

Universidad Autónoma de Tlaxcala



Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

Plasticidad estructural de los ganglios paravaginales de la
coneja en contextos hormonales relevantes para la
reproducción

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACÁDEMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Laura Guadalupe Hernández Aragón

Director de Tesis

Dr. Francisco Castelán

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2017.

Esta tesis se realizó en las instalaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala – Unidad Foránea Tlaxcala del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y bajo la dirección del Dr. Francisco Castelán

El Comité tutorial estuvo integrado por la Dra. Estela Cuevas Romero,
el Dr. Pablo Pacheco Cabrera, el Dr. Arturo Ortega Soto
y la Dra. Margarita Martínez Gómez.

Asistencia técnica brindada por la Q.F.B. Laura García Rivera
y el Biol. Jesús Ramsés Chávez Ríos

Se contó con el financiamiento de PROMEP-SEP (UATLX-PTC-109 a FC), PAPIIT-UNAM (228110 a MMG), CONACyT (105882 a MMG), beca CONACYT a LGHA (248110) y Universidad Autónoma de Tlaxcala (CACyPI-UATx-2013).

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, por el espacio, tiempo y confianza brindada, durante la realización de este proyecto.

A mi director de tesis, Dr. Francisco Castelán, por su confianza, sus enseñanzas académicas y personales que forman parte de mi carácter profesional y humano. Gracias por apostar conmigo a ganar-ganar y permitirme crecer con la libertad de hacer experimentos, cuando jugaba a investigar y divulgar la ciencia.

Al Comité tutorial:

Dra. Estela Cuevas Romero, gracias por su atención y paciencia para revisar los resultados y los alcances de los mismos, gracias por contagiarme su pasión por la investigación.

Dr. Pablo Pacheco Cabrera, porque con sus atinados comentarios y enseñanzas enriqueció notablemente este trabajo y mi desarrollo profesional.

Dr. Arturo Ortega Soto, por la sinceridad de sus consejos que orientan mi desarrollo profesional y personal, seguiremos trabajando.

A la Dra. Guillermina, por su calidez y su confianza, gracias por brindarme todo lo que estuvo en sus manos desde conocimiento, experiencias y hasta la generosidad de su casa.

Dra. Margarita Martínez Gómez, quien me enseñó que las preguntas más simples son las que casi nunca nos hacemos y son las más difíciles de contestar, gracias por sus invaluable consejos y la apertura para incursionar en diferentes áreas del conocimiento.

A la asistencia técnica de:

Q.F.B. Laura García Rivera, por tu tiempo y amabilidad, gracias por estar siempre al pie del cañón, con sonrisas y apapachos las horas de trabajo pasan volando.

Biol. Jesús Ramsés Chávez Ríos, con tu optimismo y buena disposición parece que todo es posible, gracias por apoyarnos siempre en el laboratorio.

RESUMEN

La fisiología del aparato urogenital de hembras de mamíferos es modulada por la inervación autonómica proveniente del plexo pélvico. Este último puede sufrir modificaciones anatómicas, histológicas o fisiológicas favorecidas por cambios hormonales (estrógenos y/o andrógenos) que modulan sus acciones mediante la plasticidad nerviosa. En el sistema nervioso periférico, algunas características de la plasticidad conciernen al número de neuritas y células de la glía satélite (SGC). Por tanto se plantearon dos objetivos para evaluar la plasticidad en los ganglios paravaginales de conejas. El primero fue evaluar la relación del estado reproductivo sobre la plasticidad neuronal, expresión de receptores de estrógenos y andrógenos, aromatasa y β -III-tubulina en durante la gestación y en la fase de postparto en conejas. El segundo fue evaluar la dependencia estrogénica sobre la morfometría, expresión de receptores a estrógenos y andrógenos, así como aromatasa y el factor de crecimiento GDNF y su receptor GFR α 1 en conejas ovariectomizadas y con reemplazo hormonal (benzoato de estradiol). El primer experimento se realizó en conejas gestantes a término y primíparas en el período postparto (3 y 20 días postparto), el segundo en conejas ovariectomizadas durante 5 meses y tratadas con reemplazo hormonal (benzoato de estradiol) durante 1.5 meses. Resultados: La gestación disminuye el tamaño del soma y aumenta el número de neuritas emergentes, sin alterar la expresión de receptores de estrógenos y andrógenos u aromatasa en neuronas y SGC. En el periodo postparto se recupera el tamaño del soma y el número de neuritas emergentes es similar a lo observado en el grupo virgen. La ovariectomía disminuyó el tamaño del soma de neuronas paravaginales y aumenta la expresión de receptor de andrógenos en terminales dendríticas, así como la expresión de aromatasa en el soma neuronal. La administración de estradiol evita la disminución del soma neuronal y el incremento de aromatasa. Además, promueve la expresión de GDNF en el soma neuronal y GFR α 1 en células glía satélite. Conclusión: la gestación permite la sobrevivencia neuronal de los ganglios paravaginales a través de un proceso que involucra plasticidad estructural. El soma de las neuronas paravaginales es dependiente de estrógenos, mientras que la plasticidad dendrítica es mediada por andrógenos. Los datos mostrados sugieren que estos eventos pueden ser modulados por GDNF y la participación de las células de la glía satélite.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Fisiología y anatomía vaginal en mamíferos.....	2
Innervación vaginal y ganglios pélvicos en mamíferos	3
Plasticidad nerviosa.....	5
ANTECEDENTES	9
Esteroides ováricos e innervación del área pélvica durante la gestación	9
Plasticidad estructural de ganglios pélvicos en relación con la reproducción.....	11
Estrógenos, andrógenos y aromatasa en las neuronas ganglionares.....	13
Factores de crecimiento del sistema nervioso	16
Células de la glía satélite.....	18
JUSTIFICACIÓN.....	20
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS GENERALES	22
OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
METODOLOGÍA.....	24
Animales y grupos.....	24
Experimento 1: Experiencia reproductiva.....	24
Experimento 2: Dependencia estrogénica	24
Diseción de la vagina de la coneja	25
Técnica histológica	25
Tinción tricrómica de Masson	25
Tamaño neuronal y el número de SGC por neurona.	25
Marcaje inmunohistoquímico para los ganglios paravaginales.....	26
Análisis inmunohistoquímico de los ganglios paravaginales	28
Neuritas con el marcador de β -tubulina-III (emergentes y periféricas).....	28
Expresión de aromatasa.....	28
Receptores de estrógenos de tipo alfa y beta	28
Receptores de andrógenos	28

Expresión del factor de crecimiento GDNF, GFR α 1 y GFAP	29
Análisis estadístico.....	29
RESULTADOS	30
Experimento 1	30
Área del soma neuronal y células de la glía satélite.....	30
Tamaño del soma neuronal	31
Tamaño del soma neuronal y células de la glía satélite	32
Correlación entre el tamaño del soma neuronal y el número de células de la glía satélite	33
Área del soma neuronal evaluado con β -tubulina-III y número de neuritas	34
Número de neuritas emergentes y periféricas	35
Receptor de estrógenos de tipo alfa.....	36
Receptor de estrógenos de tipo beta.....	37
Receptor de andrógenos	38
Aromatasa en neuronas paravaginales y células de la glía satélite	39
Experimento 2: Dependencia estrogénica	40
Morfometría de los ganglios paravaginales en la ovariectomía	40
Niveles séricos de estradiol y testosterona.....	41
Receptores de estrógenos alfa	42
Receptores de estrógenos beta.....	43
Receptor de andrógenos.....	44
Expresión de aromatasa en neuronas y SGC.....	45
Células de la glía satélite (GFAP).....	46
GDNF y GFR α 1 en neuronas paravaginales.....	47
DISCUSIÓN	48
Tamaño del soma neuronal en diferentes estados reproductivos	48
Plasticidad estructural en las neuritas de las neuronas paravaginales	49
Expresión de receptores de estrógenos.....	49
Expresión de receptores de andrógenos en las neuronas paravaginales.....	50
Expresión de aromatasa en las neuronas paravaginales	50
Dependencia estrogénica del tamaño del soma neuronal	52
Expresión de receptores de estrógenos y andrógenos en la ovariectomía.....	53

Neuritas y SGC en la ovariectomía	53
Factor neurotrófico GDNF los ganglios paravaginales	55
Plasticidad estructural en diferentes contextos hormonales	55
CONCLUSIONES.....	58
PERPECTIVAS.....	59
Referencias bibliográficas	60
GLOSARIO	72

ABREVIATURAS

GDNF	Factor Neuronal Derivado de células Glía
GFAP	Proteína Ácido Fibrilar Glial
GFR α 1	Receptor de la Proteína Ácido Fibrilar Glial alfa tipo 1
OVX	Ovariectomizadas
OVX+BE	Ovariectomizadas más Benzoato de Estradiol
I.p.	Intraperitoneal
I.m.	Intramuscular
VIP	Péptido Intestinal Vasoactivo
NOS	Sintasa del Óxido Nítrico
NPY	Nueropéptido Y
GFLs	Ligandos de la Familia de GDNF
SGC	Células de la glía satélite
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitogenos
TH positivas	Tirosina hidroxilasa positivas
ChAT positivas	Acetil colinesterasa positivas
CGRP	Péptido relacionado al gen de la calcitonina
ATP	Adenosina tri-fosfato
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
IL-1b	Interleucina 1b

INTRODUCCIÓN

Fisiología y anatomía vaginal en mamíferos

En el desarrollo embrionario de mamíferos, el tracto reproductivo femenino proviene de los conductos de Müller de origen mesodérmico. Sin embargo, la morfogénesis y diferenciación celular que caracteriza a cada estructura es originada en una región particular (Kurita, 2011; Cunha y col. 2004). Los dos primeros tercios de la vagina provienen de la porción caudal del conducto de Wolf o mesonéfricos, mientras que la tercera porción de la vagina proviene del seno urogenital de origen endodérmico (Bajo Arenas y col. 2009). En la mujer se distinguen dos porciones anatómica e histológicamente diferenciadas: la porción distal o caudal que es dos veces más gruesa (~9.2 mm) y más angosta que la porción proximal (Song y cols. 2009). La vagina está situada por atrás de la uretra y por enfrente del recto, rodeada por los músculos del piso pélvico, el esfínter externo de la uretra y la membrana perineal, en la cavidad pélvica (Brandon y col. 2009). La porción superior de la vagina conecta con el útero a través del cérvix, esta porción se fija al hueso púbico por el músculo pubovaginal, que se fusiona con el músculo puboanal (Larson y col. 2010).

La vagina de la mujer es un órgano tubular curvo, cuyas paredes, anterior y posterior colapsan entre ellas (Alexander y col. 2004) y conecta a los órganos genitales internos con los externos. Por ello, participa en la excreción de flujo menstrual, en la reproducción y la expulsión del feto. Por lo que sus funciones se desarrollan a partir de la pubertad, durante la adultez y hasta la vejez, en el caso particular la actividad sexual (Seyyedi y col. 2016). La fisiología de la vagina es influenciada por varios factores, incluyendo la edad, el estado hormonal (ciclo reproductivo), cambios en el pH (semen, infecciones, menstruación) y la innervación que recibe. La innervación autonómica ejerce un efecto sobre la relajación de músculo liso vascular y vaginal, para producir un aumento en el flujo sanguíneo y una filtración de fluidos hacia el lumen, respectivamente (Aughton y cols. 2008).

Las acciones hormonales ejercidas por estrógenos y andrógenos modulan la morfología y fisiología de la vagina mediante la interacción con sus propios receptores, localizados en diversos estratos celulares en la pared vaginal. Al respecto, algunos autores sugieren que la expresión de receptores de estrógenos (REs) en neuronas autonómicas y sensoriales, actúan directamente sobre la fisiología vaginal (Pelletier y col. 2013, Smith y col. 2009, Zoubina y Smith 2002). Además, se ha aceptado que los estrógenos y factores de

crecimiento nervioso promueven la sobrevivencia neuronal y protegen ante cambios propios de la edad (Fiocchetti y col. 2012). En este sentido, cualquier alteración que ocurra en la inervación del conducto vaginal podría provocar trastornos relacionados con la función reproductiva (Maggi y cols. 1988).

Innervación vaginal y ganglios pélvicos en mamíferos

La inervación de la vagina proviene principalmente de los ganglios de la raíz dorsal, de regiones lumbosacras de la medula espinal y del nervio hipogástrico, que forman un plexo nervioso constituido por fibras autonómicas y algunas somato-sensoriales (Song y col. 2009; Keast, 1999; Dail. 1996). En la mujer, este plexo nervioso se conoce como plexo hipogástrico inferior, mientras que en la gata, la coneja y la perra se denominan plexo pélvico (Dail, 1996; Imai y col. 2006; Podlech y col. 1996; Kanagasuntheram y Mahran 1960). En la pared anterior de la región distal de la vagina de mujeres, se presenta un plexo hipogástrico inferior conspicuo. Recibe sus conexiones a través del nervio esplácnico y del nervio hipogástrico, provenientes de los segmento sacro y lumbares, respectivamente (Song y col. 2009; Imai y col. 2006). En animales, se ha caracterizado que reciben conexiones de los segmentos sacros de la médula espinal a través del nervio pélvico y de los segmentos lumbares a través del nervio hipogástrico (Keast, 1999).

La mayor parte de la inervación autonómica, simpático y parasimpático, está formado por nervios y ganglios adosados a las vísceras pélvicas. De manera general, los ganglios del plexo pélvico se conocen como ganglios pélvicos. Algunos de ellos están adosados o dentro del órgano blanco y de ahí reciben su nombre (Langley y Anderson, 1896), 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 gálago (Podlech J y col. 1996) y el conejo (Castelán F, y col. 2013). En la mujer, se ha descrito ganglios en las fascias (paracolpio) de la región ventral y lateral a lo largo de todo el conducto vaginal (Imai y col. 2006). Especies de roedores como la rata y el ratón, se caracterizan por la presencia de agrupaciones ganglionares macroscópicas, como el ganglio pélvico principal en el macho y el ganglio paracervical en la hembra (Dail WG, 1996). En la rata, el ganglio paracervical contienen en su mayoría neuronas colinérgicas o noradrenérgicas y solo una minoría de ellas expresan ambos o ninguno de ellos (Langley J. N. and Anderson H. K. 1896).

Por lo tanto, en algunas especies se consideran ganglios mixtos (contienen neuronas simpáticas y parasimpáticas). En la coneja, se ha observado nervios y ganglios en el tejido paravaginal de la pared dorsolateral en la región pélvica (Cruz y col. 2017; Castelán F, y col. 2013; Xelhuantzi 2013). La región pélvica de la vagina está delimitada por los huesos de la pelvis, desde el hueso isquion hasta la cresta iliaca (Rodríguez-Antolín y col. 2009). En esta región, se localiza una pequeña agrupación de ganglios entre la pared dorsolateral de la vagina y el recto. Este plexo ganglionar es inervado por ramas provenientes de S3 (Fig. 1), a través del nervio pélvico (Cruz y col. 2017). La mayoría de sus neuronas tiene un tamaño promedio de $500 \mu\text{m}^2$, pero puede variar desde 100 y hasta $1400 \mu\text{m}^2$, tienen forma poligonal u ovoide y sus prolongaciones citoplásmicas (neuritas) son escasas (Castelán y col. 2013).

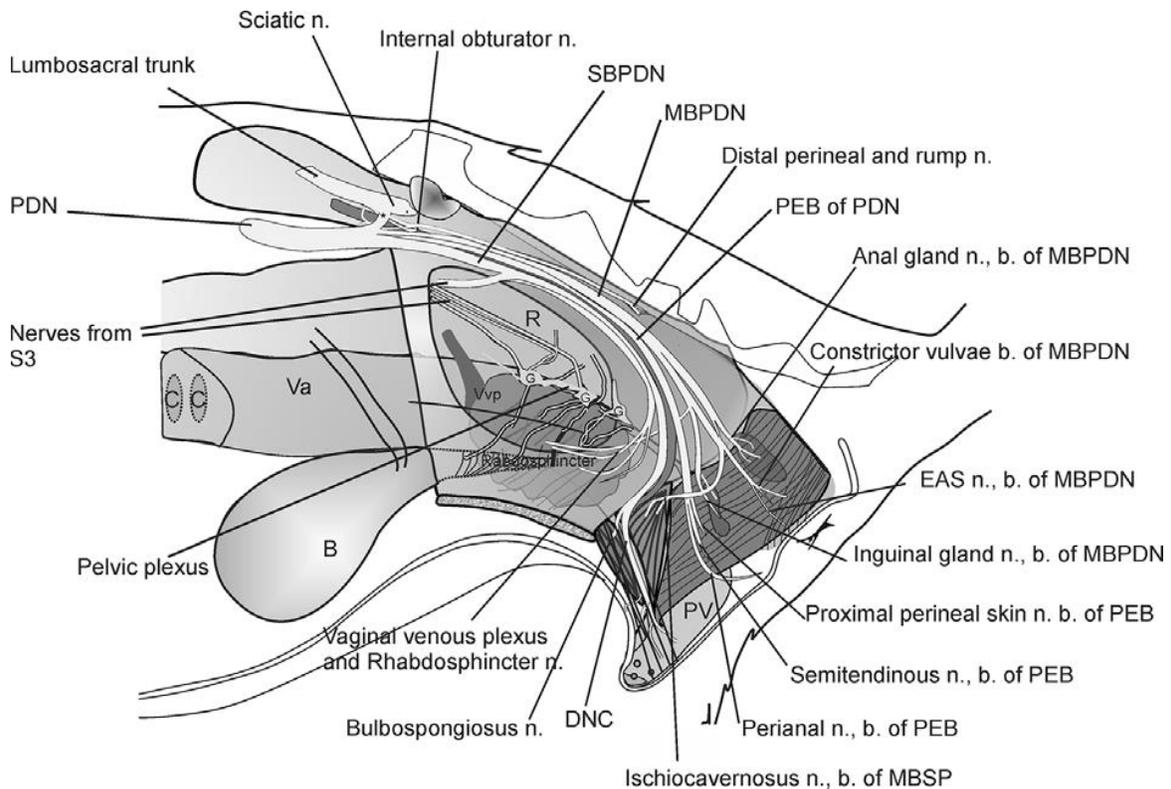


Fig 1. Vista lateral que muestra la inervación de la región pélvica y perineal en la coneja. PDN, nervio pudendo; SBPDN, rama sensorial del nervio pudendo; MBPDN, rama motora del nervio pudendo; PEB, rama perineal del nervio pudendo; EAS, Esfínter anal externo; DNC, nervio dorsal del clítoris; S3, nervio sacro del tercer segmento; B, vejiga; C, Recto; Va, Vagina; Pv, Vagina perineal; Vp, Plexo venoso; n, nervio; b, rama; G, Ganglio. Figura tomada de Cruz y col. 2017.

Además de los neurotransmisores clásicos (noradrenalina y acetilcolina), las neuronas pélvicas sintetizan o almacenan otros neuromoduladores. En general, las neuronas pélvicas

noradrenérgicas expresan el neuropéptido Y, mientras que las colinérgicas expresan el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y la sintetasa del óxido nítrico de tipo neuronal (NOS), (Langley J. N. and Anderson H. K. 1896). El patrón de expresión de esos neurotransmisores puede variar en función del género y la especie (de Groat y col. 2015). En la coneja, los ganglios paravaginales contienen neuronas noradrenérgicas (TH positivas) y colinérgicas (ChAT positivas), siendo estas últimas las que predominan (Castelán F, y col. 2013). De acuerdo con los trabajos clásicos de Langley y Anderson (1896), estos ganglios y nervios del plexo pélvico de la coneja, inervan la vagina, útero y vejiga. Particularmente los ganglios pélvicos paravaginales inerva la vagina, el recto y la uretra (Cruz y col. 2017), controlando funciones reproductivas y no reproductivas.

Plasticidad nerviosa

La plasticidad es un término que engloba un gran número de cambios que ocurren en todos los constituyentes del sistema nervioso a través de la vida de un individuo, en respuesta a un estímulo intrínseco o extrínseco (Cramer y col. 2011). Estos cambios incluyen modificaciones estructurales y funcionales (Berardi y col. 2015). Los cambios descritos como plasticidad han sido descritos a diferentes niveles del sistema nervioso central, incluyendo el molecular, celular y la red neuronal. Se ha sugerido que los cambios en las sinapsis permiten que las redes neuronales cambien la función para adaptarse a través de los mecanismos propuestos por Hebb. Estos cambios, ya sean metabólicos o estructurales, aumentan la eficiencia entre el elemento presináptico y el postsináptico cuando una célula es excitada repetidamente por otra (Hebb, 1949). Por consiguiente, algunas de las propiedades intrínsecas de la neurona como la excitabilidad dendrítica o somática y el crecimiento axonal ocurren hasta alcanzar un nuevo balance homeostático (Costa y col 2017).

Dado que la plasticidad se puede analizar a varios niveles, se ha clasificado conceptualmente como plasticidad estructural, a aquella que engloba cambios a nivel de neurogénesis y la formación o eliminación de sinapsis (neuronas y células gliales) (Butz et al., 2009). Los cambios anatómicos impactan en la conectividad entre neuronas, generando un nuevo cableado sináptico, que puede ocurrir en adultos, mediante la yuxtaposición de varicosidades axonales y/o espinas dendríticas (sinapsis potenciales) (Stepanyants y col. 2002). Mientras que la mayoría son poco estables y perecen en un tiempo relativamente corto

(menos a un mes), una tercera parte sobrevive por periodos más largos (Trachtenberg y col. 2002). Por otra parte, plasticidad sináptica se refiere a la funcionalidad de la sinapsis, que incluye el tipo, cantidad y probabilidad de los neurotransmisores liberados (Costa y col. 2017). Además de estos cambios morfológicos-funcionales en la neurona presináptica, también se presentan modificaciones postsinápticas, como: la eficacia de receptores, modificaciones en la probabilidad y cantidad de neurotransmisores capturados (Isaac y col. 2007). No obstante, se ha observado que la plasticidad sináptica puede inducir cambios estructurales en el remodelamiento de la red neuronal y viceversa, mediante una interacción estructura-función autosustentable hasta reestablecer la homeostasis y mantenerla durante un período de tiempo prolongado (Cohen y col. 2017). Sin embargo, el mecanismo por el cual ocurre la redistribución sináptica aún es desconocido.

La plasticidad del sistema nervioso involucra el cuerpo celular, la expresión de proteínas, los patrones electrofisiológicos y las proyecciones axonales o dendríticas que son confinadas a una misma área (Cohen y col. 20017). Un elemento clave para plasticidad del sistema nervioso son las células gliales. Dentro de las células gliales del sistema nervioso central podemos encontrar a los astrocitos, oligodendrocitos y microglia. Estas células participan en eventos importantes de la función y sobrevivencia neuronal. Los oligodendrocitos participan en la mielinización y proveen una rápida conducción del potencial de acción y se han visto involucrados en la transmisión sináptica axonal rápida (Armstrong y col. 20016). Los astrocitos pueden proveer precursores para neurotransmisores, así como regular el flujo sanguíneo para suplir energía a la neurona (Bolton y Eroglu, 2009). Se ha sugerido que diferentes mecanismo neuronales regulan la diferenciación de células precursoras de oligodendrocitos de acuerdo con los requerimientos de los circuitos neuronales (Eroglu and Barres, 2010). Por otra parte, la microglia se ha relacionado con la modulación de la respuesta inflamatoria, regulando la neuroinflamación y neurodegeneración, además de influir en la sensibilidad al dolor (Carniglia y col. 2017).

En sistema nervioso central se ha observado que las células gliales que rodean a la neurona pre sináptica expresan receptores para neurotransmisores y por tanto participan activamente en modular la función sináptica. Pueden alterar concentraciones de calcio neuronal e incrementar las sustancias activas en la neurona. Estas propiedades han dado pie

a la formulación del concepto de “sinapsis tripartita”, que considera a las células gliales como parte integral entre las neuronas pre-sinápticas y post-sinápticas (Aranque y col. 1999). De esta manera, las células gliales también pueden afectar la plasticidad sináptica y el remodelamiento de las redes neuronales. En este último aspecto, la plasticidad de las redes neuronales se refiere a la modulación del balance entre actividad inhibitoria y excitatoria. Esta actividad de la red puede modificar la densidad de espinas dendríticas, con lo que se refuerza el concepto de adaptaciones bidireccionales entre estructura y función (Fig. 2). Bajo ciertas circunstancias, una perturbación en el sistema puede alterar la función u estructura de manera reversible. Pero si esa perturbación es constante puede originar una mala adaptación. Ante un estrés crónico u excesivo, el costo por restaurar la homeostasis puede generar un daño irreversible del sistema permanentemente (Cohen y col. 2017).

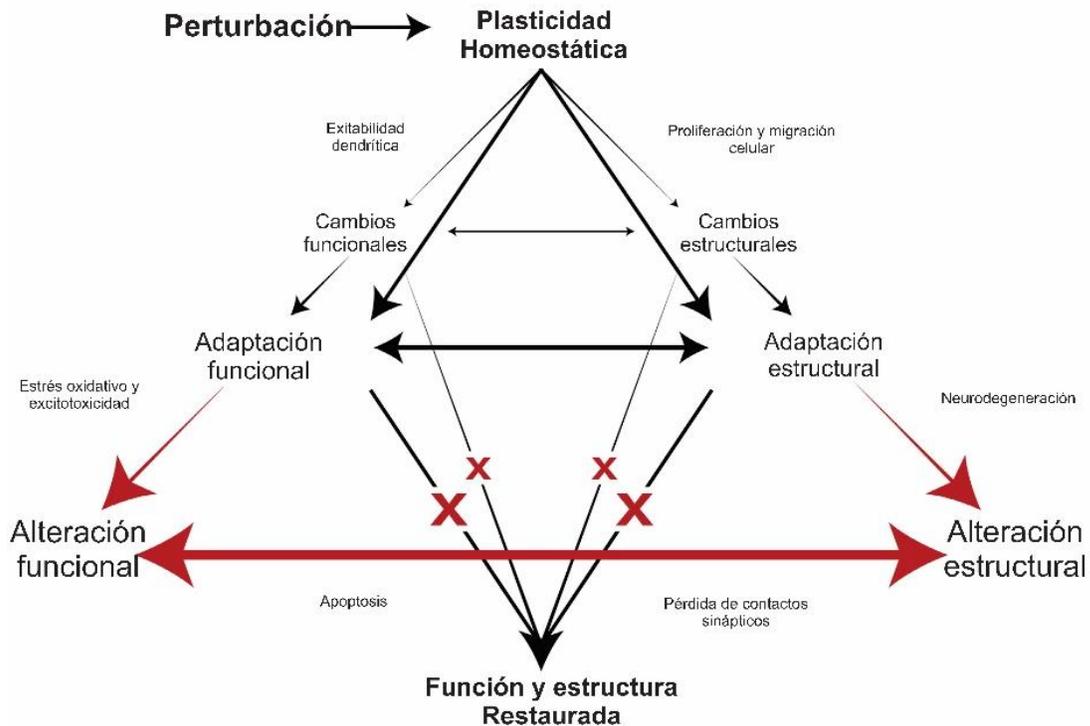


Fig 2. Esquema representativo de la plasticidad en el sistema nervioso. Considere una adaptación cuando la función y estructura es restaurada hasta alcanzar un estado homeostático y considerese una alteración o patológica cuando las vías de restauración se interrumpen y en consecuencia se generan adaptaciones indeseadas. Figura modificada de Cohen y col. 2017.

En el sistema nervioso periférico las células de Schwann se encargan de la mielinización y por lo tanto de la velocidad de conducción del potencial de acción (Feltri y col. 2016). Por otro lado, las células de la glía satélite (SGC) se distinguen como una

envoltura que rodea todas las neuronas sensoriales y autonómicas, individualmente (Pannese 2010). Funcionalmente, se pueden comportar como cualquier otra de las células gliales, se desconocen los mecanismos y factores que influyen para el cambio en la expresión de receptores y otras moléculas. Sin embargo, se ha sugerido que las SGC tienen funciones en los mecanismos de señalización para el metabolismo y activación de las neuronas ganglionares (Hanani y 2005). Dado que la distancia entre el soma neuronal y la SGC es de 20 nm, se ha sugerido que una de las funciones es la de proveer un microambiente en las sinapsis axo-somáticas. Además, el número de SGC puede variar en función del tamaño del área neuronal, se ha observado que el número de SGC por neurona aumenta después de la axotomía o exposición a señales de inflamación (Huang y col. 2013). Las SGC se han asociado con el metabolismo (glucosa y glutamina) y transporte de varias moléculas como ATP (Hanani, 2005), además de mantener la homeostasis iónica de calcio y potasio extracelular (Vit y col. 2008). Estudios recientes han demostrado la relevancia de las SGC en la transmisión sensorial, incluyendo la nocicepción. En el ganglio trigémino se ha observado que las SGC incrementan la expresión de la proteína ácido fibrilar de la glía (GFAP) como parte de un mecanismo de hiperalgesia inflamatoria (Takenada y col. 2007). Este mecanismo involucra la participación de receptores purinérgicos e interleucina 1b (IL1b) en las SGC que modulan la despolarización de la neurona (Takeda y col. 2009). Por lo cual, cambios en la activación de la SGC, evidenciada con marcadores como GFAP y un aumento del número de las SGC alrededor de una neurona involucran cambios plásticos en el sistema ganglionar.

ANTECEDENTES

Esteroides ováricos e innervación del área pélvica durante la gestación

En hembras de mamíferos, la experiencia reproductiva incluye la cópula, la gestación, el parto y la lactancia. De tal manera, que un mismo individuo puede experimentar numerosas experiencias (p.ej. la multiparidad) durante la vida reproductiva, que varía entre las especies. Datos obtenidos en la rata y la coneja han reportado la fluctuación de esteroides ováricos durante la experiencia reproductiva (Bridges and Byrnes 2006, Gonzalez-Mariscal y col. 1994), entre esas se encuentra el estradiol. La coneja doméstica *Oryctolagus cuniculus* es una de las especies de mamíferos que presenta un mecanismo de ovulación refleja, lo que le permite mantenerse en estado estro por períodos prolongados, hasta que se presente la primera copula. La gestación en la coneja dura aproximadamente 31-32 días, y los niveles de estrógenos incrementan hacia el día 30 de la primera y segunda gestación (González-Mariscal y col. 1994), y vuelven a su concentración basal en el periodo postparto (López-García 2013; Beyer y col. 2007). En contraste, los niveles de testosterona se incrementan al final de la gestación y posterior al parto (González-Mariscal y col. 1994, López-García, 2010). Estas fluctuaciones hormonales se han asociado con alteraciones en la fisiología del aparato reproductor y, particularmente, con estructuras de la cavidad pélvica (Huseynov y col. 2016; Xelhuantzi y col. 2014; López-García K, 2010). Datos obtenidos por nuestro grupo de investigación sugieren que la gestación y la multiparidad pueden afectar la morfología de las neuronas paravaginales (Castelán y col. 2013) posiblemente a través de un mecanismo que involucre a los estrógenos. Sin embargo, otros esteroides ováricos, como la progesterona y la testosterona, también fluctúan durante la gestación (Beyer y col. 2007). Se sabe que alteraciones de los niveles de estrógenos y la activación del receptor modula el desarrollo de órganos reproductores durante el desarrollo embrionario en hembras (Mowa y col. 2003).

Se ha observado que al final de la gestación el área del soma neuronal es menor durante el (Castelán y col. 2013). Es posible que el número de SGCs alrededor de las neuronas paravaginales varía de acuerdo al estado reproductivo como respuesta adaptativa plástica. En ratas gestantes el incremento de los niveles de estrógenos a finales de la gestación se ha relacionado con la reducción en la inervación simpática y sensorial vaginal (Ting y col. 2004). Una posible explicación de la disminución de la inervación sensorial es como respuesta adaptativa a la sensación de dolor durante el parto (Liao y Smith, 2011). En la

coneja es posible que los cambios hormonales induzcan cambios plásticos en los ganglios paravaginales en conejas jóvenes durante la gestación que prevengan daños nerviosos durante el paso de las crías por el canal vaginal en la región pélvica (Castelán y col. 2013). Se ha mostrado que la gestación y el parto no afectan las características morfológicas de la pared vaginal (Hernández-Aragón 2012). Estas características incluyen: proporción de músculo liso, músculo estriado, colágeno y espesor de las capas de la pared vaginal. Sin embargo, la gestación y el parto disminuyen el área transversal de los ganglios paravaginales y el área del soma de las neuronas, recuperándose 20 días después del parto (Hernández-Aragón 2012). Dado que se ha observado la expresión de receptores de estrógenos en las neuronas paravaginales, se ha sugerido que los estrógenos participan en la regulación del tamaño del soma neuronal. Pero también es posible que hormonas androgénicas estén participando como se ha observado en el ganglio pélvico principal de la rata cuando se gonadectomiza y se administra testosterona (Purves-Tyson y col. 2007). Desafortunadamente se desconoce la expresión de receptores de andrógenos y otros neurotransmisores que podrían verse afectados durante la gestación.

En el cobayo, al final de la gestación se ha mostrado un decremento en el número de neuronas que expresan VIP, TH y NPY en el ganglio paracervical (Mitchell y Satauber 1990). Sin embargo no se observan diferencias en la actividad de acetilcolinesterasa o en el tamaño del soma neuronal. En ratas al día 21 de gestación, presentan una reducción de la densidad de fibras nerviosas alrededor del 40% comparada con ratas gestantes en la etapa temprana, evidenciado mediante inmunorreactividad al PGP-9.5 (Liao y Smith 2011). La pérdida del marcaje de axones, autonómicos y sensoriales, se ha sugerido que contribuye a un mecanismo adaptativo asociado al parto. Además, se observó una reducción de fibras nerviosas marcadas con tirosina hidroxilasa (TH positivas), transportador de acetilcolina vesicular (VACHT positivas), péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP) y receptor de potencial transitorio Vainiloide tipo 1 (TRPV1) en la pared vaginal de ratas gestantes a término. Estas observaciones se han propuesto que afectan el impulso neuro-efector, promoviendo la pérdida del tono muscular y de esta manera facilita el paso del feto por el canal de parto (Liao y Smith 2011). Se presume que la gestación induce una serie de modificaciones estructurales y biomecánicas que constituyen una respuesta adaptativa para facilitar el parto y evita patologías ginecológicas (Daucher y col. 2007; Lowder y col. 2007).

A pesar de ello, el parto ha sido fuertemente asociado con el desarrollo de patologías del piso pélvico, debido al daño generado en los tejidos y estructuras musculares que coordinan las funciones del aparato urogenital. Un neonato de gran tamaño o una prolongada duración del parto, son las principales causas de un daño en el piso pélvico y el desarrollo de patologías como la incontinencia urinaria (DeLancey y cols. 2008). Algunos estudios muestran que la distensión vaginal o el daño del nervio pudendo por compresión, resultan en una disminución del número de fascículos nerviosos (13%). Tales evidencias sugieren un proceso de neuro-degeneración, que contribuye a la disfunción de los órganos del piso pélvico y la incontinencia urinaria (Damaser y cols. 2003). Se ha observado que la neuroectomía del nervio pélvico interfiere con el reflejo de expulsión del feto (Burden y cols. 1990), mientras que la neuroectomía del nervio hipogástrico atenúa la analgesia en el parto inducida por el embarazo (Cunningham, 1991). Otros estudios en modelos similares de parto, generan daño en el músculo estriado de la uretra, disminución de las células ganglionares en el plexo neural de la vagina y disminución de la sintasa del óxido nítrico neuronal en el músculo estriado de la uretra (Sievert y cols. 2001). Estos datos podrían estar directamente relacionados con la plasticidad sináptica en las neuronas de ganglios pélvicos en otras especies de mamíferos.

Plasticidad estructural de ganglios pélvicos en relación con la reproducción

En la coneja, la multiparidad, considerada como cuatro eventos consecutivos, promueve cambios morfológicos en la pared vaginal y en los ganglios paravaginales (Xelhuantzi y col. 2014; Castelán y col. 2013). Dado que la multiparidad implica mantener a los individuos en eventos continuos de cópulas, gestaciones, partos y lactancias, los individuos son sometidos a fluctuaciones hormonales que regulan la expresión de estos eventos. Previamente en la coneja (cuatro eventos de gestación y parto), se ha observado que la densidad ganglionar por campo y el número de neuronas disminuye (Castelán y col. 2013). En la coneja, las alteraciones y patologías presentadas por la multiparidad se ha relacionado con la carencia del pico de estrógenos que se presenta el día 30 de la gestación durante los dos últimos partos (López-García 2012). Se ha sugerido que la deficiencia de estrógenos al final de la gestación implica un déficit en la preparación del tejido vaginal y promueve la denervación parcial del canal vaginal (Fig. 3). Sin embargo, las alteraciones morfométricas

observadas en la multiparidad también pueden surgir como consecuencia de la distensión continua que sufre el aparato urogenital durante los cuatro partos vaginales.

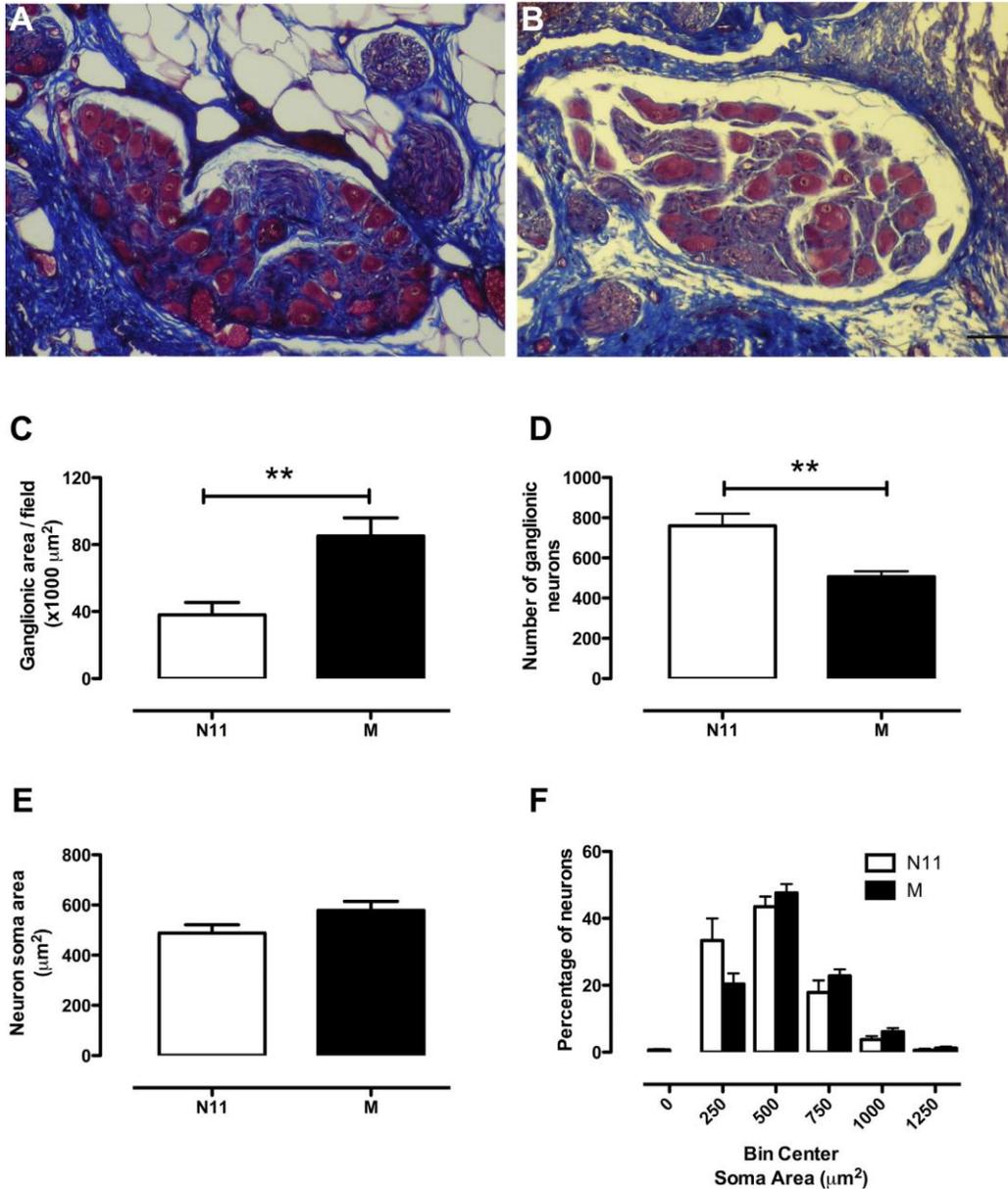


Figura 3. Efecto de la multiparidad sobre la morfometría de los ganglios paravaginales. Fotomicrografías teñidas con tricrómica de Masson en conejas nulíparas (A) de 11 meses de edad (N11), y múltiparas (B, M). Se analizó el área ganglionar por corte (C), el número de neuronas ganglionares (D), área del soma neuronal (E) y el porcentaje de neuronas en rangos de área del soma (F). Los datos se representan como la media \pm ee, se analizaron mediante una *t de student* para encontrar las diferencias significativas (** $p < 0.01$). Barra, 50 μm .

Se ha propuesto que esta denervación impacta en el aparato urogenital inferior y promueve el desarrollo de prolapsos viscerales presente en el 30% conejas múltiparas, como consecuencia de la pérdida de neuronas y fascículos nerviosos de los ganglios paravaginales

(Xelhuantzi, 2013). Sin embargo, durante el primer parto no se observa que disminuya el número de neuronas en los ganglios paravaginales (Castelán y col. 2013). Lo cual es concordante con otros modelos animales, en los que se ha planteado un proceso adaptativo durante la gestación que prepara las estructuras pélvicas durante el parto (Daucher y col. 2007; Lowder y col. 2007). En estos trabajos, se propone que la remodelación del canal vaginal es parte de la plasticidad funcional para el favorecer el paso del feto durante el parto.

Estrógenos, andrógenos y aromatasa en las neuronas ganglionares

Estudios previos realizados en conejas gestantes y primíparas muestran que las neuronas pertenecientes a los ganglios pélvicos adosados a la pared de la vagina, llamados también por su ubicación anatómica ganglios paravaginales son sensibles a cambios hormonales presentes durante la gestación (Castelán et al. 2013). Se ha propuesto que las hormonas gonadales, particularmente el estradiol está involucrado en procesos de neuroprotección durante eventos traumáticos (daño celular) en diferentes estratos celulares. Particularmente en el sistema nervioso central y periférico se ha propuesto que el estradiol promueve la sobrevivencia celular, la neuroplasticidad y la proliferación de algunas células (Strom, Theodorsson, and Theodorsson 2011). A diferencia de los andrógenos, existen al menos dos subtipos del receptor de estrógenos (α y β), los cuales ha sido implicados en las características morfológicas y anatómicas de la inervación autonómica. Se ha descrito que la exposición a concentraciones altas de estrógenos en la etapa prepúber puede disminuir la inervación uterina colinérgica, pero la depleción de receptor genera anomalías en la inervación autonómica de la vejiga (Keast, 2006).

En la rata macho, se ha propuesto que el estradiol media el volumen neuronal de diferentes subpoblaciones de neuronas (NOS, TH, NPY) en el ganglio pélvico principal (Purves-Tyson y col. 2007). En cultivo celular de neuronas provenientes del ganglio pélvico de rata macho, se ha observado un incremento del tamaño del soma neuronal (Meusbürger y Keast, 2001). Datos preliminares de nuestro grupo de trabajo sugiere que la ovariectomía reduce el tamaño del soma neuronal y la administración de estradiol previene la reducción (Ramírez-Corona E. 2011). Este hallazgo es similar al observado en conejas gestantes en el último día de gestación (Castelán y col 2013), en el día 30 se presenta un incremento en las concentraciones séricas de estradiol (Fig. 4) (López-García y col. 2013), mientras que la

coneja, 5 meses después de la ovariectomía, alcanza niveles séricos de estradiol similares a los de una coneja intacta (Carrasco-Ruíz y col. 2015). Estos resultados contradictorios no parecen apoyar la hipótesis de que los estrógenos modifican el tamaño del soma neuronal. Por lo cual, se ha sugerido que la clave fundamental es la expresión de receptores de estrógenos u andrógenos y la capacidad de síntesis local de estradiol.

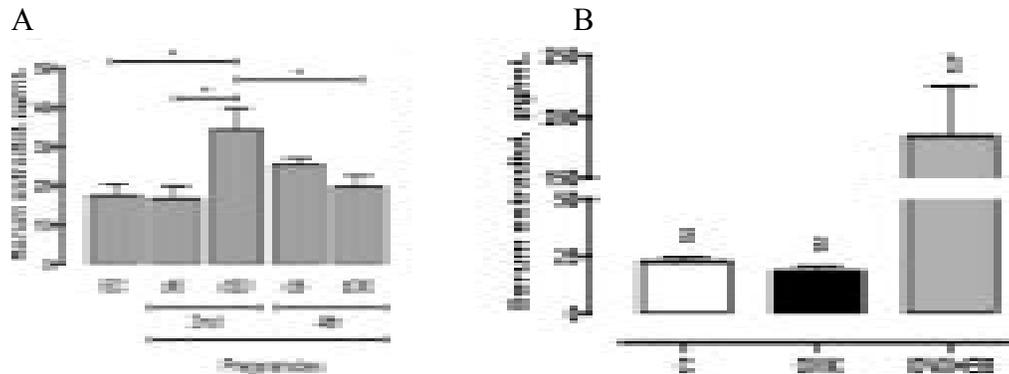


Fig 4. Efecto de la multiparidad y la ovariectomía sobre la concentración sérica de estradiol en la coneja. A. Concentración sérica de estradiol en conejas control (BC), en el día 6 (d6) y día30 (d30) de gestación, durante la segunda (2nd) y cuarta (4th) gestación. B. Concentración sérica de estradiol en conejas control, ovariectomizadas (OVX) y con benzoato de estradiol (OVX+EB). Los datos se representan como la media \pm ee, ANOVA-una vía fue empleada, diferencias estadísticas como: * $p < 0.05$ y "b" $p < 0.05$. Figura A obtenida de López-García y col. 2013 y figura B de Carrasco-Ruíz y col. 2015.

La enzima aromatasa (citocromo P450) tiene la capacidad de sintetizar estradiol en neuronas en áreas de cerebro específico (Thierry y col. 2013). De esta manera cambios en la concentración local de estrógenos sintetizada por aromatasa podría explicar discrepancias en el tamaño del soma neuronal en modelo de ovariectomía y gestación. La expresión de aromatasa en las neuronas paravaginales podría significar mecanismos de síntesis de hormonas esteroideas que implican cambios metabólicos y estructurales. Por ejemplo, se ha descrito que por cada mol de andrógenos que es transformado a estrógenos se emplean tres moles de oxígeno y uno de NADH (Sipsom y Santen, 2015). En este sentido, se deben considerar las siguientes características de la aromatización extragonadal, la cual difiere importantemente de la que ocurre en los ovarios y se sugiere tiene gran impacto en la fisiología y patología en diferentes niveles de la organización tisular. En primer lugar se debe considerar que la biosíntesis es una señal paracrina o intracrina, por lo tanto sus funciones son mayores que las señales endocrinas. En segundo lugar, que las fuentes de estrógenos extragonadales dependen de las concentraciones de andrógenos, puesto que es imposible la aromatización a partir de una fuente de colesterol, además, varios tejidos extragonadales no

expresan el enzima limitante (Simpson, 2002). Por lo que, las concentraciones séricas de andrógenos resultan también importantes cuando se analiza la biosíntesis de estrógenos en órganos periféricos.

En el sistema nervioso central se ha observado que la expresión de aromatasa está localizada en áreas del cerebro que se relacionan con la conducta sexual como el área preóptica media, el núcleo hipotalámico ventromedial, en núcleo terminalis estriado de la amígdala, entre otros. En estas estructuras, la aromatasa se ha localizado en el cuerpo neuronal, en las terminales sinápticas y en astrocitos. Sus funciones se han asociado con la producción local de estrógenos, que participan en procesos de cognición, memoria, conducta sexual, plasticidad y en respuesta a un daño cerebral (Stocco, 2012). En el sistema nervioso periférico se desconoce si la enzima aromatasa participa en la biosíntesis local de estrógenos regulando funciones del tracto genital. Su presencia en los ganglios paravaginales explicaría las discrepancias encontradas previamente con respecto al tamaño del soma neuronal en el modelo de ovariectomía y gestación.

Por otra parte, el receptor de andrógenos podría estar relacionado en la comunicación celular de las neuronas de los ganglios paravaginales en la coneja. Los efectos de los andrógenos sobre los ganglios pélvicos se han hecho principalmente en machos de roedores (ratón y rata), cuya morfología y función se conoce están relacionadas. En estos trabajos se ha descrito las funciones relacionadas con la reproducción masculina (Purves-Tyson y col. 2007, Dail W. 1996). Algunas de las acciones androgénicas en las neuronas pélvicas se han relacionado con la señalización mediada por sus propios receptores. Otras han sido discutidas en términos de su aromatización para producir estrógenos (Burden HW, 1976, Owman C, Sjöberg NO.1966) y como señales similares a los de factores de crecimiento (Papka y col. 1985). Se ha sugerido que la testosterona es un neuroprotector ante el estrés oxidativo y previene la muerte celular, acelera la regeneración axonal, disminuye la poda sináptica que precede ante un daño en motoneuronas (Fargo y col. 2009; Jones y col 2001). La administración de testosterona atenúa los cambios morfológicos y funcionales causados por la atrofia dendrítica inducida por muerte neuronal en las motoneuronas espinales (Wilson y col 2009; Fargo y col 2009; Little y col. 2009). También, atenúa la atrofia dendrítica (largo de la dendrita y arborización) de las motoneuronas que inervan el músculo lateral del

cuádriceps (torácica 9) generada por contusión de la medula espinal en la rata hembra (Bryes y col. 2012). En este mismo estudio no se encontraron diferencias en el volumen del soma neuronal o número de motoneuronas entre el modelo por contusión y el tratamiento con testosterona. Se ha sugerido que las acciones de los andrógenos son muy similares a las de los factores de crecimiento, a través de la interacción con una proteína llamada paxilina (PXN) que remodela el citoesqueleto y participa en funciones de adhesión focal, mediadas por la activación de Erk (Sen y col 2014). Se ha observado que PXN sirve como una vía de unión entre la señalización nuclear y citoplasmica de los andrógenos. Recientemente se ha sugerido que los efectos mediados por andrógenos dependen de la interacción sinérgica de la señalización nuclear y citoplasmica. Por ejemplo, sea observado que los andrógenos inducen la sobrevivencia neuronal al disminuir proteínas pro-apoptóticas. Además, se ha observado que la testosterona incrementa el factor de crecimiento 1 (IGF-1), el factor de crecimiento similar a la insulina 3 (INSL3) y además estimula la expresión de la aromatasa (Prizant y col. 2014). Por tanto determinar la expresión de receptores de andrógenos en las neuronas paravaginales representaría otro mecanismo de plasticidad neural como la comunicación sináptica, además de participar en la sobrevivencia neuronal.

Factores de crecimiento del sistema nervioso

En el sistema nervioso periférico se ha establecido que acciones traumáticas y degenerativas pueden ser revertidas por factores de crecimiento neuronal. Aunque se han descrito varios, este apartado estará enfocado al factor neurotrófico derivado de células glía (GDNF). Este factor pertenece a una familia de ligandos del GDNF, además de éste, neurturina, artemina y persepina se unen a los receptores $GFR\alpha 1-4$, respectivamente (Airaksinen y col. 2002). El $GFR\alpha 1$, $GFR\alpha 2$ y $GFR\alpha 3$ son receptores para el GDNF, los cuales han sido localizados en neuronas periféricas y han sido asociadas a sobrevivencia y regeneración en neuronas parasimpáticas (Hlaing y col. 2013, Forrest y Keast 2008, Hisasue y col. 2008). En neuronas entéricas y parasimpáticas el GDNF y neurturina, miembros de la familia de ligandos del GDNF (GFLs), son fundamentales para distintas etapas de su desarrollo (Mirabella y col. 2008; Enomoto y col. 1998). Se ha observado que el GDNF es esencial para la proliferación, migración y diferenciación de diversas poblaciones neuronales del sistema nervioso central (Airaksinen y col. 2002) y periférico (Laurikainen y col. 2000; Wanigasekara y col. 2004). En neuronas de los ganglios de la raíz dorsal, el GDNF está

relacionado con características morfológicas que incluyen el área del soma (Priestley y col. 2002). En estas neuronas, el GDNF parece estar relacionado con diferentes subpoblaciones de neuronas. Se ha observado que receptores para GDNF se expresan mayoritariamente en neuronas de mediana y pequeñas, predominante nociceptoras (Molliver y col. 1997).

En el ratón macho, la expresión y función del GDNF y neurturina se ha relacionado con la adecuada inervación parasimpática del pene (Laurikainen y col. 2000). La señalización de neurturina a través del receptor $GFR\alpha 2$ es esencial para el mantenimiento de la inervación parasimpática de la mucosa de órganos reproductivos (Wanigasekara y col. 2004.). La mayoría de los datos han sido obtenidos en el macho del ratón, utilizando cultivos primarios e individuos genéticamente modificados para silenciar la expresión de neurturina y su receptor; esta última es una estrategia que no ha podido aplicarse para obtener información de la señalización del GDNF, debido a que su mutación es letal al nacimiento (Shen y col. 2002). Esto sugiere que la expresión de GDNF y su receptor $GFR\alpha 1$ en las neuronas paravaginales sería de gran relevancia en términos de sobrevivencia neuronal. En nuestro grupo de trabajo se ha observado que en el período postparto las neuronas paravaginales expresan al receptor $GFR\alpha 1$ (Fig. 5) con mayor inmunoreactividad que en el grupo sin experiencia reproductiva (García-Villamar, 2013).

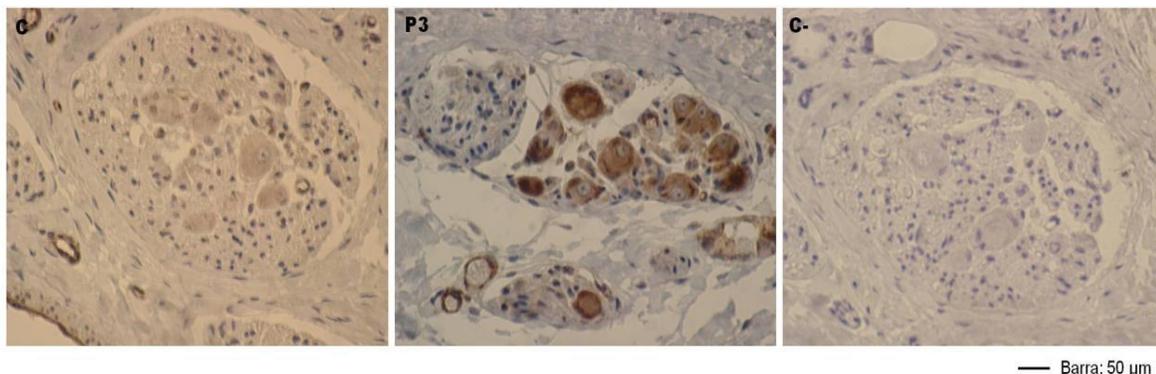


Fig 5. Efecto de la primiparidad sobre la expresión de $GFR\alpha 1$ en las neuronas paravaginales de la coneja. Fotomicrografías representativas de la expresión de anti- $GFR\alpha 1$ en el grupo control (C) y primíparas (P3) con tres días postparto, también se muestra el control negativo (C-) de la técnica de inmunohistoquímica. Barra 50 μ m. Figura obtenida de la tesis de García-Villamar 2013.

En el ganglio pélvico principal del macho de la rata se ha identificado la expresión del $GFR\alpha 2$ y el $GFR\alpha 3$, así como la expresión del GDNF y neurturina, lo que apoya las propuestas sobre la importancia de los miembros de la familia del GDNF en la inervación

autonómica del área pélvica (Laurikainen y col. 2000). De manera relevante, se ha mostrado que la denervación del nervio pélvico induce un incremento en la expresión de $GFR\alpha 1$ en la hasta dorsal media de la médula espinal en la región sacra (S1) en rata (Forrest y col. 2015). Esto sugiere que GDNF puede participar en los mecanismos de reparación ante una perturbación en nervios periféricos. En SNC, se ha observado que estradiol promueve la síntesis de GDNF en neuronas del hipotálamo, sustancia negra y el estriado (Campos y col. 2012; Ivanova y col. 2002). Es estos trabajos se sugiere que GDNF es uno de los mecanismo mediante el cual el estradiol protege a las neuronas ante un evento perturbador. Se desconoce el papel que pudieran tener GDNF y otros GFLs en las neuronas pélvicas de las hembras de mamíferos. Además del receptor $GFR\alpha 1$, también GDNF tiene como co-receptor de tirosina quinasa (RET), el cual se ha observado neuronas del hasta dorsal de la medula espinal en la región sacra en rata (Jongen y col. 2007; Masure y col. 1999). Se ha aceptado que los estrógenos promueven la sobrevivencia neuronal y protegen ante cambios propios de la edad a través de factores de crecimiento neuronal (Fiocchetti y col. 2012). Por lo que analizar la influencia de estrógenos en la expresión de GDNF y $GFR\alpha 1$ en las neuronas paravaginales de conejas ovariectomizadas y con restitución hormonal de estrógenos es de gran relevancia en los mecanismos de sobrevivencia neuronal.

Células de la glía satélite

Las células de la glía satélite (SGC) participan en el control del microambiente y regulan la transmisión sináptica, son también importantes en la formación de contactos sinápticos y se ha propuesto que regulan estados patológicos como la inflamación y el dolor (Hanani. 2005). Morfológicamente las SGC son láminas que rodean los cuerpos neuronales y forman una unidad funcional, puesto que también presentan receptores para neurotransmisores y moléculas bioactivas. Algunos de las señales que procesa son: CGRP, ATP, BDNF, TNF α , e IL-1b (Takeda y col. 2009). Se ha propuesto que las SGC pueden regular las concentraciones de iones y neurotransmisores en la neurona a través de mecanismos de comunicación cruzada entre neurona-neurona, neuronas-SGC y SGC con otras SGC en los ganglios sensoriales (Hanani. 2005). Las funciones de las células gliales en el sistema nervioso periférico se han relacionado con la sensibilidad al dolor en neuronas sensoriales. Se ha mostrado que la proteína ácido fibrilar de la glía (GFAP) es un marcador de SGC activadas tras un proceso inflamatorio. Su activación genera la liberación de citosinas

pro-inflamatorias como IL-1b en el modelo de dolor neuropático del ganglio trigémino. Aunque se desconoce el mecanismo preciso mediante el cual la SGC media la sensibilidad de los estímulos recibidos por las neuronas sensoriales, se conoce que una de las vías de activación está relacionada a la señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Además, se ha propuesto que la activación de SGC puede modificar la liberación de neurotransmisores como la sustancia P (SP) en el nervio trigémino tras un daño en el mismo (Takeda y col. 2009). Sin embargo, la activación de las SGC también puede ser promovida por los cambios hormonales como se ha propuesto en medula espinal lumbar de ratas hembras en la etapa adulta (Galvay y col. 2015). En nuestro grupo de trabajo se ha observado que la gestación y la primiparidad inducen una mayor expresión de GFAP en las células de la glía satélite de los ganglios paravaginales de la coneja (Fig. 6). Esto sugiere que las hormonas modulan la actividad de las SGC, desafortunadamente, en el periodo postparto se desconoce si la activación está relacionada a los cambios hormonales o al evento de la distensión vaginal durante el parto. Por lo tal motivo evidenciar la activación de la SGC en un modelo de restitución hormonal con estrógenos evidenciaría el papel de los estrógenos sobre la actividad de las SGC en los ganglios paravaginales.

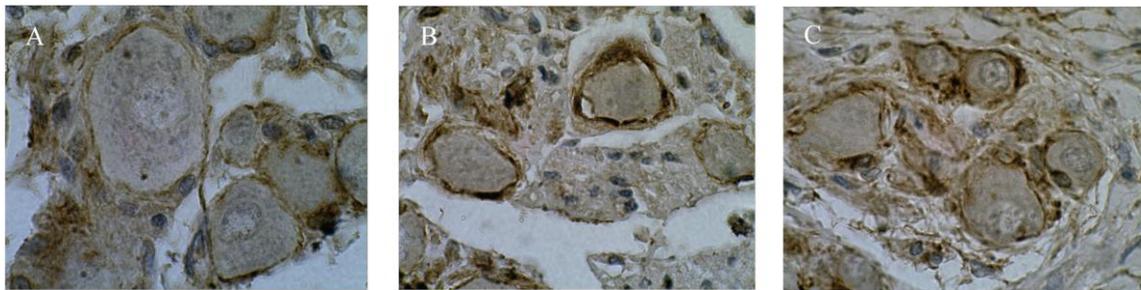


Figura 6. Expresión de la proteína ácido fibrilar de la glía (GFAP) en los ganglios paravaginales. Fotomicrografías representativas marcadas con anti-GFAP provenientes de conejas nulíparas (A), gestantes (B) primíparas (C) con tres días postparto. Figura obtenida de tesis de Hernández-Kelly, 2016.

JUSTIFICACIÓN

La experiencia reproductiva trae consigo una serie de cambios funcionales y estructurales en diferentes componentes del aparato urogenital, algunos de ellos son: musculatura estriada, componentes de pared vaginal (epitelio, músculo liso, estriado, colágeno) y la innervación en el plexo pélvico. Para describir las causalidades de estos cambios, se han propuesto factores mecánicos, como la distensión vaginal que resulta en hipoxia tisular y ruptura de músculos o nervios. Otra propuesta es el factor hormonal, que supone cambios adaptativos, estos modifican la estructura de algunos componentes de la pared vaginal y la función contráctil de los músculos que participan durante el parto vaginal.

Los cambios coordinados por las hormonas durante la gestación, forman parte de la plasticidad tisular que permite adaptarse ante el impacto que precede al parto. Previamente se mostró que la gestación disminuye el tamaño del soma neuronal de los ganglios paravaginales. De manera similar, la ovariectomía disminuye el tamaño del soma neuronal y el reemplazo hormonal (benzoato de estradiol) mantiene el tamaño del soma neuronal similar al tamaño que se observa en conejas nulíparas. Por lo que sería interesante evaluar como es la respuesta de los receptores de estrógenos en diferentes contextos hormonales. Además se desconoce si la testosterona participa en la plasticidad estructural a través de modificaciones en el número de neuritas o de células de la glía satélite. De acuerdo con esto, la participación de las células de la glía satélite, pueden generar factores de crecimiento como el GDNF y promover la sobrevivencia neuronal y el crecimiento neurítico, pero se desconoce si en ganglios pélvicos su síntesis puede ser estimulada por estrógenos. Por lo que, se propone evaluar la plasticidad neuronal en función de los contactos sinápticos, mediante el número de neuritas (axones y dendritas) y células de la glía satélite. Para ello se proponen diferentes contextos hormonales, el primero en condiciones fisiológicas naturales, como la gestación y en el postparto vaginal, y el segundo mediante la ovariectomía y el reemplazo hormonal (benzoato de estradiol) que nos dará información diferencial sobre los procesos que subyacen a la plasticidad en estos ganglios paravaginales.

HIPÓTESIS

Las acciones que ejercen los estrógenos sobre la plasticidad estructural de los ganglios paravaginales son semejantes a las observadas en la gestación y la primiparidad.

OBJETIVOS GENERALES

- I. Evaluar la relación del estado reproductivo sobre la plasticidad neuronal, expresión de receptores de estrógenos y andrógenos, aromatasa y β -tubulina en los ganglios paravaginales durante la gestación y en el periodo postparto de conejas.
- II. Evaluar la dependencia estrogénica sobre la morfometría, expresión de receptores a estrógenos y andrógenos, así como aromatasa y el factor de crecimiento GDNF en los ganglios paravaginales en conejas ovariectomizadas y con reemplazo hormonal (benzoato de estradiol).

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Conocer el efecto de la gestación y la primiparidad sobre la plasticidad estructural en los ganglios paravaginales mediante:
 - 1.1. La caracterización de la relación del tamaño del soma neuronal y el número de SGC por neurona mediante la tinción tricrómica de Masson.
 - 1.2. La evaluación de la plasticidad neurítica (número de neuritas emergentes y periféricos) a través del marcador de β -tubulina-III.
 - 1.3. La expresión de aromatasa, receptores de estrógenos y andrógenos mediante marcaje inmunohistoquímico en el núcleo y citoplasma neuronal.

2. Conocer la dependencia estrogénica en las neuronas paravaginales de conejas ovariectomizadas y tratadas con benzoato de estradiol en los ganglios paravaginales mediante:
 - 2.1. La caracterización del tamaño del soma neuronal y la frecuencia de neuronas que se asocian con un número determinado de SGCs (0-6) mediante la tinción tricrómica de Masson.
 - 2.2. La evaluación de la expresión de aromatasa, receptores de estrógenos y andrógenos mediante marcaje inmunohistoquímico en el núcleo y citoplasma neuronal.
 - 2.3. La expresión del factor de crecimiento GDNF y su receptor $GFR\alpha 1$ en neuronas y células de la glía satélite mediante marcadores inmunohistoquímicos.

METODOLOGÍA

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*. El uso y manejo de estos animales para experimentación fue aprobado por la Comisión de Bioética sobre el Uso de Animales de Laboratorio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta.

Experimento 1: Experiencia reproductiva

Se utilizaron 24 conejas que fueron distribuidas aleatoriamente en cuatro grupos: conejas vírgenes de 7 meses de edad (V, n = 6); gestantes a término con 30 días de gestación (G, n = 6); primíparas 3 días postparto (P3, n = 6) y 20 días postparto (P20, n = 6). Las conejas gestantes y primíparas se sometieron al protocolo de apareamiento (día 0 de gestación) a los seis meses de edad con machos sexualmente expertos. La gestación fue confirmada mediante palpación abdominal en el día 20 y fueron sacrificadas al día 30 de gestación. En los grupos de conejas primíparas, las crías fueron sacrificadas un día después del parto. Las conejas fueron sacrificadas mediante la sobredosis de pentobarbital sódico (60 mg / Kg de peso; i.p.).

Experimento 2: Dependencia estrogénica

Se utilizaron 18 conejas que fueron distribuidas aleatoriamente en tres grupos: conejas intactas de 12 meses de edad (control C, n=6), conejas ovariectomizadas (OVX, n = 6), OVX tratadas con reemplazo hormonal de benzoato de estradiol (OVX+BE, n = 6). La ovariectomía fue realizada bilateralmente utilizando una combinación de ketamina (0.2 ml/Kg,im) y xilazina (0.15 ml/Kg; i.m.). Las conejas OVX fueron implantadas con una cápsula vacía y en el grupo OVX+BE se implantó una cápsula de Silastic que contenía 70 mg de BE, 3.5 meses después de la ovariectomía. Ambos grupos fueron sacrificadas 1.5 meses después de la cirugía. El grupo C fue sacrificado a los 12 meses de edad, todas mediante por sobredosis de pentobarbital sódico (60 mg / Kg de peso, ip, Pisa).

Dissección de la vagina de la coneja

Se les realizó una incisión sobre la línea media, desde la cavidad abdominal hasta la vagina perineal, de acuerdo con el protocolo descrito por Martínez-Gómez y cols. (1997). Los músculos abdominales y el tejido adiposo del área fue removidos. Posteriormente, 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 y se extrajo el segmento pélvico de la vagina.

Técnica histológica

Después de la disección del conducto vaginal, se sumergió en el fijador de Bouin-Duboscq (ácido pícrico 0.39 %, formalina 26.66 %, ác. acético 6.66 %, etanol 80 %) durante 24 h. Posteriormente, el tejido fue deshidratado con diferentes soluciones de etanol en concentraciones ascendente (70, 80, 96 y 100%). Se realizó el aclarado en xileno y la inclusión en parafina (paraplast X-tra). Se obtuvieron cortes transversales de 7 μ m de grosor en micrótopo. Los cortes se recolectaron formando series de 3 cortes por portaobjeto, los cuales fueron recubiertos previamente con poli-L-lisina.

Tinción tricrómica de Masson

Se desparafinaron mediante soluciones de xilol y alcohol en concentraciones descendentes (100, 96, 80, 70, 60 %). A continuación fueron incubados en el fijador de Bouin-Duboscq acuoso (ácido pícrico 0.39 %, formalina 26.66 %, ác. acético 6.66 %) durante 12 horas. Posteriormente se tiñeron con hematoxilina de Weigert, Biebrich Scarlet-fushina ácida y azul de anilina. Los colorantes se fijaron con etanol amoniacal, ácido fosfomolibdílico-fosfotúngstico y etanol ácido. Se deshidrataron los cortes teñidos y se fijaron con medio de montaje. Las preparaciones histológicas se observaron con un microscopio óptico Nikon Eclipse Ni-U. Las fotografías fueron analizadas con el programa Image J y axio-vision 4.8, para evaluar todos los parámetros morfométricos.

Tamaño neuronal y el número de SGC por neurona.

Para la evaluación de estos parámetros se eligieron 20 cortes de la vagina pélvica (10 cortes antes de la desembocadura de la uretra y 10 cortes posteriores a esta), con una separación de 70 μ m entre los cortes, registrando solo el lado derecho del conducto vaginal (Fig. 7).

Para evaluar el efecto de la condición hormonal sobre el área neuronal y el número de SGC por neurona, se cuantificó el área y el número total de SGC en aquellas neuronas que se visualizaba el núcleo neuronal. Los datos presentados son la media de las áreas del soma neuronal y número promedio de SGC por neurona por individuo.

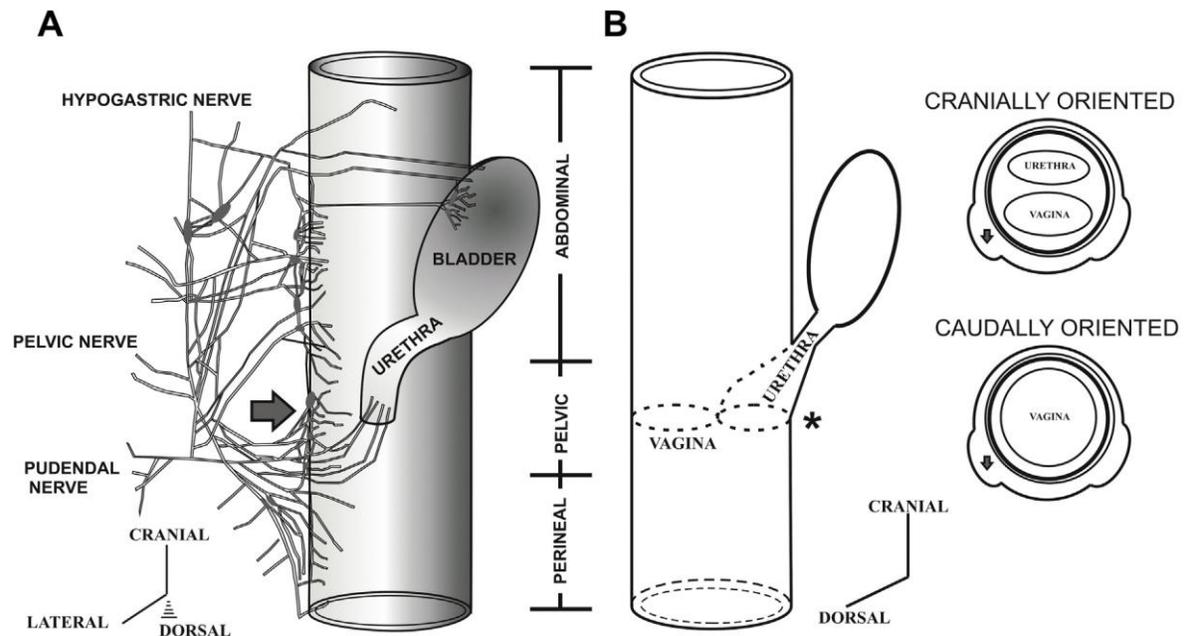


Figura 7. Esquema representativo del área muestreada en los ganglios paravaginales. Inervación del plexo pélvico (A), y representación de la uretra y el conducto vaginal (B), cortes transversales del conducto vaginal antes y después de la desembocadura de la uretra en el que se muestra la región donde se localizan los ganglios paravaginales. Figura obtenida de Castelán y col. 2013.

Marcaje inmunohistoquímico para los ganglios paravaginales

La expresión de β -tubulina-III, el receptores de estrógenos ($RE\alpha$ y β) y andrógenos (RA), aromatasa, el factor GDNF y su receptor $GFR\alpha 1$ así como GFAP fueron determinados en las neuronas paravaginales mediante inmunohistoquímica. Se seleccionó cortes previos a la desembocadura de la uretra para estas pruebas y se desparafinaron mediante soluciones de Xilol y alcohol etílico en concentraciones descendentes (100, 96, 80, 70, 60 %). A continuación, los cortes fueron incubados en citrato de sodio 100 mM (pH 6) durante tres noches y se calentaron en microondas durante dos minutos a potencia normal y 10 minutos a potencia 10. Posteriormente, se incubaron con H_2O_2 al 3% durante 30 min y se lavaron con solución buffer de fosfatos (PBS; 0.16 mM NaH_2PO_4 , 0.34 mM Na_2HPO_4 y 154 mM NaCl).

Los cortes se incubaron en solución de bloqueo (5% suero normal de cabra / en PBS adicionado con 0.3% triton X-100, PBS-T) y se removió el exceso lavando con (PBS-T). Los cortes fueron incubados durante 18 h a 4°C con el anticuerpo primario (ver Tabla 1) diluido en PBS-Triton (0.3% triton x-100 en PBS). Posteriormente, se realizó tres lavados con PBS-triton (0.3% triton x-100 en PBS) cada uno en lapsos de 10 minutos. Se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado diluido (ver Tabla 1) en PBS- Triton (0.3% triton x-100 en PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente. En seguida, se realizó tres lavados con PBS-triton (0.3% triton x-100 en PBS) cada uno en lapsos de 10 minutos. Una vez removido el excedente de anticuerpo secundario, se incubó con el complejo A-B durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó tres lavados con PBS-triton (0.3% triton x-100 en PBS) cada uno en lapsos de 10 minutos. Se reveló la reacción antigénica al adicionar diaminobencidina. Las preparaciones histológicas fueron observadas con un microscopio óptico Nikon Eclipse Ni-U para determinar la expresión de las proteínas de interés y el tiempo de reacción óptimo para cada tejido. La reacción se detuvo al lavar con abundante adición de PBS.

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Dilución	Número de Cat.	Laboratorio
rabbit policlonal IgG anti-aromatasa	1:500	NB-200-1596	Novus Biologicals
mouse monoclonal IgG anti-ER α	1:150	MA3-310	Thermo Scientific
mouse monoclonal IgG anti-ER β	1:150	MA1-23217	Thermo Scientific
rabbit policlonal IgG anti-AR	1:500	sc-816	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
mouse monoclonal IgG anti-GDNF	1:100	sc-13147	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
mouse monoclonal IgG anti-GFR α 1	1:100	sc-74045	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
goat polyclonal IgG anti-GFAP	1:100	sc-6170	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Mouse monoclonal IgG anti- β -tubulina III	1:250	ab-78078	Abcam
goat policlonal IgG anti-mouse IgG biotinilado	1:250	sc-2039	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
goat policlonal IgG anti-rabbit IgG biotinilado	1:2000	sc-2040	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
donkey policlonal IgG anti-goat IgG biotinilado	1:250	sc-2042	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Análisis inmunohistoquímico de los ganglios paravaginales

Para la evaluación del marcaje inmunohistoquímico se emplearon cortes provenientes de la región pélvica antes de la desembocadura de la uretra y se analizaron todos los ganglios por corte (derecho e izquierdo). Las preparaciones histológicas se observaron con un microscopio óptico Nikon Eclipse Ni-U y se obtuvieron fotografías con el objetivo de 40 y 100X. Las fotografías fueron analizadas con el programa Image J y axio-vision 4.8, para evaluar todos los parámetros morfométricos.

Neuritas con el marcador de β -tubulina-III (emergentes y periféricas).

Se analizaron las neuritas emergentes y periféricas en aquellas neuronas en las que se observa el núcleo neuronal. El criterio de selección para cuantificar neuritas emergentes fue observar que se originan en el soma de las neuronas. Mientras que las neuritas periféricas fueron aquellas que se encontraban en la cercanía del soma neuronal con una distancia menor a dos μ m. Los datos se expresan como el número promedio de neurita por neurona.

Expresión de aromatasa

La expresión de aromatasa se cuantificó como el número de somas neuronales positivos a la proteína con respecto al número total de neuronas por corte. Los resultados finales se expresan como el promedio del porcentaje de neuronas positivas.

Receptores de estrógenos de tipo alfa y beta

Se cuantifico la expresión de expresión receptores de estrógenos (RE α y β) en el núcleo de las neuronas paravaginales. Los datos se representaron como el porcentaje de núcleos positivos respecto al total de núcleos neuronales por corte.

Receptores de andrógenos

Se cuantificó la expresión de receptores de andrógenos (RA) en las terminales neuríticas, se calculó el porcentaje de neuronas que expresan al RA en neuritas con respecto al número total de neuronas por corte. Además, se cuantificó la expresión del RA en el núcleo neuronal y se calculó el porcentaje con respecto al número total de núcleos por corte. Y se evaluó el número de neuritas emergentes y periféricas por neurona.

Expresión del factor de crecimiento GDNF, GFR α 1 y GFAP

Se evaluó la expresión de marcaje anti-GDNF y anti- GFR α 1 en neuronas y células de la glía satélite. El marcaje anti-GFAP se evaluó mediante el conteo del número de neuronas que expresan el marcaje en la periferia, independiente a la intensidad de la reacción.

Análisis estadístico

Los datos de todos los experimentos fueron expresados como la media \pm ee, y la comparación de las variables cuantificadas en los distintos objetivos. Se realizó un análisis de varianza de una vía, seguido de una prueba de una prueba *post hoc Newman Keuls* para identificar las diferencias significativas entre grupos. Con tal fin se utilizó el programa de análisis estadístico Prism (v.4c, GraphPad).

RESULTADOS

Experimento 1

Área del soma neuronal y células de la glía satélite

El área del soma neuronal fue diferente entre los distintos grupos experimentales ($F_{(3,20)}=6.215$, $p=0.0037$, $n=6$). Al inspeccionar las diferencias entre grupos se encontró que el tamaño del soma neuronal en el grupo G disminuyó ($p=0.003$) con respecto al grupo V. Mientras que en el grupo P3 y 20 días (P20) no muestra diferencias con respecto del grupo V (Fig. 8). Por otra parte, el número encontrado de SGC por neurona no se observan diferencias ($F_{(3,12)}=0.7210$, $p=0.558$, $n=4$).

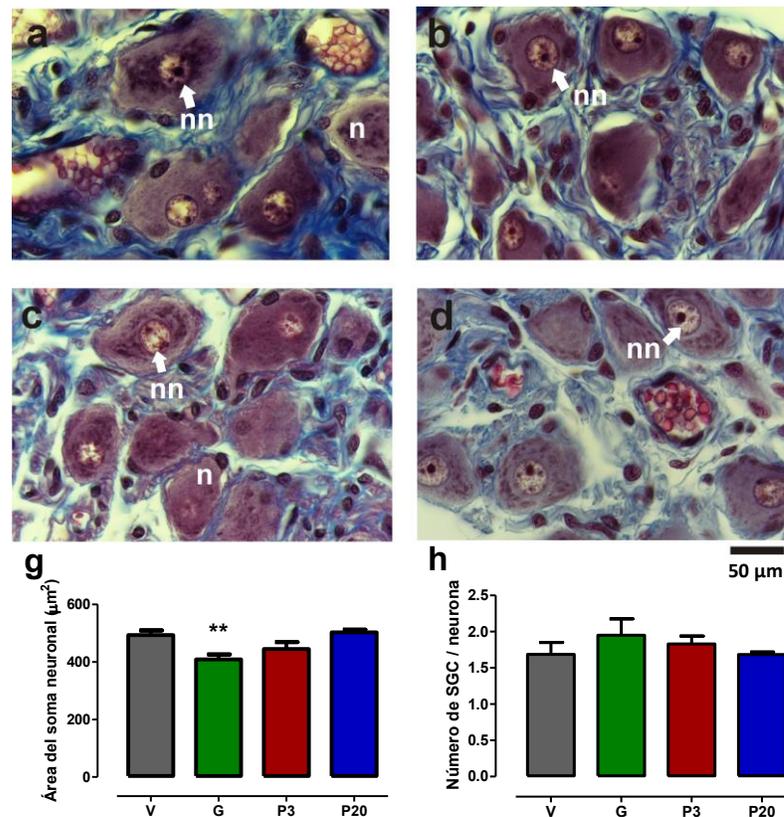


Fig 8. Ganglios paravaginales bajo el efecto de la gestación y la primiparidad. Fotomicrografías de neuronas de los ganglios paravaginales teñidas con tricrómica de Masson en conejas vírgenes (V, a), gestantes (G, b), primíparas con 3 días post-parto (P3, c), primíparas con 20 días postparto (P20, d). Las flechas señalan el núcleo neuronal (nn) y el soma de la neurona (n). Barra 50 µm. El área del soma neuronal (g) y el número de células de la glía satélite por neuronas (h) fue analizado mediante. Diferencias calculadas vs. el grupo V (**, $p=0.003$).

Tamaño del soma neuronal

Se analizó la distribución poblacional de acuerdo con el tamaño neuronal. Se establecieron tres puntos de corte, el primero de 50 a 350, el segundo de 351 a 650 y el tercero mayores a 651. Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA-una vía, seguida de la prueba de *Newman Keuls*. Se observó que la experiencia reproductiva representa diferencias entre el rango de 50-350 μm^2 ($F_{(3,20)}=4.214$, $p = 0.0183$). Se observa un incremento en el grupo G con respecto del grupo V ($p=0.01$). No se encontraron diferencias en el rango de 351-650 ($F_{(2,20)}=1.185$, $p= 0.3406$). Se encontraron diferencias respecto al rango de mayores de 651 ($F_{(3,20)}=7.332$, $p=0.0017$). El grupo G ($p=0.01$) y P3 ($p=0.001$) muestran una diferencia respecto del grupo V (Fig. 9).

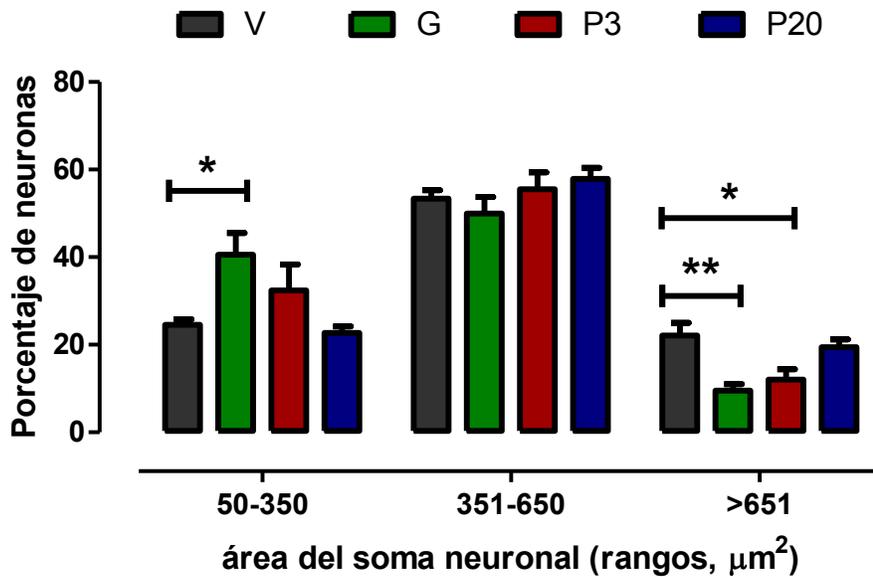


Figura 9. Porcentaje de neuronas distribuidas en 3 grupos de tamaño del área del soma neuronal. Muestras provenientes de conejas vírgenes (V, negra), gestantes (G, verde), primíparas con 3 días post-parto (P3, roja), primíparas con 20 días postparto (P20, azul). Prueba ANOVA-una vía, seguida de la prueba de *Newman Keuls*, (*, $p=0.01$; **, $p=0.001$). $n=6$.

Tamaño del soma neuronal y células de la glía satélite

En todos los grupos se observa una correlación positiva entre el número de células de la glía satélite (SGC) y el tamaño del soma. Se analizó las medias del número de SGC por área del soma neuronal y se calcularon diferencias estadísticas mediante la prueba *ANOVA*-una vía, seguida de una prueba *post-hoc* (Fig.10). No se observan diferencias entre los grupos experimentales para el rango de 50-350 μm^2 ($F_{(3,12)} = 1.386$ $p=0.2946$), tampoco para el de 351-650 ($F_{(3,12)} = 1.885$ $p=0.1910$), ni el de mayores de 651 entre estas dos variables no muestra diferencias, ($F_{(3,12)} = 1.464$ $p=0.2736$).

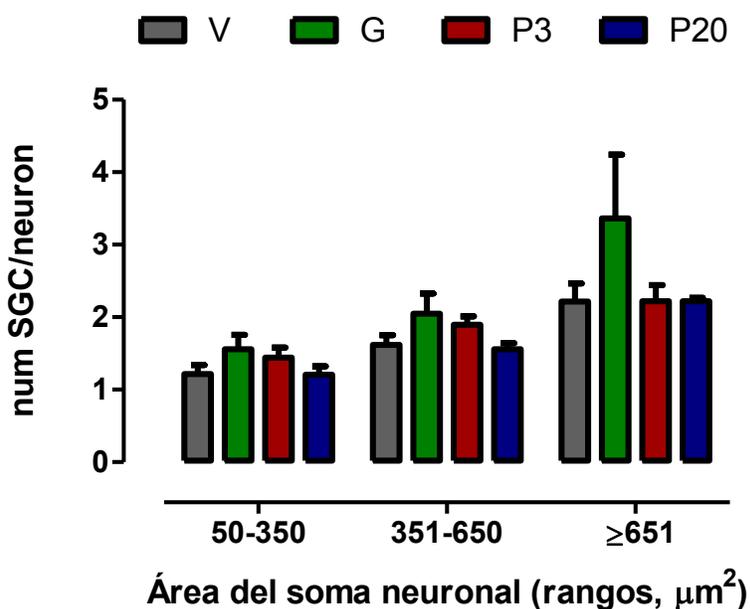


Figura 10. Correlación del área del soma neuronal y el número de células de la glía satélite (SGC) por neurona. Muestras de conejas vírgenes (V, negra), gestantes (G, verde), primíparas con 3 días post-parto (P3, roja), primíparas con 20 días postparto (P20, azul). Prueba *ANOVA*-una vía, seguida de la prueba de *Newman Keuls*.

Correlación entre el tamaño del soma neuronal y el número de células de la glía satélite

Se realizaron correlaciones entre el área del soma neuronal y el número de células de la glía satélite (Fig. 11). Los análisis muestran una correlación positiva para el grupo V (r spearman = 0.3535, $p= 0.0001$) y para el grupo G (r spearman = 0.2280, $p= 0.0001$). También se realizaron correlaciones en los grupos P3 y P20. Los análisis en el grupo P3 muestran una correlación positiva (r spearman = 0.2240, $p= 0.0001$) y también para el grupo P20 (r spearman = 0.3101, $p= 0.0001$).

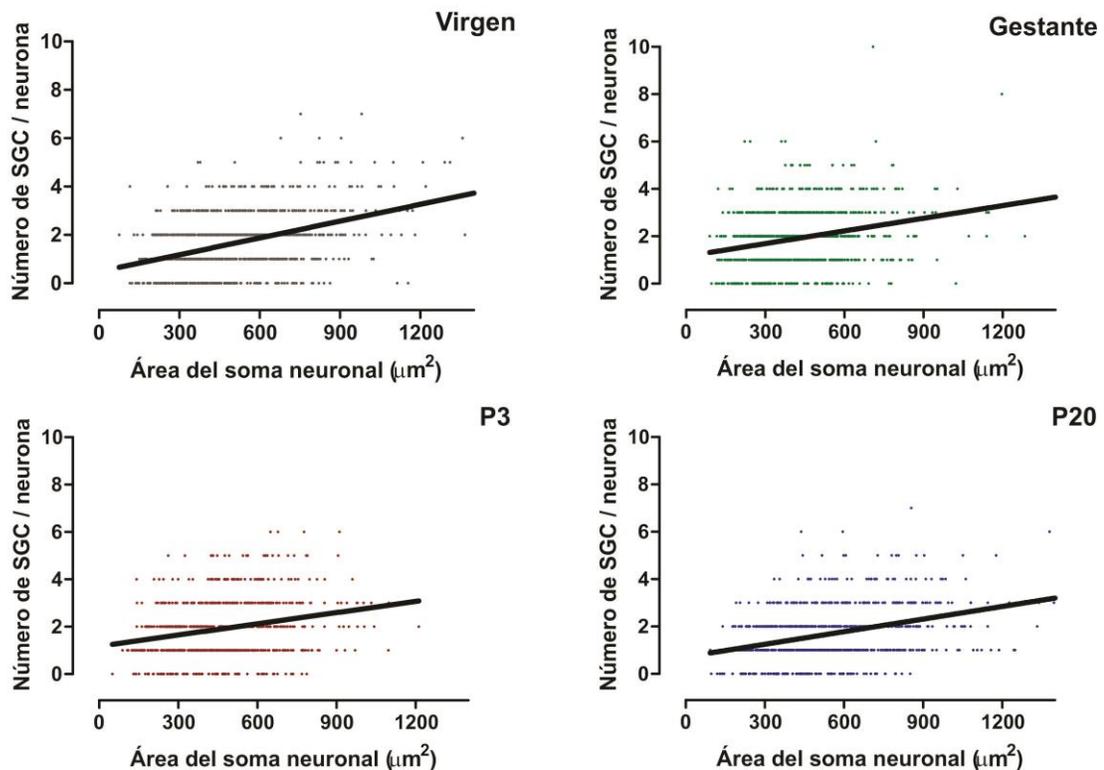


Figura 11. Distribución del número de células de la glía satélite por neurona con respecto del tamaño del área del soma neuronal. Muestras provenientes de conejas vírgenes (V, negra), gestantes (G, verde) primíparas de 3 días post-parto (P3, roja) y primíparas de 3 días post-parto (P20, azul). Prueba *r* de Spearman, con un total de 958 neuronas evaluadas en el grupo V, 907 en el grupo G, 764 en el grupo P3, y 832 en el grupo P20, $n=4$.

Área del soma neuronal evaluado con β -tubulina-III y número de neuritas

Con el marcaje de β -tubulina-III fue posible corroborar el tamaño del soma es diferente entre los grupos ($F_{(3,18)} = 5.106$, $p = 0.0099$, $n=6$), se observa una disminución entre el grupo G ($p=0.001$) y P3 ($p=0.05$) vs el grupo V. El grupo P20 no muestra diferencias vs el grupo V ($P \geq 0.05$) o el grupo P3 (Fig. 12). Con este mismo marcaje se cuantificó el número de neuritas totales (emergentes y periféricas) en las neuronas en los ganglios paravaginales. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F_{(3,19)} = 1.052$, $p = 0.3924$, $n=6$).

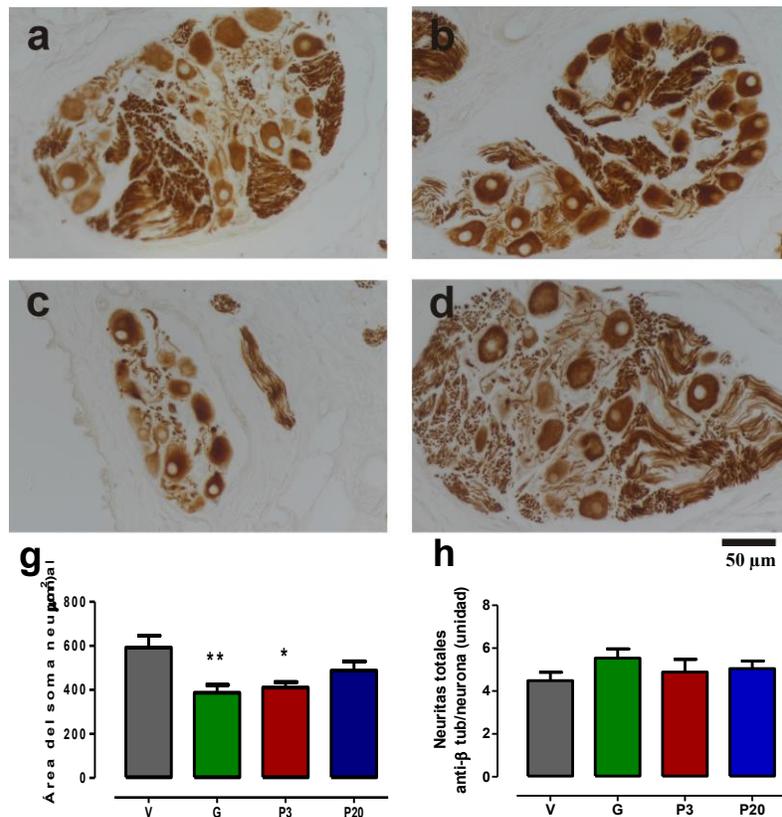


Figura 12. Fotomicrografías de neuronas de los ganglios paravaginales marcadas con β -tubulina-III. Immunohistoquímicas de muestras provenientes de conejas vírgenes (V, a), gestantes (G, b), primíparas con 3 días post-parto (P3, c), primíparas con 20 días postparto (P20, d). Área del soma neuronal evaluada con β -tubulina (g) y número de neuritas por neurona (h). Prueba ANOVA seguido de Newman Keuls. Diferencias expresadas como: * vs grupo control $p=0.05$; ** vs control $p=0.001$; vs G $p=0.01$; $n=6$.

Número de neuritas emergentes y periféricas

En el marcaje con β -tubulina-III muestra las prolongaciones neuríticas (axones y dendritas). Se cuantificaron los axones y dendritas emergentes de soma neuronal, así como aquellas que se encontraban en la periferia del soma con una distancia menor a los 2 μm (Fig. 13). Se observó una diferencia entre los grupos respecto al número de neuritas emergentes ($F_{(3,257)} = 10.96$, $p = 0.0001$, $n=6$). En comparación con el grupo G, el grupo V mostró un incremento ($p=0.001$), mientras que el grupo P3 y P20 son similares al grupo V, pero ambos diferentes al grupo G ($p=0.001$). Las neuritas periféricas al soma no muestran diferencias estadísticas ($p>0.05$).

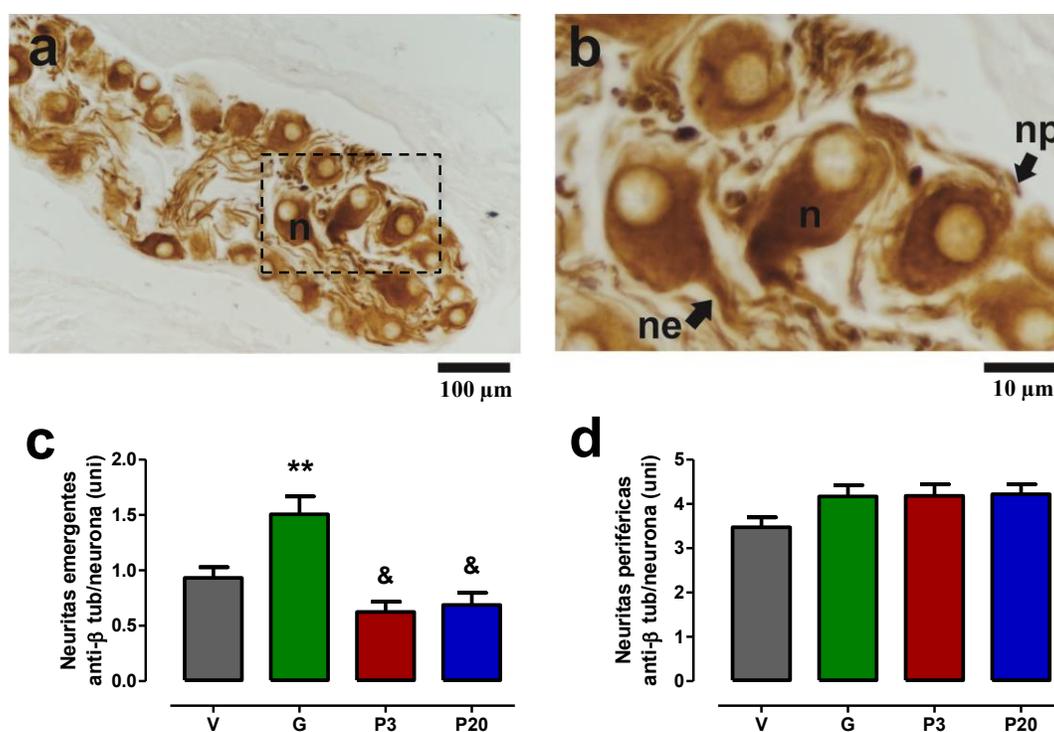


Figura 13. Fotomicrografías de neuronas (n) de los ganglios paravaginales marcadas con β -tubulina-III. Inmunohistoquímica provenientes en muestras de conejas gestantes (G, a) En un aumento de este mismo corte (b) es posible apreciar neuritas emergentes (ne) y periféricas (np) precedentes. Se cuantificó el número de neuritas emergentes por neurona (c) y número de neuritas periféricas por neurona (h) analizadas con el marcaje de β -tubulina-III. Diferencias estadísticas analizadas mediante prueba ANOVA seguido de Newman Keuls, expresadas como: * * vs control, $p=0.001$; & vs G, $p=0.01$; $n=6$. Barra, 100 μm .

Receptor de estrógenos de tipo alfa

Se observó marcaje para el receptor de estrógenos en el soma neuronal y en los núcleos neuronales y de las células de la glía satélite. Se cuantificó el número de neuronas que expresan al receptor en el núcleo (Fig. 14). Los resultados se expresan como el promedio porcentual, y fueron analizados mediante ANOVA seguida de Newman Keuls, no se observan diferencias significativas ($F_{(3,20)} = 1.546$, $p = 0.2336$, $n=6$).

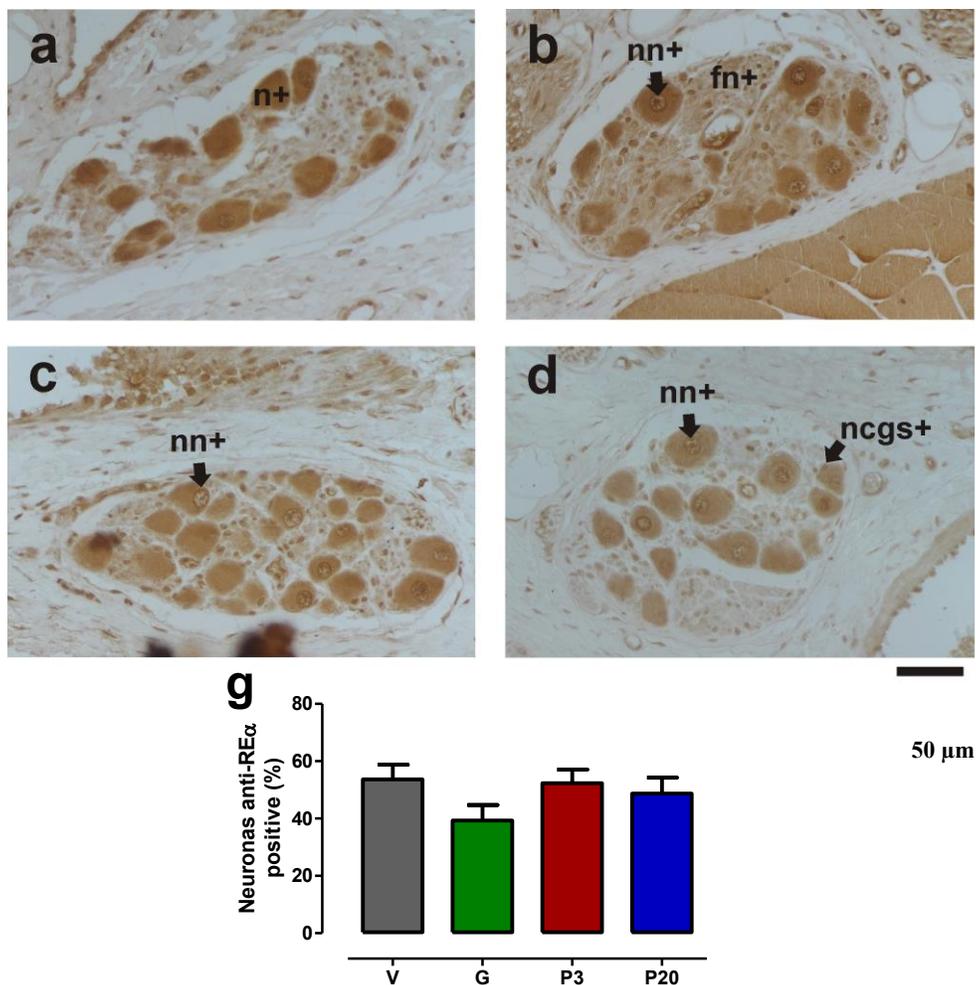


Figura 14. Análisis de los receptores de estrógenos alfa en los ganglios paravaginales bajo el efecto de la gestación y la primiparidad. Fotomicrografías representativas marcadas con anti-receptor de estrógenos alfa (anti-RE α) provenientes de conejas vírgenes (V, a), gestantes (G, b), primíparas con 3 días post-parto (P3, c) y primíparas con 20 días postparto (P20, d). Se indica en las fotomicrografías neuronas positivas (n+), fascículos nerviosos (fn+), los núcleos neuronales positivos (nn+), así como los núcleos de células de la glía satélite (SGC). Cuantificación del número de núcleos de neuronas anti-aromatasa positiva expresadas en porcentaje. Datos fueron analizados con la prueba de ANOVA seguidos de *Newman Keuls*. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, (n=6).

Receptor de estrógenos de tipo beta

Se observó marcaje para el receptor de estrógenos en el soma neuronal y en los núcleos neuronales y de las células de la glía satélite. Se cuantificó el número de neuronas que expresan al receptor en el núcleo (Fig. 15). Los resultados se expresan como el promedio porcentual y se analizaron mediante ANOVA seguida de Newman Keuls, no se observan diferencias significativas ($F_{(3,20)} = 2.078$, $p = 0.1356$, $n=6$).

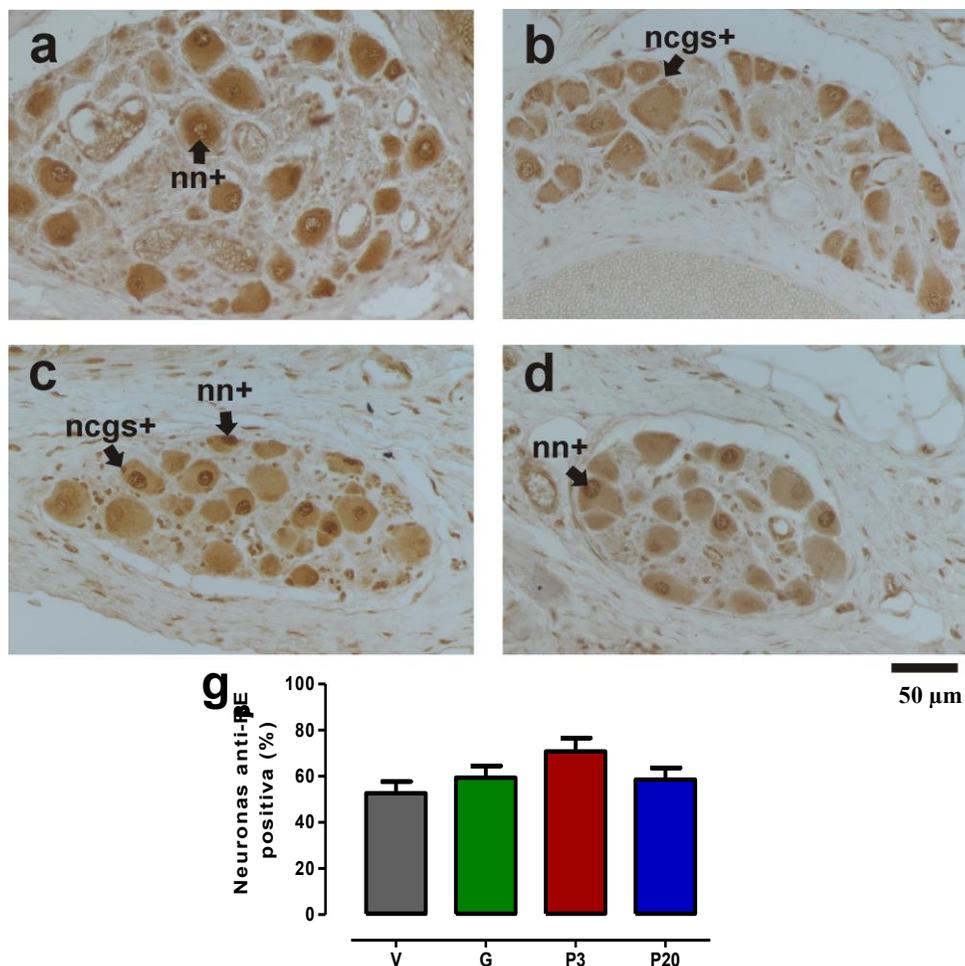


Figura 15. Análisis de los receptores de estrógenos beta en los ganglios paravaginales bajo el efecto de la gestación y la primiparidad. Fotomicrografías representativas marcadas con anti-receptor de estrógenos beta (anti-RE β) provenientes de conejas vírgenes (V, a), gestantes (G, b), primíparas con 3 días post-parto (P3, c) y primíparas con 20 días postparto (P20, d). Se indica en las fotomicrografías los núcleos neuronales positivos (nn+), así como los núcleos de células de la glía satélite (SGC). Cuantificación del número de núcleos de neuronas anti-aromatasa positiva expresadas en porcentaje. Datos fueron analizados con la prueba de ANOVA seguidos de *Newman Keuls*. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, ($n=6$).

Receptor de andrógenos

El marcaje de receptor de andrógenos permitió visualizar al receptor principalmente del soma neuronal y en algunos núcleos neuronales. Además se observaron neuritas (axones y/o dendritas) que emergían o que se encontraban en la periferia. Se cuantificaron las neuritas totales por neurona y los valores obtenidos en cada grupo son similares al grupo V ($F_{(3,16)} = 1.033$, $p = 0.4043$, $n=6$). Sin embargo, el número de neuritas emergentes por neurona muestra diferencias entre los grupos ($F_{(3,16)} = 3.276$, $p = 0.0484$, $n=6$), se observó una disminución en el grupo P20 vs el grupo V ($p=0.04$). Los grupos G y P3 son similares al grupo V (Fig. 16). Se analizó el número de neuritas periféricas por neurona y los datos muestran valores similares al grupo V ($F_{(3,16)} = 0.6216$, $p = 0.6112$, $n=6$).

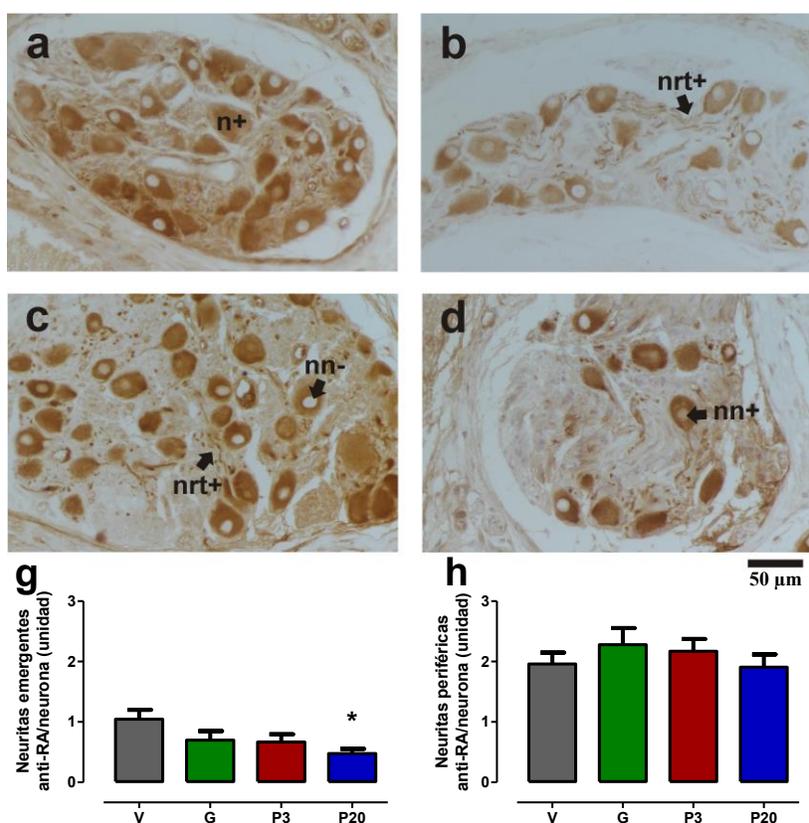


Fig 16. Análisis de los receptores de andrógenos en los ganglios paravaginales bajo el efecto de la gestación y la primiparidad. Fotomicrografías representativas marcadas con anti-receptor de andrógenos (anti-RA) provenientes de conejas vírgenes (V, a), gestantes (G, b), primíparas con 3 días post-parto (P3, c) y primíparas con 20 días postparto (P20, d). Se indica en las fotomicrografías las neuronas positivas (n+); el núcleo neuronal positivo (nn+) y negativo (nn-), así como las neuritas (nrt). Cuantificación del número de neuritas emergentes (g) y neuritas periféricas anti-RA por neurona. Diferencias estadísticas comparadas vs el grupo V se indican como: *, $p = 0.04$.

Aromatasa en neuronas paravaginales y células de la glía satélite

En análisis de aromatasa muestra neuronas y SGC con marcaje anti-aromatasa positivo en el citoplasma (Fig. 17). Se cuantificó el porcentaje de somas neuronales, los datos obtenidos de G, P3 y P20 muestran similitudes entre el grupo V ($F_{(3,20)} = 1.256$, $p = 0.3161$, $n=6$). Se analizó el porcentaje de SGC aromatasa positivas, los datos obtenidos de G, P3 y P20 muestran una similitud con el grupo V ($F_{(3,20)} = 0.9540$, $p = 0.4335$, $n=6$).

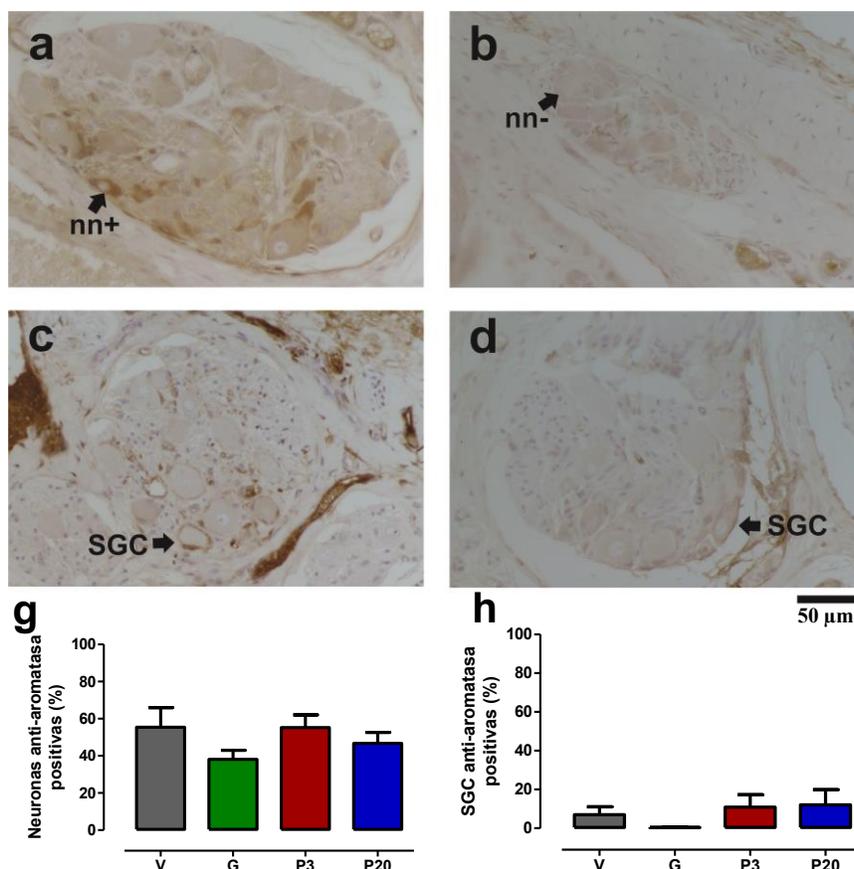


Figura 17. Análisis de la expresión de Aromatasa en los ganglios paravaginales bajo el efecto de la gestación y la primiparidad. Fotomicrografías representativas marcadas con anti-aromatasa (anti-aromatasa) provenientes de conejas vírgenes (V, a), gestantes (G, b), primíparas con 3 días post-parto (P3, c) y primíparas con 20 días postparto (P20, d). Se indica en las fotomicrografías las neuronas positivas (n+) y negativas (n-), así como células de la glía satélite (SGC). Cuantificación del número de neuronas (g) y SGC anti-aromatasa positiva expresadas en porcentaje. Datos fueron analizados con la prueba de ANOVA seguidos de *Newman Keuls*. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, ($n=6$).

Experimento 2: Dependencia estrogénica

Morfometría de los ganglios paravaginales en la ovariectomía

Para evaluar la dependencia del área del soma neuronal con respecto a los niveles de estrógenos se midió el área en cortes teñidos con tricrómica de Masson. Se observaron diferencias entre el tamaño del soma neuronal entre los grupos ($F_{(2,15)} = 15.82$, $P = 0.0002$). Se observó una disminución en el tamaño área del soma neuronal en el grupo OVX comparado con el grupo control ($p=0.0001$). El grupo OVX+BE muestra un área similar a la del grupo control (Fig. 18 d). La población de neuronas se dividió en tres subpoblaciones de acuerdo al tamaño neuronal y no se observaron diferencias entre los grupos ($F_{(2,45)} = 0.00$, $p=1.0$, $n=6$). El tamaño neuronal entre los grupos muestra diferencias ($F_{(2,45)} = 53.06$, $p=0.0001$, $n=6$). También se observó interacción entre el tamaño del soma y los grupos experimentales ($F_{(4,45)} = 28.26$, $p=0.0001$, $n=6$). La primera sub-población de 50 a 350 μm^2 , muestra un incremento de neuronas de este tamaño en el grupo G ($p=0.001$), mientras que el grupo C y el grupo OVX+BE no muestra diferencias vs el grupo C (Fig. 18 e).

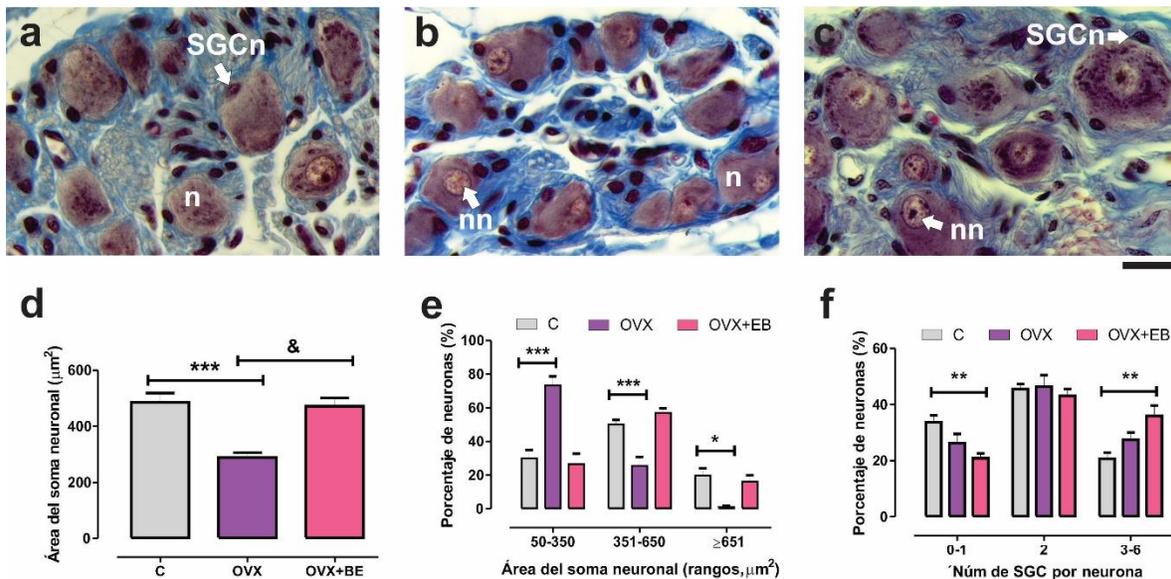


Figura 18. Fotomicrografías representativas de ganglios paravaginales. Provenientes de conejas control (a), ovariectomizada (b) y después del reemplazo hormonal con benzoato de estradiol (c). Área del soma neuronal (d), distribución en porcentajes del área neuronal (e). Porcentaje de neuronas que contienen de 0-1, 2 y de 3-6 SGC (f), en conejas C, control; OVX, ovariectomizada y OVX+BE, tras el tratamiento de benzoato de estradiol. (n), neurona; (nn), núcleo neuronal; (SGCn), núcleo de la célula glía satélite. Barra, 20 μm .

La segunda sub-población se evaluó entre 351 a 650 μm^2 , el grupo C y el OVX+BE son similares, el grupo OVX disminuyó su población en este rango. En la subpoblación de las neuronas mayores a 651 μm^2 el grupo C y OVX+BE son similares en el porcentaje de neuronas, mientras que el grupo OVX disminuyó. Se analizó también número de células de la glía satélite (SGC) por neurona, los datos se muestran como el porcentaje de neuronas que presentan de 0-1 SGC, dos SGC o de 3-6 SGC (Fig. 19 f), se observa diferencias entre número de SGC que presentan las neuronas ($F_{(2,45)} = 38.86$, $p = 0.0001$, $n=6$). No se observan diferencias entre los grupos ($F_{(4,45)} = 0.00$, $p = 1.0$, $n=6$). Existe una interacción extremadamente significativa ($F_{(4,45)} = 6.51$, $p = 0.0003$, $n=6$). Las diferencias se encontraron entre OVX+EB en el grupo de 0-1 SGC y en el de 3-6 SGC ($p=0.001$).

Niveles séricos de estradiol y testosterona

Los niveles séricos de estradiol muestran cambios entre los grupos ($F_{(2,15)} = 13.39$, $p = 0.0005$, $n=6$). Los datos se representan como la media \pm ee, ANOVA-una vía fue empleada, seguido de la prueba de *Newman Keuls*. El grupo OVX y C ($p > 0.05$) son similares, el grupo OVX+BE incrementó con respecto del grupo C ($p = 0.0001$). Los niveles séricos de testosterona muestran diferencias entre los grupos ($F_{(2,15)} = 13.98$, $p = 0.0004$, $n=6$), los niveles séricos de testosterona en el grupo OVX ($p = 0.001$) y OVX+BE ($p = 0.01$) son inferiores con respecto del grupo C (Fig. 19).

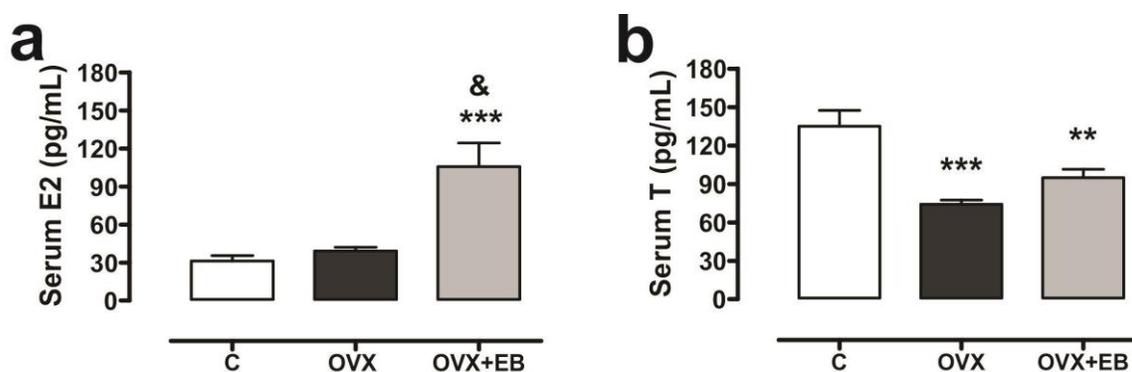


Figura 19. Efecto de la ovariectomía y la administración de benzoato de estradiol sobre la concentración sérica de estradiol en la coneja. A. Concentración sérica de estradiol (a) y testosterona (b) en conejas control (C), ovariectomizadas (OVX) y después de la administración de benzoato de estradiol (OVX+EB), diferencias estadísticas se muestran como: **, $p < 0.01$ y ***, $p < 0.001$.

Receptores de estrógenos alfa

Se observó marcaje para el receptor de estrógenos en el soma neuronal y en los núcleos neuronales y de las células de la glía satélite. Se cuantificó el número de neuronas que expresan al receptor en el núcleo (Fig. 20). Los resultados se expresan como el promedio porcentual y se analizaron mediante ANOVA seguida de *Newman Keuls*, no se observan diferencias ($F_{(2,15)} = 2.421$, $P = 0.1227$).

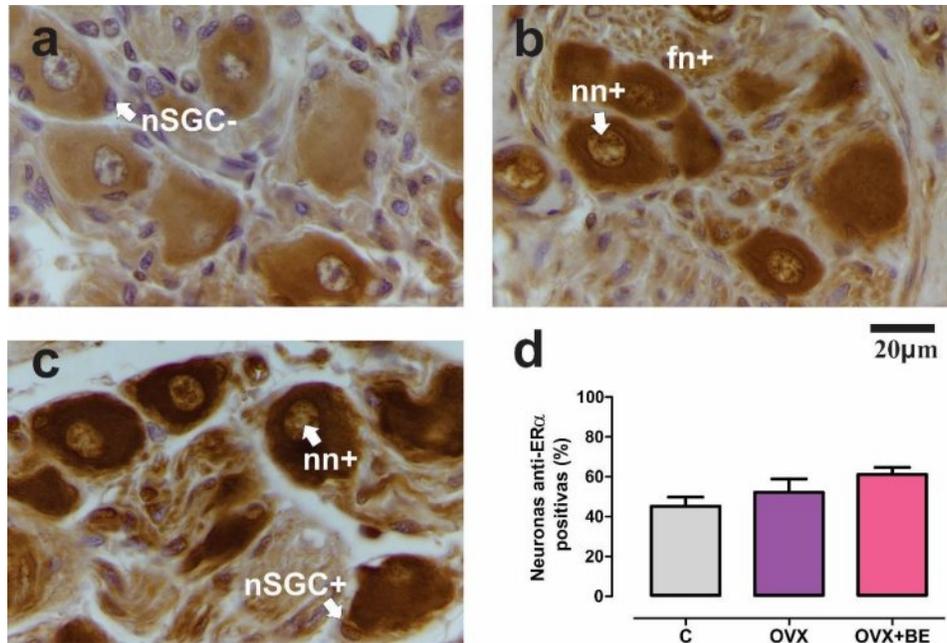


Figura 20. Fotomicrografías representativas marcadas con anti-receptor de estrógenos alfa (anti-RE α). Provenientes de conejas control (a), ovariectomizada (b) y después del reemplazo hormonal con benzoato de estradiol (c) Se indica en las fotomicrografías fascículos nerviosos (fn+), los núcleos neuronales positivos (nn+), así como los núcleos de células de la glía satélite positivos (nSGC+). Barra 20 μ m

Receptores de estrógenos beta

Se observó marcaje para el receptor de estrógenos beta (RE β) en el soma neuronal y en los núcleos neuronales y de las células de la glía satélite. Se cuantificó el número de neuronas que expresan al receptor en el núcleo (Fig. 21). Los resultados se expresan como el promedio porcentual y se analizaron mediante ANOVA seguida de Newman Keuls, no se observan diferencias ($F_{(2,15)} = 2.177$, $P = 0.1428$).

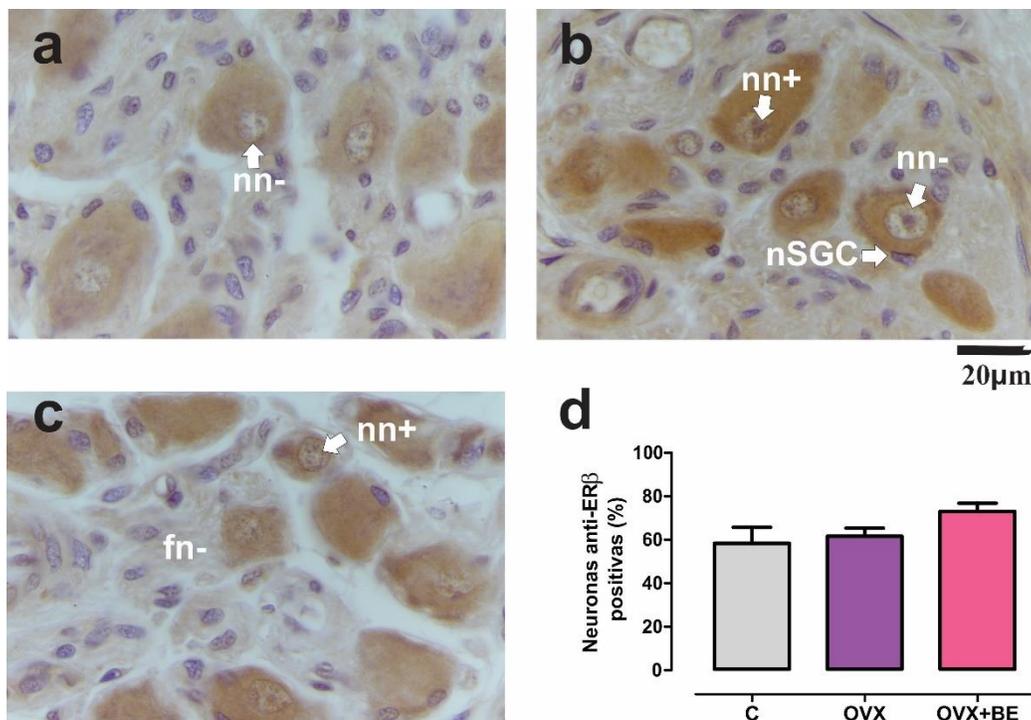


Figura 21. Fotomicrografías representativas marcadas con anti-receptor de estrógenos beta (anti-RE β). Provenientes de conejas control (a), ovariectomizada (b) y después del reemplazo hormonal con benzoato de estradiol (c). Se indica en las fotomicrografías los núcleos neuronales positivos (nn+), núcleos neuronales negativos (nn-), fascículos nerviosos negativos (fn-), así como los núcleos de células de la glía satélite (SGC). Cuantificación del número de núcleos de neuronas anti-RE β positiva expresadas en porcentaje. Datos fueron analizados con la prueba de ANOVA seguidos de *Newman Keuls*. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, (n=6).

Receptor de andrógenos

Se observó marcaje para el receptor de andrógenos (RA) en el soma neuronal y en los núcleos neuronales y en las prolongaciones neuríticas (Fig. 22). Los resultados se expresan como el promedio porcentual y se analizaron mediante *ANOVA* seguida de *Newman Keuls*. Se cuantificó el número de neuronas que expresan al receptor en el núcleo, no se observan diferencias ($F_{(2,15)} = 0.8261$, $P = 0.4567$). Se cuantificó el número de neuronas que expresan neuritas y se observó diferencias entre los grupos ($F_{(2,15)} = 12.46$, $P = 0.0006$). Los grupos OVX (0.01) y OVX+BE ($p=0.001$) incrementaron el porcentaje de neuronas que expresan neuritas con respecto del grupo control.

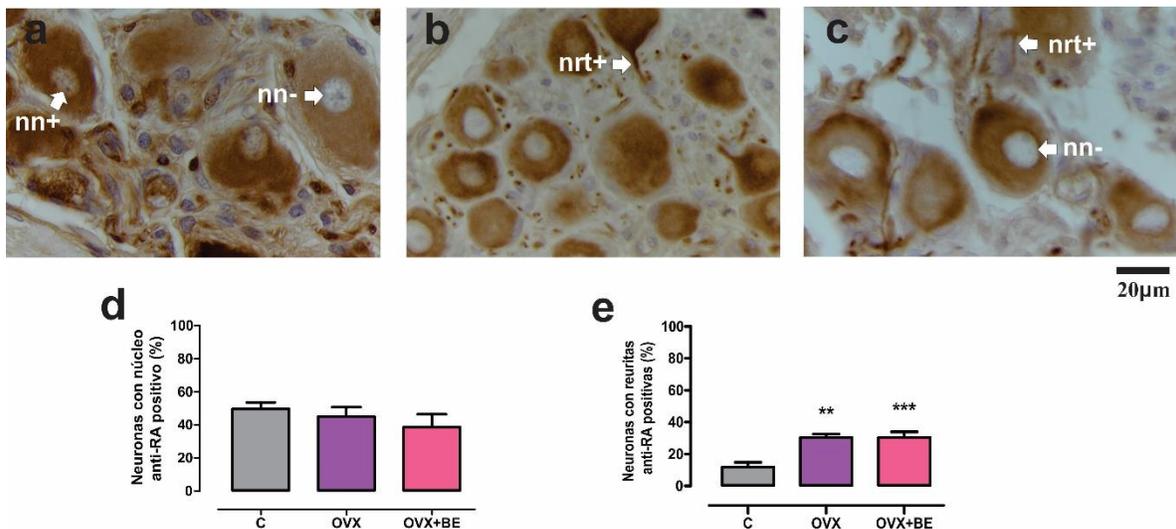


Figura 22. Fotomicrografías representativas de receptores de andrógenos en los ganglios paravaginales. Marcaje anti-receptor de andrógenos (anti-RA) en neuronas provenientes de conejas control (a), ovariectomizada (b) y después el reemplazo hormonal con benzoato de estradiol (c). Porcentaje de neuronas que expresan anti-RA en el soma (d), porcentaje de neuronas que expresan anti-RA en las neuritas (e) en conejas C, control; OVX, ovariectomizada y OVX+BE. (-nn), núcleo neuronal-marcaje negativo; (+nn), núcleo neuronal- marcaje positivo; (+nrt) neurita-marcaje positivo. Barra, 20 μm. Analizados con ANOVA 1 vía y pos hoc Newman Keuls. (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ vs el grupo control).

Expresión de aromatasa en neuronas y SGC

El marcaje anti-aromatasa se observó en el soma neuronal y algunos núcleos de las células de la glía satélite (Fig. 23). Se cuantificó el número de neuronas que expresan aromatasa en el soma neuronal y se observaron diferencias entre los grupos ($F_{(2,15)} = 12.46$, $P = 0.0006$, $n=6$). Se observó un incremento en el grupo OVX con respecto del grupo C ($p=0.001$). El grupo OVX+BE es similar al grupo control pero estadísticamente diferente del grupo OVX ($p=0.01$).

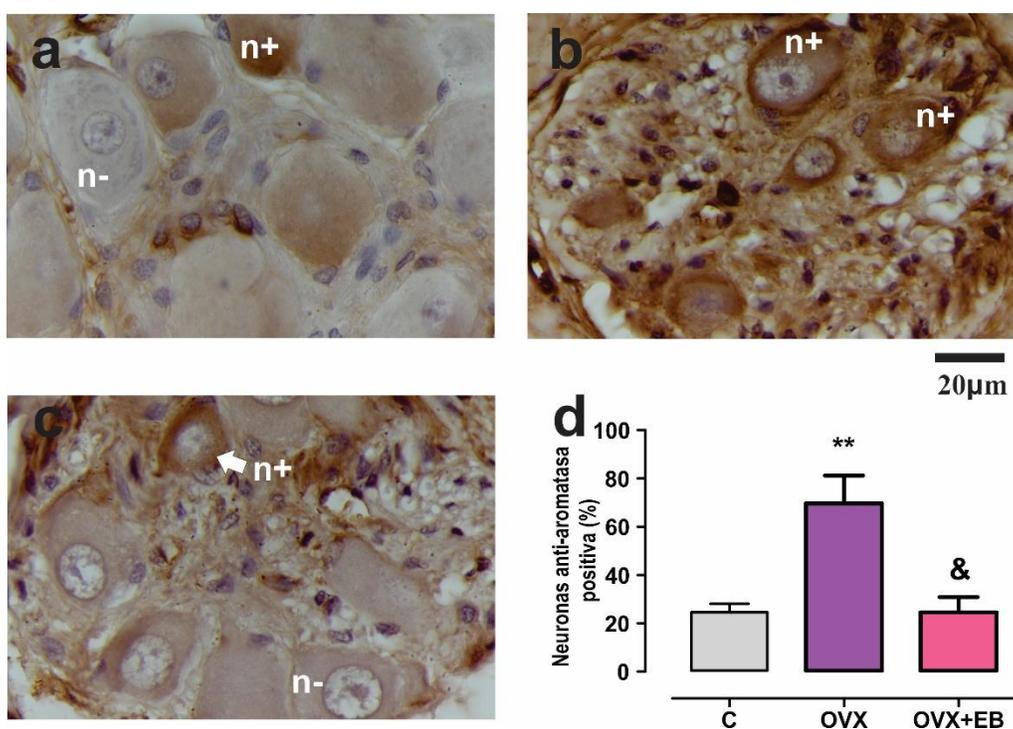


Figura 23. Fotomicrografías representativas marcadas con anti-aromatasa. Provenientes de conejas control (a), ovariectomizada (b) y después el reemplazo hormonal con benzoato de estradiol (c). Se indica en las fotomicrografías las neuronas positivas (n+) y negativas (n-), así como células de la glía satélite (SGC). Cuantificación del número de neuronas (g) y SGC anti-aromatasa positiva expresadas en porcentaje. Datos fueron analizados con la prueba de ANOVA seguidos de *Newman Keuls* (** $p < 0.001$ vs el grupo control y &, $p < 0.01$ vs el grupo gestante; $n=6$).

Células de la glía satélite (GFAP)

Se observó marcaje para la proteína ácido fibrilar de la glía en el citoplasma de las células de la glía satélite. En el grupo control se observó un marcaje difuso en la periferia del soma neuronal. El grupo OVX muestra un marcaje más definido anti-GFAP con respecto del grupo control. Esta marca se intensifica en todas la neuronas provenientes del grupo OVX+BE (Fig. 24). Se cuantificó el porcentaje de neuronas que expresan anti-GFAP las células de la glía satélite y se observó valores similares entre el grupo OVX y OVX+BE con respecto del grupo C ($F_{(2,12)} = 1.302$, $P = 0.3079$).

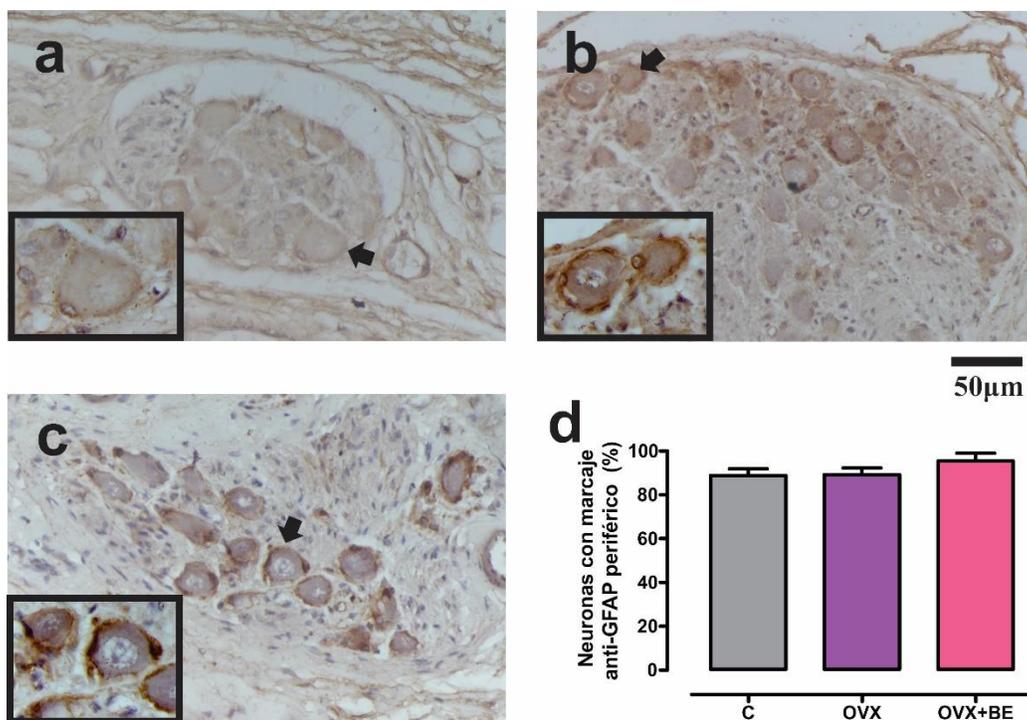


Figura 24. Fotomicrografías representativas marcadas con anti-GFAP. Provenientes de conejas control (a), ovariectomizada (b) y después del reemplazo hormonal con benzoato de estradiol (c). Se indica en las fotomicrografías las SGC positivas con una flecha y en el inserto de la imagen se aprecia un aumento del 800%. Cuantificación del número de neuronas con marcaje anti-GFAP en la periferia (d) Datos fueron analizados con la prueba de ANOVA seguidos de Newman Keuls. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, (n=5).

GDNF y GFR α 1 en neuronas paravaginales

Se observó marcaje para el factor de crecimiento GDNF en el soma neuronal y presumiblemente en las células de la glía satélite. El grupo OVX muestra un mayor marcaje anti-GDNF y esta marca se mantiene en el soma de las neuronas provenientes del grupo OVX+BE. Además en el grupo OVX+BE se observa un marcaje de los núcleos de las células de la glía y el contorno del marcaje del soma neuronal (Fig. 25). Con respecto al marcaje anti-GFR α 1 se observó marcaje en el soma neuronal y presumiblemente en el citoplasma de las células de la glía satélite. Los grupos OVX y OVX+BE muestran un marcaje con mayor intensidad en el soma neuronal vs el grupo control. No se observan núcleos de células de la glía satélite con marcaje anti- GFR α 1.

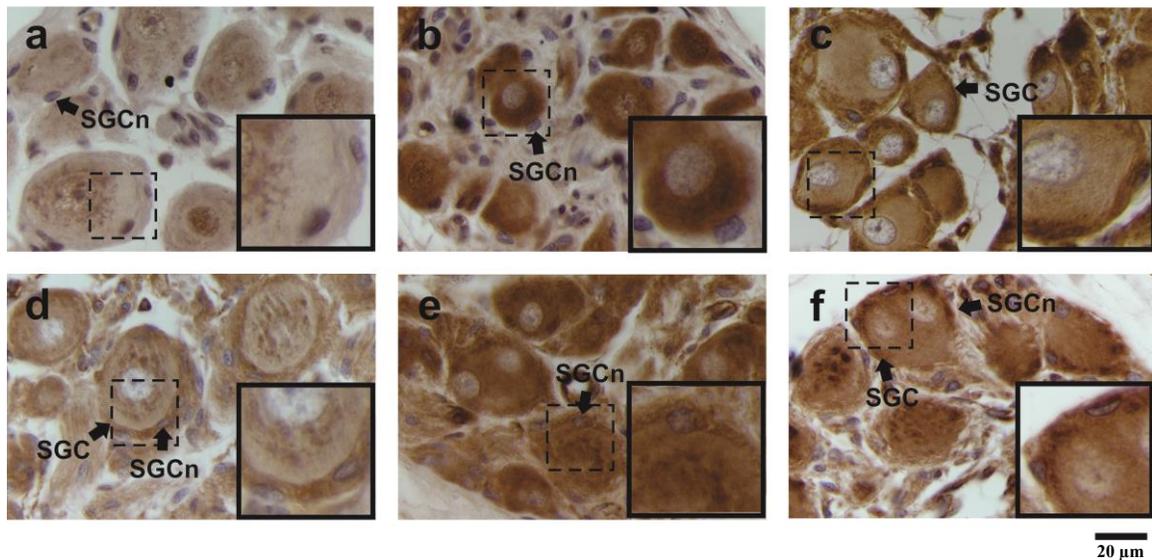


Figura 25. Fotomicrografías representativas de marcaje anti-GDNF y anti-GFR α -1 expresados en neuronas y células de la glía satélite. Secciones marcadas con anti-GDNF (a,b,c) y GFR α -1 (d,e,f) provenientes de conejas control (a,d), ovariectomizada (b, e) y restituidas con benzoato de estradiol (c, f). Se indica células de la glía satélite (SGC) y los núcleos de la célula glía satélite (SGCn). Barra, 20 μ m.

DISCUSIÓN

Tamaño del soma neuronal en diferentes estados reproductivos

Se ha propuesto que los cambios debidos a la edad, estado reproductivo y niveles hormonales pueden afectar el tamaño de las neuronas ganglionares (Castelán y col. 2013). Nuestros datos acerca del tamaño del soma neuronal muestran que al final de la gestación, se presenta una disminución de tamaño y se mantiene este efecto durante la etapa temprana postparto (P3). Debido a que 20 días después del parto se recupera el tamaño del soma neuronal, se sugiere que el tamaño neuronal es dependiente de los niveles hormonales y no ha así del estímulo mecánico que precede al parto. Además, de las modificaciones en los niveles de hormonas gonadales o placentarias, otros sistemas son activados para inducir el parto, uno de ellos es en sistema inmune. Durante la etapa final de la gestación, se ha propuesto un incremento citocinas pro-inflamatorias, dentro de las que se ha propuesto a la interleucina 1B (IL-1B) (Ishiguro y col. 2016). La IL-1B favorece las contracciones uterinas, la dilatación cervical y robustece la respuesta inmune. Por otra parte, en el ganglio trigémino, se ha mostrado que las neuronas de pequeño diámetro (10-30 μm) responden mejor ante un proceso inflamatorio y se induce la despolarización de la membrana (Takeda y col. 2009). En estas neuronas se ha caracterizado la liberación de IL-1B así como la expresión de GFAP en las células de la glía satélite. Entonces, considerando la reducción del tamaño del soma como consecuencia de señales inmuno-endocrinas, es posible sugerir que neuronas de menor tamaño serán quienes se adaptan mejor durante el evento del parto. Hanani (2005) ha propuesto que las neuronas de menor volumen satisfacen de mejor manera sus necesidades metabólicas en comparación con las grandes. Dado que el número de SGCs es menor en las neuronas pequeñas de diferentes ganglios periféricos y considerando que las SGC constituyen parte del soporte metabólico. Nosotros sugerimos que la reducción del tamaño del soma es parte de la plasticidad estructural en función de reducir la actividad metabólica, sin embargo esta última aseveración aún no ha sido evaluada. Se ha observado una correlación positiva entre el tamaño del cuerpo neuronal y el número SGC en neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal de la región lumbar de rata (Nadeau y col. 2014). Nuestros resultados también demuestran una correlación entre el tamaño del soma neuronal y el número de SGC.

Plasticidad estructural en las neuritas de las neuronas paravaginales

Los cambios estructurales también involucran las proyecciones neuríticas que emergen o que rodean al soma neuronal. Se ha sugerido que las neuronas de mayor tamaño dan origen a fibras nerviosas mielinizadas y estas conducen mejor señales (Priestley y col. 2002). En nuestros resultados observamos que el grupo G y P3, la reducción del tamaño del soma, responde a un incremento en el número de neuritas emergentes, aquellas que sus prolongaciones se asocian directamente con el soma de la neurona. Estos segmentos iniciales del axón se han sugerido como compartimentos ideales para iniciar el potencial de acción gracias a sus características biofísicas (Kuba. 2016). La presencia de canales de Na⁺ en este segmento favorece el potencial de acción dado por eventos simultáneos de contactos axo-axónicos y axo-somáticos (Kole y Stuart. 2012). Por lo cual proponemos que el incremento en el número de neuritas emergentes en el grupo G, forma parte de la plasticidad estructural que mantiene la comunicación sináptica como respuesta a la disminución del tamaño del soma (Fig. 25). En ganglios de la raíz dorsal se ha mostrado que la retracción neurítica provocada por exposición a toxina pertussis tiene un impacto mayor en las neuronas de más grandes (Ng y col. 2010). Por lo cual se sugiere evaluar el número de neuritas emergentes en las neuronas pequeñas (menores a 350 μm^2) o grandes (mayores a 650 μm^2), para identificar si tienen el mismo impacto en toda la población.

Expresión de receptores de estrógenos

La localización de receptores de estrógenos alfa y beta no parece ser modificada por efecto del estado reproductivo. Los datos provenientes de la inmunolocalización de los dos subtipos son similares en los grupos G, P3 y P20, comparada con el grupo V. Es importante reconocer que se contabilizó su expresión en el núcleo neuronal, pero una limitante de esta técnica es que nos imposibilita saber cuánto receptor se está expresando. También debemos considerar la posible participación de otros receptores de estrógenos como el GRP30, un receptor de membrana del cual se desconoce su presencia en las neuronas paravaginales. Además, la expresión de los receptores puede ser independiente de su activación y las funciones que desencadenan los cambios hormonales de estrógenos circulantes (López-García. 2013). Desafortunadamente, la técnica de inmunohistoquímica nos impide valorar la cantidad de receptor que la neurona está expresando cada uno de los compartimentos celulares.

Expresión de receptores de andrógenos en las neuronas paravaginales

El tamaño del soma en varios trabajos ha sido asociado a los niveles de andrógenos circulantes (Purves-Tyson y col. 2007; Pozuelo y col. 2010). En nuestras observaciones, se ha encontrado que el receptor de andrógenos (RA) se encuentra ubicado en el núcleo y soma neuronal. De manera similar se ha observado en neuronas del ganglio pélvico principal en rata (Pozuelo y col. 2010). Pozuelo y colaboradores han sugerido que el receptor de andrógenos influye sobre las características de la membrana neuronal y sobre los impulsos que reciben. En este estudio fue posible la observar terminales nerviosas marcadas únicamente en ganglios y no así en fascículos nerviosos. Por lo que se sugiere que el receptor también debe estar presente en las terminales nerviosas y posiblemente module la comunicación sináptica. Se analizó el número de neuronas que presentan terminaciones neuríticas emergentes y se observó una disminución en el grupo P20 con el marcador anti-RA. Lo cual podría ser una respuesta debida a una remodelación estructural debida al parto. Sin embargo, cuando se observó el número de neuritas evaluada mediante la proteína β -tubulina-III, se puede notar que no existen diferencias en el número de neuritas emergentes entre el grupo P20 y V, sin embargo, el grupo G presenta un incremento. Esto sugiere que el RA no se expresa en todas las neuritas, probablemente solo en una parte de la población, la cual podría ser más sensible a cambios de testosterona circulantes. Se ha demostrado en la administración de testosterona y DHT puede influenciar en la arborización y crecimiento neurítico en cultivo de ganglios pélvicos de rata (Purves-Tyson, 2007). A pesar de no observar cambios en el marcaje de neuritas RA positivas entre el grupo G y V, no podemos descartar que el incremento de neuritas emergentes observado con el marcaje de β -tubulina-III sea promovido por andrógenos.

Expresión de aromatasa en las neuronas paravaginales

En la coneja, los ganglios paravaginales provienen de las ramificaciones de S3 (Cruz y col. 2017), aunque la mayoría es ChAT positivos (Castelán y col. 2013) los receptores colinérgicos y otros receptores considerados del sistema parasimpático podrían variar. Se ha observado que neuronas que expresan diferentes neurotransmisores en SNC pueden responden expresar aromatasa diferencialmente. Algunos son estrógenos dependientes y pueden sintetizar sus propias hormonas. Debido a que los ganglios paravaginales son

dependientes de hormonas la expresión de aromatasa en las neuronas para mantener sus funciones estrogénicas es de gran relevancia. Sin embargo, durante la gestación no se observa la expresión de aromatasa en ninguna de las estructuras que conforman a los ganglios paravaginales. Esto se explica por el incremento de las concentraciones de estradiol sérica al finalizar la gestación. Se ha mostrado en otros trabajos que el estradiol puede apagar la transcripción de aromatasa en otros sistemas celulares. Después del parto se observa la expresión de aromatasa en la periferia de las neuronas paravaginales, presumiblemente en el citoplasma de las células de la glía satélite. Dicha observación deja a relucir que el sistema neurona-glía es sumamente sensible a los niveles locales de estradiol y posiblemente las células glías satélite activen sus mecanismos de síntesis de estrógenos antes que la neurona.

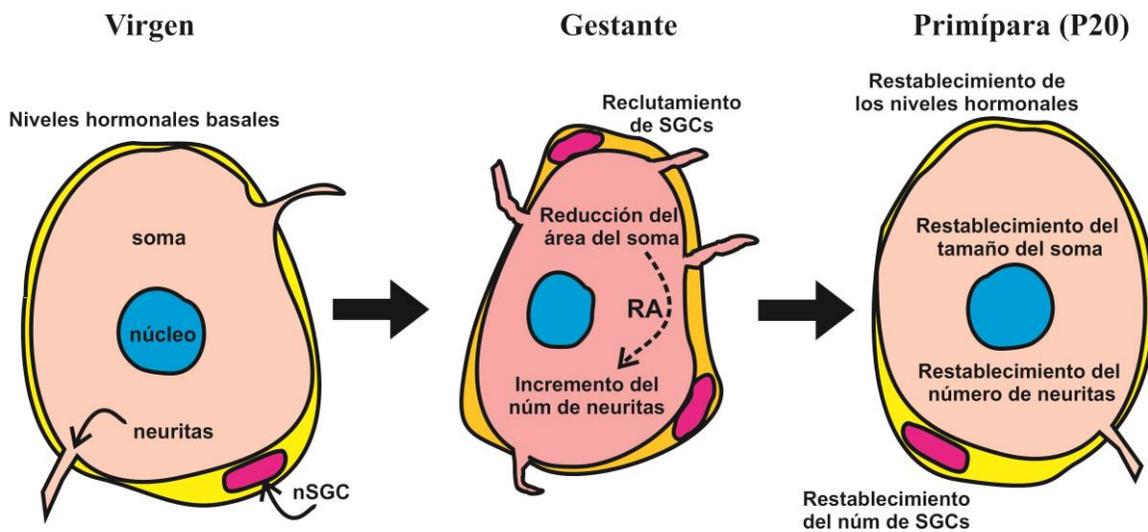


Figura 25. Esquema representativo del mecanismo propuesto de la plasticidad estructural de las neuronas paravaginales. [E2]s, concentración sérica de estradiol, SGC, células de la glía satélite; nSGC, núcleo de las células de la glía satélite, P20, primíparas con 20 días postparto.

Dependencia estrogénica del tamaño del soma neuronal

Hemos propuesto, que una posible causa de la disminución del tamaño del soma son los niveles de estrógenos, por lo que a continuación analizaremos el tamaño del soma asociada a los niveles de estradiol séricos. El tamaño del soma neuronal en ganglios de la región pélvica ha sido asociado con niveles de estrógenos y andrógenos después de la ovariectomía o la castración, respectivamente (Purves-Tyson y col. 2007; Pozuelo y col. 2010; Ramírez-Corona 2011). En la rata macho, se ha descrito que el tamaño del soma de neuronas provenientes del ganglio pélvico principal son de mayor tamaño en la fase peripuberal en comparación de la fase prepuberal (Pozuelo y col. 2010). Por otra parte la castración reduce el tamaño del soma de neuronas TH positivas y NOS positivas, mientras que el tratamiento con testosterona o DHT restablece el tamaño del soma (Purves-Tyson y col. 2007). En este mismo trabajo se administró estradiol y se observó que el tamaño del soma era similar al grupo gonadectomizado. Estas observaciones sugieren una dependencia directa entre el tamaño del soma y los niveles de andrógenos. En nuestros resultados, se observa que la OVX reduce el tamaño del soma y con la administración de benzoato de estradiol este efecto es prevenido. Posiblemente, en machos el tamaño del soma neuronal del ganglio pélvico es regulado señales androgénicas, mientras que en hembras es regulada por señales estrogénicas. Algunas de las implicaciones de la reducción del tamaño del soma podrían estar relacionadas a la síntesis y expresión de neurotransmisores.

Se ha caracterizado que las neuronas de menor tamaño son quienes disminuyen las síntesis de neuropeptidos tras un evento de daño. Mientras que las neuronas de mayor tamaño incrementan la síntesis de neuropeptidos, como el NPY tras la axotomía en ganglios sensoriales de la rata macho (Wakisaka, 1991). En neuronas de los ganglios de la raíz dorsal se ha mostrado que neuronas de menor tamaño son mayoritariamente desmielinizadas, sensibles a GDNF y expresan péptidos como la sustancia P y CGRP. Mientras que las de mayor tamaño responden a VRL1, NGF y neurotrofina-3 (Priestley y col. 2002). Es posible que la expresión de algunos neurotransmisores en los ganglios paravaginales también se altere por la ovariectomía, se sugiere futuras aproximaciones al respecto. También se ha sugerido que neuronas de mayor volumen presentan mayor número de neuritas (Hanani y col. 2005), y se ha modelado que el volumen del soma impacta en la corriente mínima que

se necesita aplicar para la despolarización de la membrana (Gulledge y Bravo, 2016). Otro aspecto que discutiremos como plasticidad estructural en los siguientes apartados.

Expresión de receptores de estrógenos y andrógenos en la ovariectomía

La expresión de receptores estrógenos de tipo alfa y beta después de la ovariectomía, a pesar de que los niveles de estrógenos no son diferentes del grupo control. Lo cual sugiere señalización por estrógenos, probablemente mediada por síntesis de estradiol local. Es importante destacar que la ovariectomía se evaluó por un periodo de 5 meses, es posible que otros mecanismos genómicos mediado por receptores de estrógenos antecediera. Interesantemente el tratamiento hormonal con benzoato de estradiol no revierte el incremento de inmunoreactividad observada en la ovariectomía en el citoplasma neuronal, fascículos o SGC. En otros trabajos se ha observado que la expresión de receptores de estrógenos además de ser dependiente de los estrógenos puede ser influenciado por otras hormonas gonadales como la testosterona. En el grupo con ovariectomía y reemplazo hormonal con benzoato de estradiol las concentraciones séricas de testosterona disminuyen con respecto al grupo control. Este factor podría ser la causa de mantener incrementada la expresión de receptores de estrógenos, desafortunadamente la disposición anatómica impiden realizar otras técnicas cuantitativas que evalúen la expresión genética de dichos receptores.

Neuritis y SGC en la ovariectomía

En la ovariectomía, la expresión de aromatasa incrementa en las neuronas paravaginales y en las SGC. Se ha propuesto que la aromatización local en las neuronas paravaginales influye en las concentraciones locales de estrógenos. Se ha establecido que la síntesis local tiene efectos paracrinos y sus efectos son más relevantes que los provenientes de fuentes endocrinas (Simpson y Santen. 2015). Además del estradiol, la testosterona también puede modular la expresión de aromatasa, a través de la disminución de andrógenos circulantes. Esto coincide con los niveles observados en la ovariectomía, los niveles séricos de testosterona disminuyen pero los niveles séricos de estradiol son similares al grupo control. En el grupo OVX se aprecia un incremento de neuronas que expresan aromatasa en el soma neuronal. En la ovariectomía la disminución del tamaño del soma está relacionado a un incremento en el número de neuronas que presentan neuritis periféricas, lo cual concuerda con otros trabajos en los que se ha sugerido que los andrógenos participan en la remodelación

dendrítica y axonal (Purves-Tyson y col. 2007). Por otra parte se observó la administración de benzoato de estradiol mantienen la expresión de neuritas marcadas con receptor de andrógenos, similar a la ovariectomía. Este hallazgo parece estar relacionado con los niveles de testosterona séricos, los cuales se mantienen bajos con respecto del grupo C. Esto indica que la disminución de andrógenos circulantes incrementa la expresión del RA en neuritas y mantiene la plasticidad estructural observada en el grupo OVX.

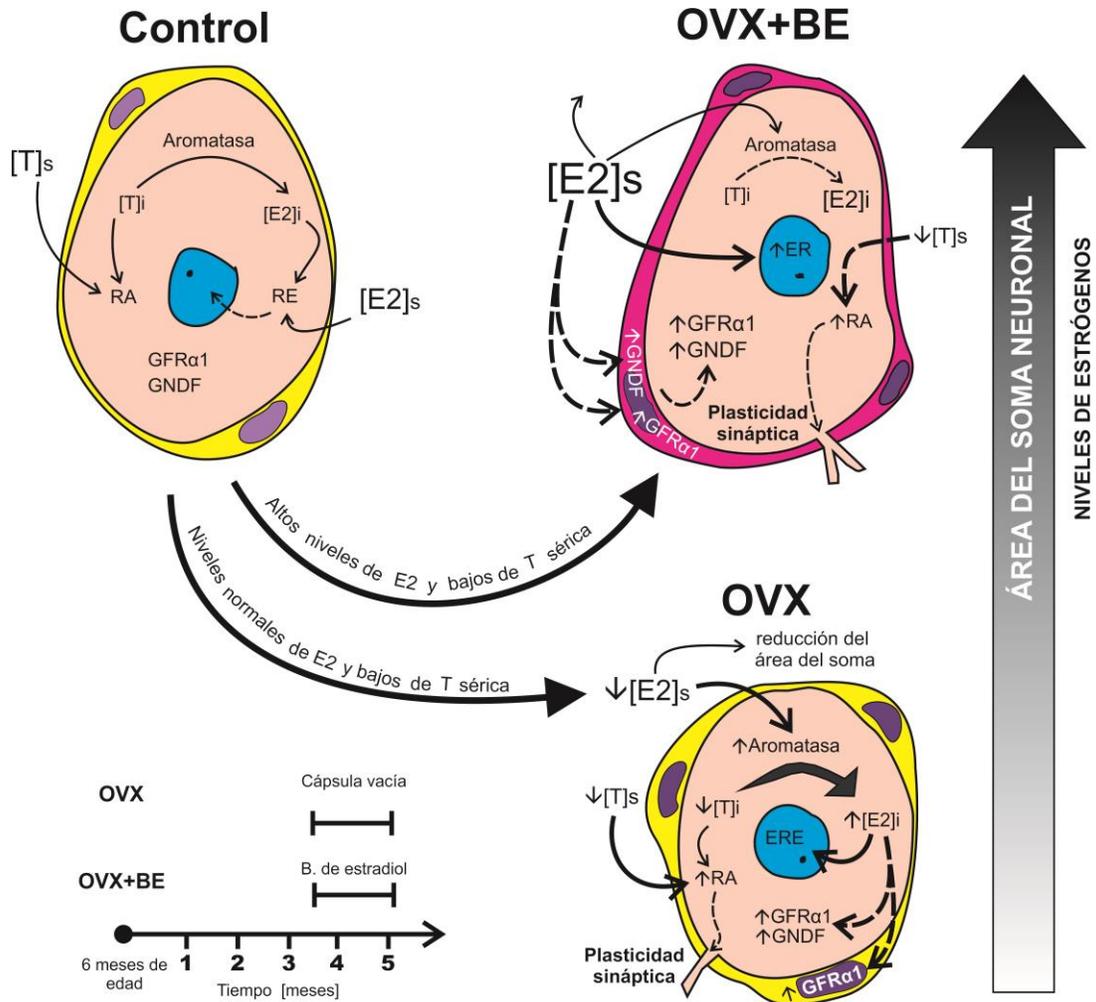


Figura 26. Esquema representativo del mecanismo propuesto en la ovariectomía (OVX) y el tratamiento con benzoato de estradiol (OVX+EB). [E2]_s, concentración sérica de estradiol, SGC, células de la glía satélite; nSGC, núcleo de las células de la glía satélite.

Factor neurotrófico GDNF los ganglios paravaginales

El mecanismo por el cual se regula el tamaño del soma en las neuronas paravaginales aún es desconocido. Sin embargo en otros estudios han propuesto que los factores neurotrófico son dependientes de estrógenos. Un factor de ellos es el GDNF observado en neuronas de la medula espinal en los segmentos sacros, los cuales proyectan sus terminales a la región pélvica (Forrest y col. 2015). En nuestros resultados se observa un incremento en la inmunorreactividad de GDNF y su receptor en neuronas paravaginales y en las SGC. El incremento de GDNF y su receptor GFR α 1 podría obedecer a dos fuentes de estradiol, en la primera a la síntesis local de estrógenos debida al incremento de aromatasa. Y en el grupo OVX+BE, GDNF y GFR α 1 podría estar relacionada a la administración de estrógenos (Fig. 26).

Plasticidad estructural en diferentes contextos hormonales

Aunque se observa una clara relación entre el grupo ovariectomizado y el tratamiento con benzoato de estradiol sobre el tamaño neuronal, los resultados contrastan cuando se relacionan con los niveles séricos de estrógenos reportados previamente en ambos grupos (Carrasco y col. 2016). Se ha propuesto que la producción extragonadal de estrógenos durante un periodo prolongado (5 meses), incrementa los niveles séricos a valores similares a los del grupo control en la coneja, se especula que no solo los estrógenos son relevantes para el mantenimiento del área neuronal. Dado que disminución del tamaño del soma, observado en el modelo de ovariectomía, coincide con la reducción del tamaño del soma neuronal al final de la gestación. Por el contrario, la disminución del área de soma neuronal al final de la gestación estaría relacionada a un incremento de los niveles séricos de estradiol. En estos contextos, parece que los estrógenos no son los responsables de la modulación del tamaño del soma. Por lo cual se sugiere considerar la participación de otras hormonas como los andrógenos, que en otros modelos animales se ha observado su participación en la regulación del tamaño del soma (Purves-Tyson y col. 2007). No obstante, se ha aceptado que las funciones dependientes de hormonas no solo se deben a los cambios en las concentraciones de las mismas, también son dependientes de los receptores que se encuentran en las células blanco. Las posibles implicaciones de la reducción de tamaño de soma pueden estar relacionadas a cambios en la plasticidad sináptica o estructural. Como hemos mencionado, el tamaño del soma puede significar cambios en el metabolismo, en la síntesis y expresión

de neurotransmisores, o en la fisiología de las neuronas paravaginales. En ganglios de la raíz dorsal y en el ganglio trigémino se han descrito al menos tres poblaciones de neuronas de acuerdo al tamaño del soma neuronal y de los marcadores que expresan. Se ha dicho que las neuronas de menor tamaño ($\leq 30 \mu\text{m}$ de diámetro) responden a señales de GDNF y dan origen a axones demielinizados, las de mayor tamaño responden a NGF y se pueden marcar con CGRP, mientras que las intermedias pueden presentar ambas características (Priestley y col. 2002). La reducción del tamaño del soma en el experimento 1 y 2 puede ser causado por diferentes mecanismos hormonales, es posible que se deban a un desbalance entre las concentraciones de estrógenos y andrógenos, así como de sus receptores, por lo cual abordaremos a continuación este tema.

De los diferentes contextos hormonales presentados en los dos experimentos podemos deducir que las concentraciones locales y circulantes de hormonas son quienes modulan la expresión de aromatasa. Es posible que la actividad de aromatasa y otras enzimas que participan en la síntesis de hormonas extragonadales modifiquen los niveles locales de hormonas. Como consecuencia, precedan los cambios estructurales como: el tamaño del soma, el incremento de neuritas y la actividad de las células de la glía satélite. En ambos protocolos experimentales no se encontraron diferencias estadísticas en la expresión de la localización del receptor en el núcleo neuronal, esto no significa que la actividad de receptores nucleares no sea afectada por los cambios hormonales en ambos experimentos. Como se mencionó antes, deben ser consideradas, la actividad del receptor y las vías de señalización rápida ligadas al receptor de membrana GRP30. Además, debe considerarse que la expresión de la enzima aromatasa podría expresar diferencialmente en una subpoblación de neuronas. Dado que se ha postulado que la señalización paracrina o autocrina de estradiol tiene un impacto mayor que las fuentes endocrinas, es posible que los cambios se reflejen en las concentraciones locales de estradiol, sin alterar la expresión de receptores de estrógenos. Por otra parte, los resultados sugieren un desbalance en las concentraciones de estradiol y testosterona local como fuente de los cambios plásticos estructurales.

La plasticidad nerviosa puede estar dada por cambios estructurales y funcionales, nuestros resultados muestran cambios estructurales dependientes de hormonas, en la gestación, la reducción del tamaño del soma, el incremento de SGC y de neuritas emergentes

que rodean al soma, sugieren un proceso adaptativo generado por los cambios hormonales. Se especula que estos cambios que preceden al parto vaginal, previenen la neurodegeneración potencial debida a la distensión de nervios y el aplastamiento de las neuronas en la región pélvica. Por otra parte en el contexto de la ovariectomía y la administración de estradiol, vislumbra también cambios estructurales y la prevención de estos. En este caso también se considera a los efectos observados de la ovariectomía como cambios plásticos. Dentro de los cuales destaca el incremento de neuritas y la expresión de aromatasa en las neuronas paravaginales. Además, se observa que tras el tratamiento con estradiol el incremento de SGC particularmente en las neuronas de mayor tamaño es consistente con la activación de las células de la glía satélite. Lo cual sugiere una dependencia de estrógenos bastante representativa, además está relacionado con la señalización por testosterona. Estos cambios sugieren alteraciones de la comunicación cruzada entre neuronas y células de la glía satélite, que forma parte de la plasticidad estructural en los ganglios paravaginales.

CONCLUSIONES

Durante la gestación, las hormonas gonadales son quienes presentan el mayor impacto en la remodelación neurítica y el tamaño del soma neuronal. Estos cambios plásticos se mantienen durante el parto y en la fase temprana postparto comienzan a revertirse estos efectos. Se sugiere que estas modificaciones previenen la potencial neurodegeneración debida al estiramiento y aplastamiento de los nervios o por la hipoxia generada durante el parto.

Por otra parte, la ovariectomía incrementa la síntesis local de estrógenos a partir de testosterona en los ganglios paravaginales. Los cambios locales de andrógenos y estrógenos son los responsables de los cambios plásticos, dentro de los que destaca la disminución del tamaño del soma y el incremento de neuronas que presentan neuritis periféricas. Mientras que la administración de estradiol mostró una relación contundente con la activación de las SGC y el factor de neurotrófico GDNF.

Los resultados observados sugieren eventos de plasticidad estructural durante la gestación que podrían prevenir la potencial neurodegeneración generada durante el parto. Por otra parte, la ovariectomía induce un desbalance en los niveles de andrógenos y estrógenos circulantes y locales, estos últimos parece ser los responsables de los cambios plásticos estructurales. Por lo cual, el tamaño del soma neuronal, las células de la glía satélite y la formación de neuritis emergentes, forman parte de la plasticidad estructural sensible a cambios hormonales en diferentes contextos.

PERPECTIVAS

Los resultados mostrados sugieren que la plasticidad observada en diferentes contextos hormonales está explicada por sub-poblaciones que componen a los ganglios paravaginales. Dado esta posibilidad se especula sobre diferencias en el tipo de receptores y neurotransmisores que podrían expresarse. Sería interesante analizar la expresión de receptores y neurotransmisores implicados con la sensibilidad al dolor. Analizar este panorama nos daría indicios del tipo de comunicación que podría estarse modificando durante la gestación y en el período postparto.

La actividad metabólica neuronal podría estar comprometida cuando se activa la síntesis local de estrógenos. Además de la enzima aromatasas, es posible que otras enzimas que participan en la síntesis de estrógenos y andrógenos estén también presentes. Abordar estas áreas nos explicaría parte de los costos metabólicos que comprometen la fisiología neuronal de estos ganglios paravaginales.

La plasticidad nerviosa en los ganglios nerviosos también involucra a las células de la glía satélite, por lo que otro tema importante sería analizar las vías de señalización de reclutamiento de SGC medidas por estrógenos. En base a todo lo anterior, futuros experimentos se podrían explicar las implicaciones en la comunicación sináptica en términos de estructura y función de los ganglios paravaginales en los diversos contextos hormonales.

Referencias bibliográficas

- Airaksinen MS, Saarma M. 2002. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci.* 2002 May; 3(5):383-94.
- Alexander NJ, Baker E, Kaptein M, Karck U, Miller L and Zampaglione E (2004). Why consider vaginal drug administration? *Fertil Steril* 82(1): 1-12.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 1999 May;22(5):208-15. Review.
- Armstrong RC, Mierzwa AJ, Sullivan GM, Sanchez MA. Myelin and oligodendrocyte lineage cells in white matter pathology and plasticity after traumatic brain injury. *Neuropharmacology.* 2016 Nov;110(Pt B):654-659. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.04.029. Review.
- Aughton KL, Hamilton-Smith K, Gupta J, Morton JS, Wayman CP and Jackson VM (2008). Pharmacological profiling of neuropeptides on rabbit vaginal wall and vaginal artery smooth muscle *in vitro*. *British Journal of Pharmacology* 155(2): 236-243.
- Bajo Arenas JM, Coroleu Lletget B Oérez Milán F. 2009. *Fundamentos de Reproducción*. Ed. Médica Panamericana, coordinadores: Pérez Milán F y Bruna Catalán I. pag 31-32.
- Berardi N, Sale A, Maffei L. 2015. Brain structural and functional development: genetics, experience and epigenetics. *Dev Med Child Neur* 57(2):4–9.
- Beyer C, Hoffman KL, González-Flores O. 2007. Neuroendocrine regulation of estrous behavior in the rabbit: similarities and differences with the rat. *Horm Behav.* Jun;52(1):2-11. Epub. Apr 4. Review
- Bolton MM1, Eroglu C. 2009. Look who is weaving the neural web: glial control of synapse formation. *Curr Opin Neurobiol.* 2009 Oct;19(5):491-7. doi: 10.1016/j.conb.2009.09.007. Epub 2009 Oct 29.
- Bridges RS and Byrnes EM (2006). Reproductive experience reduces circulating 17beta-estradiol and prolactin levels during proestrus and alters estrogen sensitivity in female rats. *Endocrinology* 147(5): 2575-82. 35.
- Burden HW. Adrenergic innervation in ovaries of the rat and guinea pig. *Am J nat.*1972;133:455–462.10.

- Butz M, Wo" rgo" tter F, van Ooyen A. 2009. Activity-dependent structural plasticity. *Brain Res Rev* 60(2):287–305.
- Campos FL, Cristov" ao AC, Rocha SM, Fonseca CP, Baltazar G. 2012. GDNF contributes to oestrogen-mediated protection of midbrain dopaminergic neurones. *J Neuroendocrinol*. 2012 Nov;24(11):1386-97. doi: 10.1111/j.1365-2826.2012.02348.x.
- Carniglia L, Ram" ırez D, Durand D, Saba J, Turati J, Caruso C, Scimonelli TN, Lasaga M. 2017. Neuropeptides and Microglial Activation in Inflammation, Pain, and Neurodegenerative Diseases. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:5048616. doi: 10.1155/2017/5048616. Review.
- Carrasco-Ru" ız, Mar" ıa De Los " ngelos, Ver" onica Garc" ıa-Villamar, Kenia L" opez-Garc" ıa, and Octavio S" ınchez-. 2015. " Aromatase Expression Is Linked to Estrogenic Sensitivity of Periurethral Muscles in Female Rabbits."
- Castel" an, Francisco et al. 2013. " Morphometry of Paravaginal Ganglia from the Pelvic Plexus: Impact of Multiparity, Primiparity, and Pregnancy." *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*.
- Cohen EJ1, Quarta E1, Bravi R1, Granato A2, Minciacchi D3. 2017. Neural plasticity and network remodeling: From concepts to pathology. *Neuroscience*. Jan 7;344:326-345.
- Costa RP, Mizusaki BE, Sj" ostr" om PJ, van Rossum MC. 2017. Functional consequences of pre- and postsynaptic expression of synaptic plasticity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. Review 372(1715).
- Costa RP, Mizusaki BE, Sj" ostr" om PJ, van Rossum MC. 2017. Functional consequences of pre- and postsynaptic expression of synaptic plasticity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. Review 372(1715).
- Coujard R. 1951. Some considerations on the uterovaginal autonomic nervous system. *Gynecol Obstet (Paris)*.;50(3):270-96.
- Cramer SC, Sur M, Dobkin BH, O'Brien C, Sanger TD, Trojanowski JQ, Rumsey JM, Hicks R, Cameron J, Chen D, Chen WG, Cohen LG, de Charms C, Duffy CJ, Eden GF, Fetz EE, Filart R, Freund M, Grant SJ, Haber S, Kalivas PW, Kolb B, Kramer AF, Sharma A, Shekim L, Stryker M, Sullivan EV, Vinogradov S. 2011. Harnessing neuroplasticity for clinical applications. *Brain* 134 (6):1591–1609.

- Cruz Y, Hernández-Plata I, Lucio RA, Zempoalteca R, Castelán F, Martínez-Gómez M. Anatomical organization and somatic axonal components of the lumbosacral nerves in female rabbits. *NeuroUrol Urodyn*. 2017 Jan 19. doi: 10.1002/nau.23209. [Epub ahead of print]
- Cunha GR, Cooke PS, Kurita T (2004). Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cytol*. Dec;67(5):417-34. Review.
- Dail, W. G. (1996), The pelvic plexus: Innervation of pelvic and extrapelvic visceral tissues. *Microsc. Res. Tech.*, 35: 95–106. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19961001)35:2<95::AID-JEMT1>3.0.CO;2-#.
- Damaser MS, Broxton-King C, Ferguson C, Kim FJ, Kerns JM (2003). Functional and neuroanatomical effects of vaginal distention and pudendal nerve crush in the female rat. *J Urol*. 170(3):1027-31.
- Daucher JA, Clark KA, Stolz DB, Meyn LA, Moalli PA. 2007. Adaptations of the rat vagina in pregnancy to accommodate delivery. *Obstet Gynecol*. 2007 Jan;109(1):128-35.
- Delancey JO, Kane Low L, Miller JM, Patel DA, Tumbarello JA (2008). Graphic integration of causal factors of pelvic floor disorders: an integrated life span model. *Am J Obstet Gynecol*. 199(6):610.e1-5.
- Enomoto H, Araki T, Jackman A, Heuckeroth RO, Snider WD, Johnson EM Jr, Milbrandt J. 1998. GFR alpha1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron*. 1998 Aug;21(2):317-24.
- Eroglu C, Barres BA. 2010. Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature*. 2010 Nov 11;468(7321):223-31. doi: 10.1038/nature09612. Review.
- Feltri ML1, Poitelon Y2, Previtali SC3. 2016. How Schwann Cells Sort Axons: New Concepts. *Neuroscientist*. 2016 Jun;22(3):252-65. doi: 10.1177/1073858415572361. Epub 2015 Feb 16.
- Fiocchetti M1, Ascenzi P, Marino M. 2012. Neuroprotective effects of 17β-estradiol rely on estrogen receptor membrane initiated signals. *Front Physiol*. 2012 Apr 5;3:73. doi: 10.3389/fphys.2012.00073. eCollection.
- Forrest SL, Payne SC, Keast JR, Osborne PB. 2015. Peripheral injury of pelvic visceral sensory nerves alters GFRα (GDNF family receptor alpha) localization in sensory and autonomic pathways of the sacral spinal cord. *Front Neuroanat*. 2015 Apr 10;9:43.

- Gonzalez-Mariscal G, Díaz-Sánchez V, Melo AI, Beyer C, Rosenblatt JS. 1994. Maternal behavior in New Zealand White rabbits: quantification of somatic events, motor patterns and steroid plasma levels. *Physiol Behav.*;55:1081–1089
- Gulledge AT, Bravo JJ. 2016 Neuron Morphology Influences Axon Initial Segment Plasticity. *eNeuro*. 2016 Feb 13;3(1). pii: ENEURO.0085-15.2016. doi: 10.1523/ENEURO.0085-15.2016.
- Gulledge AT, Bravo JJ. 2016 Neuron Morphology Influences Axon Initial Segment Plasticity. *eNeuro*. 2016 Feb 13;3(1). pii: ENEURO.0085-15.2016. doi: 10.1523/ENEURO.0085-15.2016.
- Hanani M. 2005. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005 Jun;48(3):457-76.
- Hanani M. 2010. Satellite glial cells in sympathetic and parasympathetic ganglia: in search of function. *Brain Res Rev*. 2010 Sep 24;64(2):304-27.
- Hartley ML, Pennefather JN, Story ME. 1983. Effects of ovarian steroids upon responses mediated by adrenoceptors in separated layers of the myometrium and in the costo-uterine muscle of the guinea-pig. *Br J Pharmacol*. May;79(1):93-102.
- Hartley ML, Pennefather JN, Story ME. 1983. Effects of ovarian steroids upon responses mediated by adrenoceptors in separated layers of the myometrium and in the costo-uterine muscle of the guinea-pig. *Br J Pharmacol*. May;79(1):93-102.
- Hernández-Aragón LG 2012. Efecto de la gestación y la primiparidad sobre la organización histológica de la vagina pélvica de la coneja. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Hirahara, Yukie et al. 2009. “The Localization and Non-Genomic Function of the Membrane-Associated Estrogen Receptor in Oligodendrocytes.” *Glia*.
- Houdeau E, Rossano B, Prud'homme MJ. Regional and muscle layer variations in cholinergic nerve control of the rat myometrium during the oestrous cycle. *Auton Neurosci*. 2003 Feb 28;104(1):1-9.

- Huang LY, Gu Y, Chen Y. 2013. Communication between neuronal somata and satellite glial cells in sensory ganglia. *Glia*. 2013 Oct;61(10):1571-81. doi: 10.1002/glia.22541. Review.
- Huseynov A, Zollikofer CP, Coudyzer W, Gascho D, Kellenberger C, Hinzpeter R, Ponce de León MS. 2016. Developmental evidence for obstetric adaptation of the human female pelvis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 May 10;113(19):5227-32.
- Hussain R1, Ghoumari AM, Bielecki B, Steibel J, Boehm N, Liere P, Macklin WB, Kumar N, Habert R, Mhaouty-Kodja S, Tronche F, Sitruk-Ware R, Schumacher M, Ghandour MS. 2013. The neural androgen receptor: a therapeutic target for myelin repair in chronic demyelination. *Brain*.
- Imai K, Furuya K, Kawada M, Kinugasa Y, Omote K, Namiki A, Uchiyama E,
- Isaac JT1, Ashby MC, McBain CJ. 2007. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron*. 2007 Jun 21;54(6):859-71.
- Ishiguro T, Takeda J, Fang X, Bronson H, Olson DM. 2016. Interleukin (IL)-1 in rat parturition: IL-1 receptors 1 and 2 and accessory proteins abundance in pregnant rat uterus at term - regulation by progesterone. *Physiol Rep*. 2016 Jul;4(14). pii: e12866.
- Ivanova T1, Karolczak M, Beyer C. 2002. Estradiol stimulates GDNF expression in developing hypothalamic neurons. *Endocrinology*. 2002 Aug;143(8):3175-8.
- Jobling P, Gibbins IL, Morris JL. 2003. Functional organization of vasodilator neurons in pelvic ganglia of female guinea pigs: comparison with uterine motor neurons. *J Comp Neurol*. May 5;459(3):223-41.
- Jobling P. 2010. Autonomic control of the urogenital tract. *Auton Neurosci*. 2011 Nov 16;165(1):113-26. doi: 10.1016/j.autneu.2010.07.004. Epub. Aug 19. Review.
- Jongen JL1, Jaarsma D, Hossaini M, Natarajan D, Haasdijk ED, Holstege JC. 2007. Distribution of RET immunoreactivity in the rodent spinal cord and changes after nerve injury. *J Comp Neurol*. 2007 Feb 20;500(6):1136-53.
- Kanagasuntheram R. and Mahran Z. Y.1960. Observations on the nervous system of the lesser bush baby (*Galago senegalensis senegalensis*). *J Anat*. October; 94(Pt 4): 512–527.

- Kanjhan, R., Osborne, P.B., Ouyang, M., Keast, J.R., 2003. Postnatal maturational changes in rat pelvic autonomic ganglion cells: a mixture of steroid-dependent and -independent effects. *J. Neurophysiol.* 89 (1), 315–323.
- Kao, Shih-Chu et al. 2009. “Calcineurin / NFAT Signaling Is.” 323
- Keast JR. 2004. Remodelling of connections in pelvic ganglia after hypogastric nerve crush. *Neuroscience.* 126(2):405-14.
- Kim SO, Lee HS, Ahn K, Park K. 2009. Effect of estrogen deprivation on the expression of aquaporins and nitric oxide synthases in rat vagina. *J Sex Med.* Jun;6(6):1579-86.
- Kole MH1, Stuart GJ. 2012. Signal processing in the axon initial segment. *Neuron.* 2012 Jan 26;73(2):235-47. doi: 10.1016/j.neuron.2012.01.007.
- Koszykowska, M., J. Wojtkiewicz, M. Majewski, and B. Jana. 2008. “Effect of Steroid Hormones on the Peripheral Nervous System.”
- Kuba H, Yamada R, Ishiguro G, Adachi R. 2015. Redistribution of Kv1 and Kv7 enhances neuronal excitability during structural axon initial segment plasticity. *Nat Commun.* 2015 Nov 19;6:8815.
- Langley J. N. and Anderson H. K. (1896). The Innervation of the Pelvic and adjoining Viscera. Part VII. Anatomical Observations. *J Physiol.* October 19; 20(4-5): 372–406.
- Latini C, Frontini A, Morroni M, Marzoni D, Castellucci M, Smith PG. 2008. Remodeling of uterine innervation. *Cell Tissue Res.* 2008 Oct;334(1):1-6.
- Laurikainen A, Hiltunen JO, Vanhatalo S, Klinge E, Saarma M. 2000. Glial cell line-derived neurotrophic factor is expressed in penis of adult rat and retrogradely transported in penile parasympathetic and sensory nerves. *Cell Tissue Res.* 2000 Dec;302(3):321-9.
- Li MZ, Masuko S. Target specific organization and neuron types of the dog pelvic ganglia: a retrograde-tracing and immunohistochemical study. *Arch Histol Cytol.* 2001 Aug;64(3):267-80.
- Liao Z, and Smith PG (2011). Adaptive Plasticity of Vaginal Innervation in Term Pregnant Rats. *Reproductive Sciences* 2011 18: 1237.

- Liao Z, and Smith PG (2011). Adaptive Plasticity of Vaginal Innervation in Term Pregnant Rats. *Reproductive Sciences* 2011 18: 1237.
- López-García K, 2010. Efecto de la experiencia reproductiva sobre la sensibilidad estrogénica de los músculos estriados pubococcigeo y bulboesponjoso de la coneja, Tesis de Maestría., Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- López-García, K. et al. 2013. “Effect of Multiparity on Morphometry and Oestrogen Receptor Expression of Pelvic and Perineal Striated Muscles in Rabbits: Is Serum Oestradiol Relevant?” *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*
- Lowder JL, Debes KM, Moon DK, Howden N, Abramowitch SD, Moalli PA. 2007. Biomechanical adaptations of the rat vagina and supportive tissues in pregnancy to accommodate delivery. *Obstet Gynecol.* 2007 Jan;109(1):136-43.
- Mahon WA, Reid DW, Day RA. 1967. The in vivo effects of beta adrenergic stimulation and blockade on the human uterus at term. *J Pharmacol Exp Ther.* Apr;156(1):178-85.
- Masure S1, Geerts H, Cik M, Hoefnagel E, Van Den Kieboom G, Tuytelaars A, Harris S, Lesage AS, Leysen JE, Van Der Helm L, Verhasselt P, Yon J, Gordon RD. 1999. Enovin, a member of the glial cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF) family with growth promoting activity on neuronal cells. Existence and tissue-specific expression of different splice variants. *Eur J Biochem.* 1999 Dec;266(3):892-902.
- Meusburger SM, Keast JR. 2001. Testosterone and nerve growth factor have distinct but interacting effects on structure and neurotransmitter expression of adult pelvic ganglion cells in vitro. *Neuroscience.* 2001;108(2):331-40.
- Mirabella N, Squillacioti C, De Luca A, Paino G. 2008. Effects of castration on the expression of TrkB and p75NTR in the vas deferens and male accessory genital glands of the rat. *Anat Histol Embryol.* Apr;37(2):118-25.
- Mitchell BS, Stauber VV. 1990. Morphological, histochemical and immunohistological studies of the paracervical ganglion in prepubertal, pregnant and adult, non-pregnant guinea-pigs. *J Anat.* Oct;172:177-89.

- Molliver, D.C., Wright, D.E., Leitner, M.L., Parsadanian, A.S., Doster, K., Wen, D., Yan, Q., and Snider, W.D. 1997. IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron*, 19: 849–861.
- Mowa CN1, Iwanaga T. 2000. Developmental changes of the oestrogen receptor-alpha and -beta mRNAs in the female reproductive organ of the rat--an analysis by in situ hybridization. *J Endocrinol*. 2000 Dec;167(3):363-9.
- Murakami G. 2006. Human pelvic extramural ganglion cells: a semiquantitative and immunohistochemical study. *Surg Radiol Anat*. Dec;28(6):596-605. Epub 2006 Oct 11.
- Nadeau JR, Wilson-Gerwing TD, Verge VM. Induction of a reactive state in perineuronal satellite glial cells akin to that produced by nerve injury is linked to the level of p75NTR expression in adult sensory neurons. *Glia*. 2014 May;62(5):763-77. doi: 10.1002/glia.22640. Epub 2014 Feb 24.
- Oguievetskaia K, Cifuentes-Diaz C, Girault JA, Goutebroze L. 2005. [Cellular contacts in myelinated fibers of the peripheral nervous system]. *Med Sci (Paris)*. Review.
- Owman C, Sjöberg NO. 1966. Adrenergic nerves in the female genital tract of the rabbit. With remarks on cholinesterase-containing structures. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 74(2):182-97.
- Pannese E1. 2010. The structure of the perineuronal sheath of satellite glial cells (SGCs) in sensory ganglia. *Neuron Glia Biol*. 2010 Feb;6(1):3-10. doi: 10.1017/S1740925X10000037.
- Papka RE, Cotton JP, Taurig HH. 1985. Comparative distribution of neuropeptide tyrosine-, vasoactive intestinal polypeptide-, substance P-immunoreactive, acetylcholinesterase-positive and noradrenergic nerves in the reproductive tract of the female rat. *Cell Tissue Res*. 242(3):475-90.
- Pelletier G, Ouellet J, Martel C, Labrie F. 2012. Effects of ovariectomy and dehydroepiandrosterone (DHEA) on vaginal wall thickness and innervation. *J Sex Med*. 2012 Oct;9(10):2525-33. doi: 10.1111/j.1743-6109.2012.02895.x.
- Pozuelo JM, Rodríguez R, Arriazu R, Ingelmo I, Martín R, Santamaría L. 2010. Changes in the number and volume of NPY and VIP neurons from periprostatic accessory vegetative ganglia in pre- and peripubertal rats. A stereological study. *Tissue Cell*. Feb;42(1):1-8.

- Priestley JV, Michael GJ, Averill S, Liu M, Willmott N. 2002. Regulation of nociceptive neurons by nerve growth factor and glial cell line derived neurotrophic factor. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002 May;80(5):495-505. Review.
- Purves-Tyson TD, Arshi MS, Handelsman DJ, Cheng Y, Keast JR. 2007. Androgen and estrogen receptor-mediated mechanisms of testosterone action in male rat pelvic autonomic ganglia. *Neuroscience.* Aug 10;148(1):92-104. Epub 2007 Jul 12.
- Purves-Tyson TD, Keast JR. 2004. Rapid actions of estradiol on cyclic amp response-element binding protein phosphorylation in dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience.* 2004;129(3):629-37.
- Quinn M. 2004. Obstetric denervation-gynaecological reinnervation: disruption of the inferior hypogastric plexus in childbirth as a source of gynaecological symptoms. *Med Hypotheses.* 63(3):390-3.
- Ramírez-Corona E. 2011. Contribución de los estrógenos en la organización histológica de la vagina pélvica de la coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Rodríguez-Antolín J, Xelhuantzi N, García-Lorenzana M, Cuevas E, Hudson R, Martínez-Gómez M. 2009. General tissue characteristics of the lower urethral and vaginal walls in the domestic rabbit. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* Jan;20(1):53-60.
- Shen L1, Pichel JG, Mayeli T, Sariola H, Lu B, Westphal H. Gdnf haploinsufficiency causes Hirschsprung-like intestinal obstruction and early-onset lethality in mice. *Am J Hum Genet.* 2002 Feb;70(2):435-47. Epub 2002 Jan 3.
- Sievert KD, Bakircioglu ME, Tsai T, Dahms SE, Nunes L, and Lue TF (2001) The effect of simulated birth trauma and/or ovariectomy on rodent continence mechanism. I. Functional and structural change. *J Urol* 166:311–317.
- Simpson E, Santen RJ. 2015. Celebrating 75 years of oestradiol. *J Mol Endocrinol.* 2015 Dec;55(3):T1-20. doi: 10.1530/JME-15-0128. Epub 2015 Oct 5.
- Smith PG1, George M, Bradshaw S. 2009. Estrogen promotes sympathetic nerve regeneration in rat proximal urethra. *Urology.* 2009 Jun;73(6):1392-6. doi: 10.1016/j.urology.2008.11.052. Epub 2009 Apr 10.

- Song YB, Hwang K, Kim DJ, Han SH (2009). Innervation of vagina: microdissection and immunohistochemical study. *J Sex Marital Ther*; 35(2):144-53.
- Sporrong B, Alm P, Owman C, Sjöberg NO, Thorbert G. 1981. Pregnancy is associated with extensive adrenergic nerve degeneration in the uterus. An electronmicroscopic study in the guinea-pig. *Neuroscience*. 6(6):1119-26.
- Stepanyants AI, Hof PR, Chklovskii DB. 2002. Geometry and structural plasticity of synaptic connectivity. *Neuron*. 2002 Apr 11;34(2):275-88.
- Stepanyants AI, Hof PR, Chklovskii DB. 2002. Geometry and structural plasticity of synaptic connectivity. *Neuron*. 2002 Apr 11;34(2):275-88.
- Strom, Jakob O., Annette Theodorsson, and Elvar Theodorsson. 2011. "Mechanisms of Estrogens' Dose-Dependent Neuroprotective and Neurodamaging Effects in Experimental Models of Cerebral Ischemia." *International journal of molecular sciences*.
- Takeda M, Takahashi M, Matsumoto S. 2009. Contribution of the activation of satellite glia in sensory ganglia to pathological pain. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009 Jun;33(6):784-92. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.12.005. Review.
- Takeda M, Tanimoto T, Kadoi J, Nasu M, Takahashi M, Kitagawa J, Matsumoto S. Enhanced excitability of nociceptive trigeminal ganglion neurons by satellite glial cytokine following peripheral inflammation. *Pain*. 2007 May;129(1-2):155-66.
- Ting AY1, Blacklock AD, Smith PG. 2004. Estrogen regulates vaginal sensory and autonomic nerve density in the rat. *Biol Reprod*. 2004 Oct;71(4):1397-404. Epub 2004 Jun 9.
- Trachtenberg JT1, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, Welker E, Svoboda K. 2002. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):788-94.
- Wanigasekara Y, Airaksinen MS, Heuckeroth RO, Milbrandt J, Keast JR. 2004. Neurturin signalling via GFRalpha2 is essential for innervation of glandular but not muscle targets of sacral parasympathetic ganglion neurons. *Mol Cell Neurosci*. 2004 Feb;25(2):288-300.
- Xelhuantzi N, Rodríguez-Antolín J, Nicolás L, Castelán F, Cuevas E, Martínez-Gómez M. 2014. Tissue alterations in urethral and vaginal walls related to multiparity in rabbits. *Anat Rec (Hoboken)*. 2014 Oct;297(10):1963-70.

Xelhuantzi N, Rodríguez-Antolín J, Nicolás L, Castelán F, Cuevas E, Martínez-Gómez M. 2014. Tissue alterations in urethral and vaginal walls related to multiparity in rabbits. *Anat Rec (Hoboken)*. 2014 Oct;297(10):1963-70.

Young P, M. Boentert. Architecture of the peripheral nerve. 2005. *Hereditary Peripheral Neuropathies Book*. Publisher Steinkopff. Copyright Holder Steinkopff Verlag Darmstadt.

Zhu, Thant S. and Michael Glaser. 2008. “Neuroprotection and Enhancement of Remyelination by Estradiol and Dexamethasone in Cocultures of Rat DRG Neurons and Schwann Cells.” *Brain Research*.

Zoubina EV, Fan Q, Smith PG. 1998. Variations in uterine innervation during the estrous cycle in rat. *J Comp Neurol*. Aug 10;397(4):561-71.

ANEXOS

Research Article

Role of Estrogens in the Size of Neuronal Somata of Paravaginal Ganglia in Ovariectomized Rabbits

Laura G. Hernández-Aragón,¹ Verónica García-Villamar,¹
María de los Ángeles Carrasco-Ruiz,¹ Leticia Nicolás-Toledo,¹ Arturo Ortega,²
Estela Cuevas-Romero,¹ Margarita Martínez-Gómez,^{1,3} and Francisco Castelán^{1,3}

¹Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx), Tlaxcala, TLAX, Mexico

²Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, CDMX, Mexico

³Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Unidad Fortínea Tlaxcala, Tlaxcala, TLAX, Mexico

Correspondence should be addressed to Francisco Castelán; fcastelan@iibiomedicas.unam.mx

Received 26 September 2016; Revised 18 December 2016; Accepted 15 January 2017; Published 21 February 2017

Academic Editor: Oliver von Bohlen und Halbach

Copyright © 2017 Laura G. Hernández-Aragón et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

We aimed to determine the role of estrogens in modulating the size of neuronal somata of paravaginal ganglia. Rabbits were allocated into control (C), ovariectomized (OVX), and OVX treated with estradiol benzoate (OVX + EB) groups to evaluate the neuronal soma area; total serum estradiol (E2) and testosterone (T) levels; the percentage of immunoreactive (Ir) neurons anti-aromatase, anti-estrogen receptor (ER α , ER β) and anti-androgen receptor (AR); the intensity of the immunostaining anti-glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and the GDNF family receptor alpha type 1 (GFR α 1); and the number of satellite glial cells (SGCs) per neuron. There was a decrease in the neuronal soma size for the OVX group, which was associated with low T, high percentages of aromatase-Ir and neuritic AR-Ir neurons, and a strong immunostaining anti-GDNF and anti-GFR α 1. The decrease in the neuronal soma size was prevented by the EB treatment that increased the E2 without affecting the T levels. Moreover, there was a high percentage of neuritic AR-Ir neurons, a strong GDNF immunostaining in the SGC, and an increase in the SGCs per neuron. Present findings show that estrogens modulate the soma size of neurons of the paravaginal ganglia, likely involving the participation of the SGC.

GLOSARIO

Adaptación: Proceso fisiológico, rasgo morfológico o modo de comportamiento de un organismo que ha evolucionado durante un periodo mediante la selección natural de tal manera que incrementa sus expectativas a largo plazo para reproducirse con éxito.

Alteración: Desarreglo, desorden o modificación. Cambio de las características normales de algo, el cual puede ser un cambio negativo o perturbación de estado normal de algo.

Axón: Prolongación larga y delgada de las neuronas que se origina en una región especializada llamada eminencia axónica o cono axónico, a partir del soma. El axón tiene la forma de un cono que se adelgaza hacia la periferia.

Dendrita: Prolongaciones protoplásmicas ramificadas cortas de la neurona dedicadas principalmente a la recepción de estímulos y, secundariamente a la alimentación celular. Las terminales de las neuronas; y sirven como receptores de impulsos nerviosos provenientes desde un axón perteneciente a otra neurona.

Emergente: Que se originan de cierta cosa o tiene principio en ella.

Ganglio nervioso: Masa de tejido nervioso formada por una acumulación de somas neuronales que conectan con fibras nerviosas. Los ganglios son puntos de relevo o de conexiones intermedias entre diferentes estructuras neurológicas del cuerpo, están rodeadas por una cápsula de tejido conectivo.

Morfología: Se encarga del estudio de la estructura de un organismo o sistema y sus respectivas características. Incluye aspectos de la apariencia forma, color y estructura.

Morfometría: Se refiere al análisis cuantitativo de la forma, un concepto que abarca el tamaño y la forma

Múltiparidad: Cualidad reproductiva en la que ha parido cuatro veces.

Neurita: Cualquier expansión del soma de una neurona, ya sea una dendrita o un axón. El término es frecuentemente empleado en células nerviosas inmaduras, especialmente

en cultivo celular, cuando es difícil distinguir el carácter de dendrita o axón de la proyección neuronal.

Neuronas aferentes: También conocidas como neuronas sensoriales o receptoras, transportan impulsos nerviosos desde los receptores u órganos sensoriales hacia el sistema nervioso central.

Neuronas eferentes: También llamadas neuronas efectoras, transportan los impulsos nerviosos fuera del sistema nervioso central hacia efectores como los músculos, epitelios y glándulas.

Paracolpio: fascia endopelviana con engrosamiento curvilíneo, que se extiende de su inserción en el retro pubis a la espina ciática. Está conformada por la fusión de la aponeurosis obturatriz, como medios de fijación aponeuróticos paravaginales, cuya función es unir la parte proximal o superior de la vagina a los huesos pélvicos.

Pélvica: Es la parte inferior del abdomen, encargada de soportar la columna vertebral y donde se encuentra la porción final del sistema digestivo y urinario, y los órganos sexuales.

Periférica: Estructura o dispositivo que permite el intercambio de datos con el exterior; incluye tanto los datos de entrada o salida.

Perineal: Es la región anatómica correspondiente al suelo de la pelvis, los límites del perineo están dados por un marco osteofibroso, dado por el borde inferior de la sínfisis del pubis y las ramas isquiopubianas. El vértice posterior lo marca la extremidad del cóccix y los ligamentos sacrociáticos mayores.

Primíparidad: Estado reproductivo que hace referencia a que ha parido por primera vez.

Soma neuronal: También llamado pericarion es el cuerpo celular de la neurona, el cual contiene el núcleo rodeado por el citoplasma.

