélite en los ganglios paravaginales. En la Figura 12 se puede observar que esta expresión es muy baja en los animales control y que su expresión solo se observa en unas cuantas

neuronas, sugiriendo su expresión basal. En el contexto de marcadores neuroquímicos relevantes para identificar SGC de ganglios parasimpáticos, la evidencia mostrada en esta tesis y en torno a la coneja discrepa con la información obtenida en la rata (Hanani 2010). Futuros experimentos deben considerar la evaluación complementaria de otros marcadores para caracterizar SGC.

De manera relevante para esta tesis, la intensidad del marcaje anti-GFAP fue diferente entre las conejas control, gestantes y primíparas. El análisis cualitativo realizado mostró una mayor intensidad del marcaje anti-GFAP que envuelve las neuronas paravaginales de las conejas gestantes en comparación con el de las conejas controles. Y lo mismo se observó aún en las conejas primíparas. Este hallazgo es consistente con la reactividad glial reportada en otros componentes del sistema nervioso, particularmente en el periférico (Hanani 2010). Puesto que esta respuesta ocurre en una simultaneidad temporal con la reducción transitoria del área del soma neuronal, es posible especular acerca de una interacción que adapta la función de la SGC a un soma neuronal reducido. Puesto que la ubicación de SGC en la vecindad del soma neuronal está en estrecha relación con la densidad de contactos sinápticos (Pomeroy y Purves 1988, Purves, Augustine y Fitzpatrick 2004), es posible sugerir que la actividad de las SGC estaría involucrada en el mantenimiento de contactos sinápticos. Estas propuestas deben ser abordadas en futuros experimentos y utilizando una aproximación metodológica adecuada.

En los ganglios simpáticos, parasimpáticos y sensoriales cada una de las neuronas se encuentra rodeada por SGC formando unidades funcionales, esta asociación no se encuentra en el SNC; similar a la glía del SNC, las SGC son activadas en condiciones de lesión. En previos ensayos, ya se ha demostrado en el SNC que la expresión de GFAP se incrementa en caso de daño (Gonca y cols., 2005). Hanani y cols. ha estudiado las SGC del DRG y se ha observado, un aumento de uniones comunicantes entre las SGC después de la lesión nerviosa (Hanani, y cols., 2002; Huang, Gu, y Chen, 2013). Semionow, mostró un cambio en la expresión de GFAP cuando ocurre una inflamación de DRG, esta expresión de GFAP se incrementa, y este aumento se observa en mayor número de SGC. Esta característica común, en la expresión de GFAP, puede ser de alguna manera aprovechada en la observación sobre los cambios de SGC en las condiciones de gestación y primiparidad con respecto al control. En condiciones normales la expresión de GFAP en

SGC es baja y en el caso de una lesión axonal existe un cambio en la neurona y esto hace que las SGC circundantes se activen (Figuras 10 y 11)

No obstante la utilidad de los marcajes anti-vimentina y anti-GFAP para identificar SGC, ninguno de ellos permitía estimar el número de SGC por cuerpo neuronal. Por lo anterior, se utilizó una tinción histológica para evidenciar los núcleos que rodean el perímetro de cada neurona (Purves y col. 1991). En este trabajo se utilizó la tinción tricrómica de Masson; esta fue utilizada anteriormente por nuestro grupo de trabajo para evaluar el área del soma neuronal (Castelán y col. 2013).

Utilizando la tinción tricrómica de Masson se pueden observar los núcleos en marrón de las SGC o lilas y el citoplasma en rojizo mientras que las fibras de colágena se verán en azul. Con la finalidad de contar las SGC se trató de utilizar un aumento en el que pudiera verse el ganglio completo o al menos la mayoría de las neuronas, aunque para contar las SGC de cada neurona se hicieran composiciones de las fotografías de los ganglios muy grandes para no contar o contar dos veces las neuronas en estos, en los que se tuvieron que hacer dos o más fotografías. Por tal motivo se realizaron fotografías a 40X, decidimos probar con una tinción anteriormente utilizada por nuestro grupo para medir a las neuronas y a los ganglios paravaginales en trabajos anteriores que es la tinción tricrómica de Masson. Como pudo observarse en la figura 10 esta tinción no permitió diferenciar entre las neuronas y el número exacto de las SGC que están alrededor, pero sí nos permitió identificar los núcleos de las SGC que se tiñen en café y que están alrededor de las neuronas, considerando estos núcleos como una forma para distinguir las SGC que rodean a las neuronas, utilizando esta tinción pudimos obtener el número de SGC que se encuentran alrededor de las neuronas de los ganglios paravaginales.

Al analizar dos cortes por coneja por grupo, los datos mostraron que el número promedio de SGC por neurona es similar entre conejas controles, gestantes y primíparas. De manera interesante, el promedio de alrededor de 2 SGC por neurona es consistente con estudios previos realizados en ganglios parasimpáticos de roedores adultos (Pomeroy y cols. 1996, Purves, Snider y Voyvodic 1988). Al incrementar la intensidad de muestreo (alrededor de 1000 neuronas paravaginales) se encontró que el número de SGC que interactúa con el soma de la neurona paravaginal es modificado por la experiencia reproductiva (Figura 16). Particularmente, se observó que la gestación incrementó la

proporción de neuronas rodeadas por más de 2 SGC y que este efecto fue revertido en el día 3 postparto. De manera similar a lo observado con la intensidad del marcaje anti-GFAP, estos hallazgos sugieren que la plasticidad del área del soma neuronal (Castelán y col. 2013) está relacionada con cambios en la interacción que involucra SGC y neuronas paravaginales. Al respecto es necesario diseñar experimentos dirigidos a identificar procesos celulares relevantes (p.ej. proliferación, migración, etc.). En este contexto, la propuesta de que el número de SGC por neurona, en ganglios parasimpáticos, se mantiene constante una vez que termina el desarrollo postnatal temprano (Pomeroy et al. 1996), encuentra en la experiencia reproductiva un reto ante el que es posible aún llevar a cabo ajustes.

Castelán y col. (2013) demostraron que la multiparidad disminuye el número de neuronas en el plexo pélvico adosadas a las paredes de la vagina mientras que las gestantes a término presentan una disminución del área del soma neuronal, misma que se recuperaba en el período postparto. Al respecto, propusieron que algunas alteraciones fisiológicas relacionadas con el estado estrogénico podrían estar involucradas. Los presentes hallazgos extienden esta posibilidad a modificaciones que involucran la interacción neurona-SGC en los ganglios paravaginales, en las que ciertamente los estrógenos y otras hormonas alteradas en la gestación y el período postparto. Por otro lado, las posibles alteraciones transitorias en la actividad y densidad de SGC por neurona en ganglios pélvicos podrían significar un nuevo marco teórico para comprender algunas alteraciones pélvicas, como el dolor pélvico crónico.

Mientras que la principal fortaleza de este estudio radica en la identificación de alteraciones que involucran cambios que afectan SGC en ganglios parasimpáticos y bajo un modelo fisiológico, existen también algunas debilidades que deben solventarse en estudios próximos. La primera está relacionada con el muestreo y con el uso de algún método estereológico que haga más robusto el análisis estadístico. Por otro lado, es necesario establecer una correlación entre el área del soma neuronal y el número de SGC que la rodean; esto permitiría aproximarnos a conocer si las afectaciones involucran una subpoblación neuronal. En este contexto, es necesario diseñar experimentos para identificar el fenotipo de las neuronas que modifican su interacción con SGC así como la evaluación de potenciales marcadores de daño/muerte neuronal. Estas perspectivas serían útiles para

conocer la relevancia fisiológica de los cambios que involucran la interacción SGC-neurona en ganglios paravaginales.

## **8. CONCLUSIONES**

La inmunolocalización de vimentina y GFAP revela la localización de las células de la glia satélite de los ganglios paravaginales de la coneja.

La experiencia reproductiva modifica la actividad de las células gliales pero no el número promedio por neurona.

Estos hallazgos sugieren que la interacción neurona-glia es relevante para la plasticidad morfométrica de las neuronas de los ganglios paravaginales de la coneja

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Ainger K, Avossa D, Morgan F, Hill SJ, Barry C, Barbarese E y Carson JH. 1993. Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J Cell Biol* 123: 431–441.

Allen NJ. 2014. Astrocyte regulation of synaptic behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30: 439–63.

Aloisi F, Penna G, Cerase J, Menéndez Iglesias B y Adorini L. 1997. IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes. *J Immunol (Baltimore, Md 1950)* 159: 1604–1612.

Anthony TE, Klein C, Fishell G & Heintz N. 2004. Radial glia serve as neural progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* 41: 881–890.

Armati PJ & Mathey EK. 2013. An update on Schwann cell biology - Immunomodulation, neural regulation and other surprises. *J Neurol Sci* 333: 68–72.

Attwell D, Buchan A, Charkpak S, Lauritzen M, MacVicar B y Newman E. 2011. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468: 232–243.

Auld DS y Robitaille R. 2003. Glial Cells and Neurotransmission. *Neuron* 40: 389–400.

Barbarese E y Pfeiffer SE. 1981. Developmental regulation of myelin basic protein in dispersed cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 1953–7.

Barry DS, Pakan JMP y McDermott KW 2014. Radial glial cells: Key organisers in CNS development. *Int J Biochem Cell Biol* 46: 76–79.

Bayraktar OA, Fuentealba LC, Alvarez-Buylla A y Rowitch DH. 2015. Astrocyte Development and Heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7: a020362.

Boesmans W, Cirillo C, Van den Abbeel V, Van den Haute C, Depoortere I, Tack J y Vanden Berghe P (2013): Neurotransmitters involved in fast excitatory neurotransmission directly activate enteric glial cells. *Neurogastroenterol Motil* 25:2

Bramanti V, Tomassoni D, Avitabile M, Amenta F y Avola R. 2010. Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture. *Front Biosci (Schol Ed)* 2: 558–70.

Buffo A y Rossi F. 2013. Origin, lineage and function of cerebellar glia. *Prog Neurobiol* 109: 42–63.

Bushong E a, Martone ME, Jones YZ y Ellisman MH. 2002. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 22: 183–192.

Cabarrocas J, Savidge TC y Liblau RS. 2003. Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 41: 81–93.

Callahan T, Young HM, Anderson RB, Enomoto H y Anderson CR. 2008. Development of satellite glia in mouse sympathetic ganglia: GDNF and GFR alpha-1 are not essential. *Glia* 56: 1428–1437.

Campbell K y Götz M. 2002. Radial glia: Multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci* 25: 235–238.

Carletti B y Rossi F. 2007 Neurogenesis in the Cerebellum. *Neurosci* 14: 91–100.

Castelán F, Xelhuanzi N, Hernández-Aragón LG, Rodríguez-Antolín J, Cuevas E y Martínez-Gómez M. 2013. Morphometry of paravaginal ganglia from the pelvic plexus: Impact of multiparity, primiparity and pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 170: 286–292.

Catala M y Kubis N. 2013. Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. *Handb Clin Neurol* (1st ed., Vol. 115). Elsevier B.V.

Chanas-Sacre G, Rogister B, Moonen G y LePrince P. 2000. Radial glia phenotype: Origin, regulation, and transdifferentiation. *J Neurosci Res* 61: 357–363.

Chao CC, Hu S, Close K, Choi CS, Molitor TW, Novick WJ y Peterson PK. 1992. Cytokine release from microglia: differential inhibition by pentoxifylline and dexamethasone. *J Infect Dis* 166: 847–53.

Chauvet N, Palin K, Verrier D, Poole S, Dantzer R y Lestage J. 2001. Rat microglial cells secrete predominantly the precursor of interleukin-1beta in response to lipopolysaccharide. *Eur J Neurosci* 14: 609–617.

Chung W, Clarke LE, Wang GX, Stafford BK, Sher A, Chakraborty C, Joung J, Foo LC, Thompson A, Chen C, Smith SJ y Barres BA. 2013. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* 504: 394–400.

Clarke LE y Barres BA. 2013. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci* 14: 311–21.

Coelho-Aguiar J de M, Bon-Frauches AC, Tavares-Gomes AL, Pires-Verissimo C, Pinheiro-Aguiar D, Matias D, Bastos de Moraes-Thomasi B, Souza-Gomes A, De Castro-Britto GA y Moura-Neto V. 2015. The enteric glia: Identity and functions. *Glia* 63: 921–935.

Corell M, Wicher G, Limbach C, Kilimann MW, Colman DR y Svenningsen SF. 2010. Spatiotemporal distribution and function of N-cadherin in postnatal Schwann cells: A matter of adhesion? *J Neurosci Res* 88: 2338–2349.

Costa FAL y Neto FLM. 2015. Satellite glial cells in sensory ganglia: its role in pain. *Brazilian J Anesthesiol* 65: 73–81.

Crawford AH, Tripathi RB, Richardson WD y Franklin RJM. 2016. Developmental Origin of Oligodendrocyte Lineage Cells Determines Response to Demyelination and Susceptibility to Age-Associated Functional Decline. *Cell Rep* 15: 761–773.

Dail WG. 1996. The pelvic plexus: innervation of pelvic and extrapelvic visceral tissues. *Microsc Res Tech* 35: 95–106.

De Juan Romero C y Borrell V. 2015. Coevolution of radial glial cells and the cerebral cortex. *Glia* 63: 1303–1319.

Dimou L y Götz M. 2014. Glial Cells as Progenitors and Stem Cells: New Roles in the Healthy and Diseased Brain. *Physiol Rev* 94: 709–737.

Domingues HS, Portugal CC, Socodato R y Relvas JB. 2016. Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. *Front Cell Dev Biol* 4: 1–16.

Eiraku M, Tohgo A, Ono K, Kaneko M, Fujishima K, Hirano T y Kengaku M. 2005. DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development. *Nat Neurosci* 8: 873–80.

Eric Thomas W. 1992. Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res Rev* 17: 61–74.

Faissner A y Reinhard J. 2015. The extracellular matrix compartment of neural stem and glial progenitor cells. *Glia* 63: 1330–1349.

Ferri G-L, Probert L, Cocchia D, Michetti F, Marangos PJ y Polak JM. 1982. Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature* 297: 409–410.

Furness JB. 2006. The organisation of the autonomic nervous system: Peripheral connections. *Auton Neurosci Basic Clin* 130: 1–5.

Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR y Cho H. 2014. Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease Chapter 17 (817).

Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR y Cho H-J. 2014. The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Adv Exp Med Biol* 817: 39–71.

Gabella G. 1981. Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: The enteric glial cells. *Neuroscience* 6: 425–436.

Garden GA y Campbell BM. 2016. Glial biomarkers in human central nervous system disease. *Glia* 1–17.

Garratt AN, Voiculescu O, Topilko P, Charnay P y Birchmeier C. 2000. A dual role of erbB2 in myelination and in expansion of the Schwann cell precursor pool. *J Cell Biol* 148: 1035–1046.

Gershon MD. 2011. Behind an enteric neuron there may lie a glial cell. *J Clin Invest*.

Glenn TD y Talbot WS. 2013. Signals regulating myelination in peripheral nerves and the Schwann cell response to injury. *Curr Opin Neurobiol* 23: 1041–1048.

Goldman D. 2014. Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nat Rev Neurosci* 15: 431–42.

Gonca S, Filiz S, Dalçik C, Yardimoğlu M, Dalçik H, Yazir Y y Erden BF. 2005. Effects of chronic ethanol treatment on glial fibrillary acidic protein expression in adult rat optic nerve: An immunocytochemical study. *Cell Biol Int* 29: 169–172.

González-Scarano F y Baltuch G. 1999. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 22: 219–40.

Götz M y Huttner WB. 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 777–788.

Grubišić V y Gulbransen BD. 2016. Enteric glia: the most alimentary of all glia. *J Physiol* 0: 1–14.

Gulbransen BD y Sharkey KA. 2012. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9: 625–632.

Halassa MM, Fellin T y Haydon PG. 2007. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* 13: 54–63.

Hanani M. 2005. Satellite glial cells in sensory ganglia: From form to function. *Brain Res Rev* 48: 457–476.

Hanani M. 2010. Satellite glial cells in sympathetic and parasympathetic ganglia: In search of function. *Brain Res Rev* 64: 304–327.

Hanani M, Huang T., Cherkas P., Ledda M y Pannese E. 2002. Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage. *Neuroscience* 114: 279–283.

Hanani M, Maudlej N y Härtig W. 1999. Morphology and intercellular communication in glial cells of intramural ganglia from the guinea-pig urinary bladder. *J Auton Nerv Syst* 76: 62–7.

Harrison JF, Rinne ML, Kelley MR, Druzhyina NM, Wilson GL y Ledoux SP. 2007. Altering DNA base excision repair: use of nuclear and mitochondrial-targeted N-methylpurine DNA glycosylase to sensitize astroglia to chemotherapeutic agents. *Glia* 55: 1416–1425.

Hartfuss E, Galli R, Heins N & Götz M. 2001. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol* 229: 15–30.

Hondeau E, Prud'homme MJ, Rousseau A y 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: 113–125.

Huang LYM, Gu Y y Chen Y. 2013. Communication between neuronal somata and satellite glial cells in sensory ganglia. *Glia* 61: 1571–1581.

Hughes EG y Appel B. 2016. The cell biology of CNS myelination. *Curr Opin Neurobiol* 39: 93–100.

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. *Surg Radiol Anat* 28: 596–605.

Jessen KR. 2004. Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1861–1867.

Jessen KR y Mirsky R. 1980. Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature*. 736–737.

Jessen KR y Mirsky R. 1983. Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. *J Neurosci* 3: 2206–18.

Jessen KR y Mirsky R. 1994. Neural development. Fate diverted. *Curr Biol* 4: 824–7.

Jessen KR y Mirsky R. 2013. Signaling Pathways that Regulate Glial Development and Early Migration - Schwann Cells. *Compr Dev Neurosci Patterning Cell Type Specif Dev CNS PNS* (Vol. 1). Elsevier Inc.

Jessen KR y Richardson WD. 2001. *Glial Cell Development* 19: 368–369.

Jobling P, O'Hara K & Hua S. 2014. Female reproductive tract pain: Targets, challenges, and outcomes. *Front Pharmacol* 5 FEB: 2008–2015.

Johnson K, Barragan J y cols. 2016. Gfap-Positive Radial Glial Cells Are an Essential Progenitor Population for Later-Born Neurons and Glia in the Zebrafish Spinal Cord. *Glia* 64(7):1170-1189.

Kaltschmidt B, Kaltschmidt C y Widera D. 2012. Adult Craniofacial Stem Cells: Sources and Relation to the Neural Crest. *Stem Cell Rev Reports* 8: 658–671.

Kanagasuntheram R y Verzin JA. 1964. The intrinsic nerve supply of the female reproductive organs in the lesser bush baby (*Galago senegalensis senegalensis*). *Acta Anat* 58: 306–16.

Kanjhan R, Osborne PB, Ouyang M & Keast JR. 2003. Postnatal maturational changes in rat pelvic autonomic ganglion cells: a mixture of steroid-dependent and -independent effects. *J Neurophysiol* 89: 315–23.

Karki P, Smith K, Johnson J & Lee E. 2014. Astrocyte-derived growth factors and estrogen neuroprotection: Role of transforming growth factor- $\alpha$  in estrogen-induced upregulation of glutamate transporters in astrocytes. *Mol Cell Endocrinol* 389: 58–64.

Keast JR. 1995. Visualization and immunohistochemical characterization of sympathetic and parasympathetic neurons in the male rat major pelvic ganglion. *Neuroscience* 66: 655–662.

Keast JR. 2006. Plasticity of pelvic autonomic ganglia and urogenital innervation. *Int Rev Cytol* 248: 141–208.

Kenney MJ y Ganta CK. 2014. Autonomic nervous system and immune system interactions. *Compr Physiol* 4: 1177–200.

Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M y Verkhratsky A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91: 461–553.

Kim E y Cho S. 2016. Microglia and Monocyte-Derived Macrophages in Stroke. *Neurotherapeutics*.

Koka P, He K, Zack JA, Kitchen S, Peacock W, Fried I, Tran T, Yashar SS y Merrill JE. 1995. Human immunodeficiency virus 1 envelope proteins induce interleukin 1, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide in glial cultures derived from fetal, neonatal, and adult human brain. *J Exp Med* 182: 941–51.

Kreutzberg GW. 1996. Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19: 312–318.

Kriegstein A y Alvarez-Buylla A. 2011. The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annu Rev Neurosci* 149–184.

Kriegstein A y Alvarez-Buylla A. 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32: 149–84.

Lake JJ y Heuckeroth RO. 2013. Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305: G1-24.

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

Le Douarin NM y Dupin E. 2016. The Pluripotency of Neural Crest Cells and Their Role in Brain Development. *Curr Top Dev Biol* (1st ed., Vol. 116). Elsevier Inc.

Lee S, Leach MK, Redmond SA, Chong SYC, Mellon SH, Tuck SJ, Feng ZQ, Corey JM y Can JR. (2012): A culture system to study oligodendrocyte myelination processes using engineered nanofibers. *Nat Methods* 9: 917–22.

Lee VM, Sechrist JW, Luetolf S y Bronner-Fraser M. 2003. Both neural crest and placode contribute to the ciliary ganglion and oculomotor nerve. *Dev Biol* 263: 176–190.

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: 267–80.

Ma S, Kwon HJ, Johng H, Zang K y Huang Z. 2013. Radial Glial Neural Progenitors Regulate Nascent Brain Vascular Network Stabilization Via Inhibition of Wnt Signaling. *PLoS Biol* 11:.

Malatesta P, Hartfuss E y Götz M. 2000. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127: 5253–5263.

Marina N, Teschemacher AG, Kasparov S y Gourine AV. 2016. Glia, sympathetic activity and cardiovascular disease. *Exp Physiol* 5: 565–576.

Martinelli C, Sartori P, De Palo S, Ledda M y Pannese E. 2006. The perineuronal glial tissue of spinal ganglia. Quantitative changes in the rabbit from youth to extremely advanced age. *Anat Embryol (Berl)* 211: 455–463.

McGeer PL & McGeer EG. 1995. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 21: 195–218.

Mirsky R & Jessen KR. 2009. Schwann Cell Development. *Encycl Neurosci* 1: 463–473.

Morrens J, van den Broeck W y Kempermann G. 2012. Glial cells in adult neurogenesis. *Glia* 60: 159–174.

Nagai a, Nakagawa E, Hatori K, Choi HB, McLarnon JG, Lee M a y Kim SU. 2001. Generation and characterization of immortalized human microglial cell lines: expression of cytokines and chemokines. *Neurobiol Dis* 8: 1057–1068.

Nave KA y Salzer JL. 2006. Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol* 16: 492–500.

Neunlist M, Rolli-Derkinderen M, Latorre R, Van Landeghem L, Coron E, Derkinderen P y De Giorgio R. 2014. Enteric glial cells: Recent developments and future directions. *Gastroenterology* 147: 1230–1237.

Pannese E. 1981. The satellite cells of the sensory ganglia. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 65: 1–111.

Pannese E. 2010. The structure of the perineuronal sheath of satellite glial cells (SGCs) in sensory ganglia. *Neuron Glia Biol* 6: 3–10.

Pellerin L, Bouzier-Sore A-K, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R y Magistretti PJ. 2007. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55: 1251–62.

Perea G, Navarrete M y Araque A. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32: 421–431.

Pérez-Sala D, Oeste CL, Martínez AE, Carrasco MJ, Garzón B y Cañada FJ. 2015. Vimentin filament organization and stress sensing depend on its single cysteine residue and zinc binding. *Nat Commun* 6: 7287.

Perry VH y Gordon S. 1988. Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci* 11: 273–277.

Pomeroy SL y Purves D. 1988. Neuron/glia relationships observed over intervals of several months in living mice. *J Cell Biol* 107: 1167–1175.

Pomeroy SL, Zurakowski D, Khoxayo S, Endara M y Dikkes P. 1996. Postnatal addition of satellite cells to parasympathetic neurons. *J Comp Neurol* 375: 518–25.

Purves D, Augustine GJ y Fitzpatrick D. 2004. Neuroscience. *Nat Rev Neurosci*.

Purves D, Snider WD y Voyvodic JT. 1988. Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature* 336: 123–128.

Rakic P. 1971. Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res* 33: 471–476.

Rakic P. 2003. Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. *Cereb Cortex* 13: 541–549.

Rakic P y Sidman RL. 1973. Weaver mutant mouse cerebellum: defective neuronal migration secondary to abnormality of Bergmann glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70: 240–4.

Rivest S y ElAli A. 2016. Microglia Ontology and Signaling. *Front Cell Dev Biol* 4:.

Robert A, Rossow MJ, Hookway C, Adam S a y Gelfand VI. 2015. Vimentin filament precursors exchange subunits in an ATP-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E3505-14.

Schnitzer J, Franke WW y Schachner M. 1981. Immunocytochemical Demonstration of Vimentin in Astrocytes and Ependymal Cells of Developing Adult Mouse Nervous System. *J Cell Biol* 90: 435–447.

Sharkey KA. 2015. Emerging roles for enteric glia in gastrointestinal disorders. *J Clin Invest* 125: 918–925.

Sidman RL & Rakic P. 1973. Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res* 62: 1–35.

Siemionow K, Klimeczak A, Brzezicki G, Siemionow M y Mclain RF. 2009. The Effects of Inflammation on Glial Fibrillary Acidic Protein Expression in Satellite Cells of the Dorsal Root Ganglion. *Spine* 34(16): 1631–1637.

Stalder AK, Pagenstecher A, Yu NC, Kincaid C, Chiang CS, Hobbs M V, Bloom FE y Campbell IL. 1997. Lipopolysaccharide-induced IL-12 expression in the central nervous system and cultured astrocytes and microglia. *J Immunol* 159: 1344–51.

Stewart, Helen J.S. y Jessen KR. 1995. Neuron-Glia Interrelations During Phylogeny I. Phylogeny and ontogeny of glial cells. Ch. Schwann Cells in Phylogeny. (Vernadakis A & Roots BI, Eds.). Totowa, NJ: Humana Press.

Stolt CC y Wegner M. 2015. Schwann cells and their transcriptional network: Evolution of key regulators of peripheral myelination. *Brain Res* 1641: 1–10.

Surzenko N, Crowl T, Bachleda A, Langer L y Pevny L. 2013. SOX2 maintains the quiescent progenitor cell state of postnatal retinal Muller glia. *Development* 140: 1445–56.

Taveggia C. 2016. Schwann cells-axon interaction in myelination. *Curr Opin Neurobiol* 39: 24–29.

Taylor EW, Leite CAC, Sartori MR, Wang T, Abe AS y Crossley DA. 2014. The phylogeny and ontogeny of autonomic control of the heart and cardiorespiratory interactions in vertebrates. *J Exp Biol* 217: 690–703.

Tong CK y Vidyadaran S. 2016. Role of microglia in embryonic neurogenesis. *Exp Biol Med* 241: 1669–1675.

Tremblay M y Sierra A. 2014. Microglia in health and disease. *Microglia Heal Dis* 9781493914: 1–486.

Woodhoo A y Sommer L. 2008. Development of the schwann cell lineage: From the neural crest to the myelinated nerve. *Glia* 56: 1481–1490.

Xelhuantzi N, Rodríguez-Antolín J, Nicolás L, Castelán F, Cuevas E y Martínez-Gómez M. 2014. Tissue alterations in urethral and vaginal walls related to multiparity in rabbits. *Anat Rec* 297: 1963–1970.

Xiong X-Y, Liu L y Yang Q-W. 2016. Functions and Mechanisms of Microglia/Macrophages in Neuroinflammation and Neurogenesis during Stroke. *Prog Neurobiol* 142: 23–44.

Yamada K y Watanabe M. 2002. Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anat Sci Int / Japanese Assoc Anat* 77: 94–108.

Young HM, Cane KN y Anderson CR. 2011. Development of the autonomic nervous system: A comparative view. *Auton Neurosci Basic Clin* 165: 10–27.

Zuchero JB y Barres BA. 2015. Glia in mammalian development and disease. *Development* 142: 3805–9.

## 10. 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 amoniacal	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.