

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto de la experiencia reproductiva sobre la
expresión de factores neurotróficos en los
ganglios paravaginales de la coneja

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Verónica García Villamar

Director de tesis

Dr. Francisco Castelán

Tlaxcala, Tlax.

Enero 2018



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto de la experiencia reproductiva sobre la
expresión de factores neurotróficos en los
ganglios paravaginales de la coneja

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Verónica García Villamar

Comité Tutorial

Dr. Francisco Castelán

Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio

Dr. Arturo Ortega Soto



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado
Posgrado en Ciencias Biológicas



COORDINACIÓN DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
PRESENTE

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Verónica García Villamar** realiza para la obtención del grado de **Doctora en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Efecto de la experiencia reproductiva sobre la expresión de factores neurotróficos en los ganglios paravaginales de la coneja”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., NOVIEMBRE 30 DE 2017

DR. PABLO PACHECO CABRERA

DRA. ROSA ANGÉLICA LUCIO LUCIO

DRA. MARGARITA MARTÍNEZ GÓMEZ

DR. ARTURO ORTEGA SOTO

DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO



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



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

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Francisco Castelán y la asesoría de Dr. Arturo Ortega Soto, Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio, Dr. Pablo Pacheco, Dra. Margarita Martínez Gómez, y Dra. Estela Cuevas Romero. La asistencia técnica brindada por la Q.F.B. Laura García Rivera y el Biol. Ramsés Chaves Barrios fue fundamental para la realización de este proyecto.

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

Para su desarrollo se contó con el financiamiento de CONACYT (225126 al Cuerpo Académico de Fisiología del Comportamiento), y a VGV (beca: 261601). PROMEP-SEP (UATLX-PTC-109 FC).

Agradecimientos

Al Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, por abrirme sus puertas, por confiar en mí y haberme permitido formar parte de este grupo.

A los miembros del comité revisor, Dr. Arturo Ortega Soto, Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio, Dr. Pablo Pacheco, Dra. Margarita Martínez Gómez, Dra. Estela Cuevas Romero y Dr. Francisco Castelán por su colaboración y disposición para aclarar mis dudas, así como para ayudarme a lograr esta meta.

Agradecimientos a título personal

A mis padres

Guillermina y Gaspar, pilares fundamentales en mi vida. Su tenacidad y lucha incansable han hecho de ellos mi gran ejemplo a seguir. Gracias porque me acompañaron en esta loca aventura que resultó ser el doctorado. Por estar conmigo de forma incondicional, brindándome todo lo que pudieron y necesite. Por entender mis ausencias y mis malos momentos. Por decirme estudia y nunca te rindas y aquí estoy, y no para saber más ni ser mejor que otros sino para superarme a mí misma. Gracias mil gracias por todo, los amo.

A mis hermanos

María de Jesús, José Luis, Karen, Alejandro, Guadalupe y Daniela porque sin importar las circunstancias siempre que los he necesitado han estado ahí. Por todo lo que hemos compartido juntos, así como por sus lecciones de vida y palabras de aliento cuando sentía que ya no podía más, porque juntos aprendimos a vivir. Los que nunca dudaron que lograría con esta meta, los quiero mucho, aunque no lo parezca ni lo demuestre, son la mejor compañía con la que pude compartir el mismo hogar.

A mis sobrin@s

Danna, Fer, Ximena, Victor, Irving y Fernando, por enseñarme que una caída es solo para aprender una lección, a nunca darme por vencida y a recordarme que al sonreír la vida es mejor. Y que el tiempo es relativo, los quiero chamac@s.

A mis amig@s

Vero Orozco, Vero Rodríguez, Yeimi, Juas, Nicté, Erika, Luigui, George y a ti Chava que siempre estuvieron ahí para ayudarme, escucharme, aconsejarme y en muchas ocasiones guiarme, por el apoyo incondicional y todo el cariño que me han brindado: Por tener siempre tendida su mano amiga desde el día en que nos conocimos, pero

sobre gracias por aceptarme a pesar de lo grinch que soy. Son la pimienta que condimenta mi vida, gracias por todo.

A mi director de tesis

De sobra sé que no le agradara, pero debo agradecer de manera especial y sincera al Dr. Francisco Castelán por confiar en mi desde un principio, por aceptarme para realizar esta tesis. Por su apoyo tanto profesional como personal. Por su ejemplo de trabajo y dedicación, por enseñarme a siempre dar lo mejor de mí, Has sido parte importante en mi formación personal. Por soportarme más de nueve años, de verdad mil gracias Paco.

A mis compañeros de laboratorio

Gracias a mis compañeros de laboratorio Ángeles, Laura, Octavio, Xochitl, Lupita y Adrián, por hacer que el trabajo fuera ameno y divertido, por su ayuda en las tareas cotidianas y en cada problema experimental, por enseñarme que todos los días podemos aprender algo nuevo. Por las alegrías, tristezas, problemas, proyectos y porque durante este tiempo juntos aprendimos que nuestras diferencias se convierten en riqueza cuando existe respeto.

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

"Cada día sabemos más y entendemos menos"

Albert Einstein

"No le temas al fracaso, que no te hará más débil sino más fuerte"

Abraham Lincoln

Resumen

En la coneja, se ha descrito que la experiencia reproductiva remodela la innervación de la vagina pélvica, perteneciente al plexo pélvico. Los ganglios pélvicos proporcionan la mayor parte de la innervación autonómica a los órganos urogenitales. Dicha remodelación puede estar modulada por el efecto de las hormonas sobre algunas moléculas como la señalización de factores neurotróficos. Los factores neurotróficos son proteínas que modulan el crecimiento, diferenciación, reparación y supervivencia neuronal. Por lo que la señalización de factores neurotróficos es relevante para la recuperación de lesiones que afecten la innervación simpática y parasimpática. Uno de ellos es el factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales (GDNF), el cual participa en el desarrollo, mantenimiento y plasticidad de neuronas simpáticas y parasimpáticas del plexo pélvico. Estos efectos ocurren a través de su interacción con receptores específicos ($GFR\alpha 1$). Por otro lado, el factor de crecimiento nervioso (NGF) es necesario para la supervivencia, crecimiento y desarrollo de neuronas. Estos efectos ocurren a través de su interacción con receptores específicos (Trk-A y $p75^{NTR}$). Se ha descrito que las familias del NGF y la de GFLs no funcionan como sistemas paralelos, sino que es probable que se superponen y se alternan en su influencia en el desarrollo de neuronas periféricas autonómicas. En este contexto no hay información sobre la asociación de factores neurotróficos con la remodelación de ganglios pélvicos en hembras de mamíferos. Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar si la experiencia reproductiva modifica la morfometría y aumenta la expresión de factores neurotróficos en los ganglios paravaginales de la coneja. Para ello utilizamos conejas control (C), gestantes a término (G30) y primíparas tres días posparto (P3). Evaluamos la morfometría de los ganglios paravaginales, las SCG e inmunohistoquímicas para anti-GFAP, anti-GDNF, anti- $GFR\alpha 1$, anti- $p75^{NTR}$, anti-Trk-A y anti-Trk-B, se cuantifico el número de neuronas reactivas por campo. En cuanto al área total ganglionar total por campo no encontramos diferencias significativas entre los grupos. Con respecto al área del soma neuronal en las G30 disminuyó con respecto al grupo C de manera significativa $P < 0.05$. El número de neuronas no encontramos cambios entre los grupos experimentales. Con respecto a las SGC no encontramos

diferencias ni en el número de células por condición, ni en el porcentaje de estas por neurona. En la IHC anti-GFAP, el marcaje se observa en la periferia de las neuronas de los tres grupos experimentales, sin diferencias en el número de neuronas reactivas. Para GDNF el marcaje se observa en el citoplasma de las neuronas, pero no en el núcleo. La expresión de dicho factor es mayor en las P3 con respecto a las C y G30. En cuanto a GFR α -1 fue más intenso en la periferia de la neurona. La expresión de dicho receptor es mayor en las G30 vs C y P3. El marcaje anti-p75^{NTR} es más intenso en las P3 y G30 vs C, $P=0.0001$. Por otro lado, la inmunorreactividad de Trk-A y Trk-B se observa en el citoplasma de las neuronas y la periferia de la neurona. La expresión de estos incrementa en las G30 y P3 vs C. Con estos resultados podemos concluir que tanto los factores como receptores de estos, participan de manera activa en procesos de neuroplasticidad de los ganglios paravaginales debidos a la reproducción.

Abreviaturas

SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SNS	Sistema nervioso somático
SNA	Sistema nervioso autonómico
AUG	Aparato urogenital
SGC	Células gliales satélite
IHC	Inmunohistoquímica
DRG	Ganglios de la raíz dorsal
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
RE	Receptor de estrógenos
E2	Estradiol
P4	Progesterona
LH	Hormona luteinizante
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Gonadotrofinas
TH	Tirosina hidroxilasa
ChAt	Acetilcolina transferasa
GDNF	Factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales
GFLs	Familia de ligandos del GDNF
GFRα	Receptor alfa de los GFLs
NRTN	Neurturina
ARTN	Artemina
PSPN	Persepina
NGF	Factor de crecimiento nervioso
BDNF	Factor de crecimiento derivado del encéfalo
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4	Neurotrofina 4
C	Conejas control
G30	Conejas gestantes a término
P3	Conejas primíparas tres días posparto
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
NPY	Neuropéptido Y
NO	Óxido nítrico
ee	Error estándar
LUT	Tracto urogenital inferior

Índice

	Introducción	1
	Antecedentes	2
1.	Sistema nervioso y plasticidad	2
2.	Conducta reproductiva	5
3.	Fisiología reproductiva	6
3.1.	Gestación y parto	6
4.	La coneja como modelo de estudio	8
5.	Hormonas gonadales	9
6.	Inervación del aparato urogenital	11
7.	Factores neurotróficos	14
7.1.	Factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales	15
7.1.1.	Co-receptores GFR α -RET de la familia de GLFs	15
8.	La experiencia reproductiva modifica la inervación autonómica	17
9.	Influencia de los estrógenos sobre la inervación autonómica	19
10.	Factores neurotróficos y los ganglios pélvicos	21
11.	Justificación	23
12.	Hipótesis	24
13.	Objetivo general	25
13.1	Objetivos específicos	25
14.	Metodología	26
14.1.	Animales y grupos	26
14.2.	Condición fisiológica	26
14.3.	Obtención de la vagina pélvica	26
14.4.	Análisis histológico	27
14.5.	Marcaje inmunohistoquímico	28
14.6.	Análisis estadístico	29
15.	Resultados	30
15.1.	Morfometría	30

15.1.1.	Área ganglionar	30
15.1.2.	Las neuronas en los ganglios paravaginales	31
15.1.3.	Número de células gliales satélite	33
15.2.	Marcaje inmunohistoquímico anti-GFAP	34
15.3.	Marcaje inmunohistoquímico anti-GDNF	36
15.4.	Marcaje inmunohistoquímico anti-GFR α -1	37
15.5.	Marcaje inmunohistoquímico anti-p75 ^{NTR}	38
15.6.	Marcaje inmunohistoquímico anti-TrK-A	40
15.7.	Marcaje inmunohistoquímico anti-TrK-B	42
16.	Discusión	44
16.1.	La experiencia reproductiva modifica el área del soma de las neuronas paravaginales, pero no las células gliales satélite	44
16.2.	Expresión de factores neurotróficos	45
16.3.	Implicaciones de nuestro modelo de estudio	48
17.	Conclusiones	52
18.	Perspectivas	53
19.	Referencias	54
20.	Anexos	
20.1.	Anexo 1.- Tinción tricrómica de Masson	
20.2.	Anexo 2.- Inmunohistoquímica anti-GFAP, anti-GDNF, anti-GFR α -1, anti-p75 ^{NTR} , anti-TrK-A y TrK-B en cortes transversales de la región pélvica de la vagina.	
21.	Publicaciones	

1. Introducción

La reproducción en las hembras de mamíferos incluye diversos procesos fisiológicos y conductuales. Entre ellos se encuentran la receptividad, la cópula, la gestación, el parto y la lactancia. Todos estos procesos tienen como sustrato anatómico el aparato urogenital inferior. Los diversos eventos reproductivos podrían modificar la inervación autonómica vaginal y con ello alterar su función. La inervación autonómica y la somática que inervan los órganos pélvicos son importantes en la mediación y coordinación de respuestas conductuales reproductivas y de micción. En la rata la información sensorial proporcionada por el nervio pélvico durante la estimulación vaginocervical modula la lordosis y los cambios hormonales después de la cópula. Se conoce que los cambios en el patrón de micción y la retención vaginal se asocian con alteraciones estructurales del aparato urogenital y su inervación sensorial y autonómica.

El sistema nervioso para su estudio se divide en somático y autonómico. Lo constituyen dos tipos de linajes celulares: las neuronas, que se encargan de transmitir los impulsos, y las células gliales. La glía cumple un papel fundamental durante el desarrollo del sistema nervioso, debido a que son el sustrato físico para la migración neuronal. Además, presenta una función trófica y metabólica activa, contribuyendo de manera activa en la comunicación e integración de las redes neurales. La comunicación básica entre las neuronas es conocida como sinapsis; sin embargo, los factores neurotróficos constituyen otro medio de comunicación entre estas. Dichos factores intervienen en el desarrollo de las células del sistema nervioso y actúan como mensajeros químicos de acción local. Cabe mencionar que toda célula del sistema nervioso produce factores neurotróficos.

Antecedentes

1. Sistema nervioso y plasticidad

Al sistema nervioso lo podemos clasificar en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP) el SNC está compuesto por el cerebro y la médula espinal y el SNP está compuesto por todos los nervios y ganglios que inervan a todo el organismo. El SNP se puede clasificar en sistema nervioso somático (SNS) y sistema nervioso autonómico (SNA) el cual a su vez podemos dividir en simpático y parasimpático. Uno de los blancos inervados por el SNA es el aparato urogenital (AUG), este está conformado por dos grupos de órganos, los genitales y los urinarios. Los genitales participan en funciones reproductivas como la cópula y el parto. En tanto, los urinarios elaboran, almacenan y eliminan la orina.

Los principales tipos celulares del tejido nervioso son las neuronas y las células gliales. Las neuronas, células altamente especializadas en la recepción y transmisión de señales eléctricas, tienen un cuerpo pequeño y múltiples ramificaciones que cubren una extensa superficie, lo que permite optimizar su intercomunicación. Las sinapsis, o contactos sinápticos, son los sitios donde una neurona transmite el mensaje o impulso nervioso a otra neurona. Las conexiones entre neuronas dan lugar a circuitos neuronales. Procesos tan dispares como el aprendizaje y la memoria, la respuesta a situaciones fisiológicas diversas (el embarazo, parto) y la recuperación después de sufrir lesiones tienen, por base común, la plasticidad sináptica. Pero la función del tejido nervioso sólo puede comprenderse si tomamos en consideración las otras células características de este tejido: las gliales. Desde hace tiempo se sabe que el número de células gliales duplica el de neuronas y que la glía constituye aproximadamente la mitad de la masa del tejido nervioso. En 1859, Rudolf Virchow descubrió la glía y la describió como una especie de pegamento nervioso (Allen y Barres, 2009). Cristalizó así una imagen estática de la misma, que persistió a lo largo de los 100 años siguientes. Pero esa visión ha cambiado en los dos últimos decenios en paralelo a la consideración de la función nerviosa; se contempla hoy desde la perspectiva de una unidad funcional neurona-glía, que abarca, por tanto, el desarrollo neural, la

actividad nerviosa, su mantenimiento y sus manifestaciones patológicas (Kettenmann et al. 2013; Perea et al. 2009).

La gran mayoría de los estudios en células gliales se han centrado en el sistema nervioso central, los astrocitos, los oligodendrocitos, células de Müller, células de Bergmann y microglia. Cuando se habla de las células gliales en el sistema nervioso periférico (SNP), por lo general, sólo se menciona a las células de Schwann. Sin embargo, el sistema nervioso periférico incluye un gran número de ganglios (sensoriales y autonómicos) que contienen células gliales denominadas *células gliales satélite* (SGC, del término en inglés *satellite glial cells*). El sistema nervioso entérico tiene sus propias células gliales especializadas. Las SGC rodean a las neuronas y forman una envoltura apretada alrededor de ellas. La envoltura de la SGC parece un anillo alrededor de la neurona, que es en su mayoría muy delgada y en ocasiones puede incluso ser invisibles al microscopio óptico (Hanani 2005; Figura 1). Las SGC están presentes no sólo en los ganglios sensoriales. De hecho, hay una gran población de estas células en todos los ganglios simpáticos y parasimpáticos, que son parte del sistema nervioso autónomo periférico. Debido a que las neuronas de los ganglios autónomos (a diferencia de las neuronas de los ganglios sensoriales) reciben sinapsis además de que poseen sitios sinápticos que controlan la víscera que inervan, las SGC en estos ganglios participan en la transmisión sináptica (Matthews 1983; Pannese 1981).

Se ha descrito que las interacciones neurona-SGC modifican la retracción de neuritas de neuronas en cultivo en una subpoblación de los ganglios de la raíz dorsal (DRG). Este trabajo sugiere que células no neuronales presumiblemente las SGC participan en el desarrollo de características neuronales en los ganglios sensoriales (Ng *et al.* 2010). Ahora está fuera de toda duda que las células gliales juegan un papel esencial en la mayoría de los aspectos del sistema nervioso. Ellas controlan el microambiente neuronal y participan en la regulación de la transmisión sináptica (Araque *et al.* 2001; Perea *et al.* 2009; Simard y Nedergaard 2004). Las células gliales son capaces de transmitir señales en forma de olas propagadas de liberación de calcio intracelular a través de uniones comunicantes (Scemes y Giaume 2006).

También son importantes para el desarrollo del sistema nervioso y para la formación de contactos sinápticos (Barres 2008). La glía tiene un lugar central en los trastornos neurológicos, la inflamación y el dolor (Giaume *et al.* 2007; Milligan y Watkins 2009).

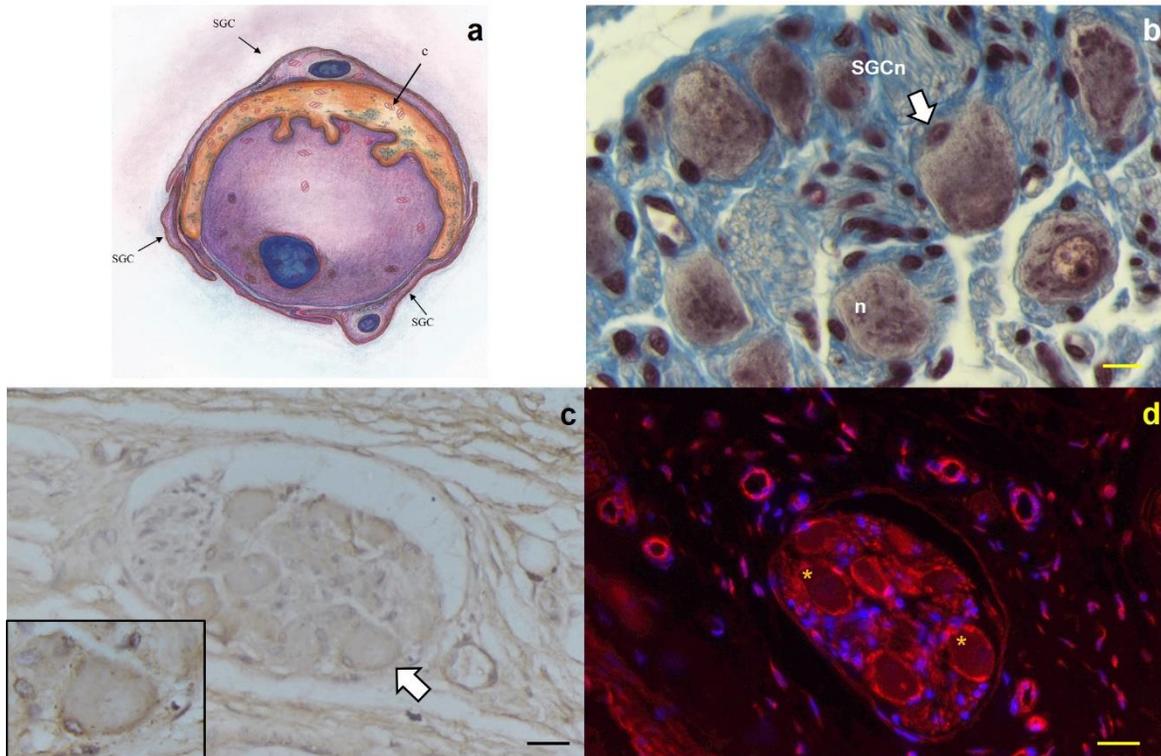


Figura 1. Células de la glía satélite a) morfología de una unidad funcional neurona-glía en el ganglio ciliar de pollo (modificado de Hanani *et al.* 2010). b) Fotomicrografías de ganglios paravaginales teñidos con tricrómica de Masson (Hernández-Aragón LG *et al.* 2017), c) marcaje inmunohistoquímico anti-GFAP (Hernández-Aragón LG *et al.* 2017) y d) anti-vimentina. Barra 50 μ m.

Cambios en el número, tipo y función de las conexiones del sistema nervioso, en la morfología y función de la glía y en las interacciones neurona-glía son la base de la adaptación de los vertebrados a condiciones ambientales y fisiológicas cambiantes. Agrupados bajo la denominación *plasticidad neural*, estos cambios subyacen bajo el aprendizaje, la respuesta a la deshidratación o la reparación de lesiones. Se entiende por plasticidad a la capacidad de las células del sistema

nervioso para regenerarse anatómica y funcionalmente, después de estar sujetas a influencias patológicas, ambientales o propias del desarrollo, incluyendo traumatismos y enfermedades (Castroviejo 1996).

2. Conducta reproductiva

Los esteroides ováricos regulan la reproducción de las hembras y conducta de lordosis debido a la unión a su receptor intracelular en el cerebro (Ogawa *et al.* 1998). Algunos estudios han identificado al menos tres regiones supraespinales esenciales en varios aspectos de la conducta reproductiva de las hembras de mamíferos, entre estas se incluyen al núcleo ventromedial (VMN), el área preóptica (MPO) y la sustancia gris periacueductal (PAG; Pfaff y Sakura 1979 a,b; Pfaff *et al.* 1994), Este último juega un papel facilitador en la conducta reproductiva femenina, ya que envía proyecciones a los núcleos paragigantocelulares, el cual subsecuentemente proyecta motoneuronas a la región espinal toraco-lumbar que inerva el eje muscular y las neuronas lumbosacras que inervan los órganos pélvicos (Coolen *et al.* 1996; Dudley y Moss 1987; Lonstein y Stern 1998; McCarthy *et al.* 1991; Sakuma y Pfaff 1979; Schwartz-Giblin y McCarthy 1995). La respuesta de lordosis es un reflejo espinal, el cual está bajo influencias de hormonas e inervación autonómica de los órganos sexuales (Fegiz *et al.* 1986; Yang *et al.* 2000).

En la rata, el nervio pélvico provee de inervación sensitiva a la vagina, cérvix y útero (Berkley *et al.* 1990; Peter *et al.* 1987). La inervación pélvica en las hembras ha sido estudiada ampliamente en esta especie (McKenna 2002). En la rata, la inervación autonómica de los órganos pélvicos es regulada por el ganglio pélvico principal o paracervical (llamado así en el conejillo de indias) (Langworthy 1965; Purinton *et al.* 1976). Es una estructura triangular compacta localizada sobre el margen lateral del lóbulo lateral de la próstata en machos y el cérvix en las hembras (Dail 1996; Baljet y Drukker 1980; Papka *et al.* 1991). Las fibras post-ganglionares del ganglio pélvico inervan los órganos pélvicos, incluyendo la vejiga, glándulas sexuales accesorias, vagina, útero, clítoris y pene (Jöbling 2011). Los nervios hipogástrico y pélvico unen a los genitales con el sistema nervioso central vía fibras

aferentes y eferentes las cuales contribuyen a la respuesta sexual (Giuliano *et al.* 2002).

3. Fisiología reproductiva

En hembras de mamíferos la fisiología reproductiva requiere de la coordinada participación del aparato urogenital, la musculatura estriada pélvica y perineal, así como del plexo pélvico. El aparato urogenital femenino está conformado por dos grupos de órganos, los genitales y los urinarios. Los genitales participan en funciones reproductivas como la cópula y el parto. En tanto, los urinarios elaboran, almacenan y eliminan la orina. En la mujer y la rata, los conductos genital y urinario están separados a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de las hembras de mamíferos; otras especies como la hiena (Cunha *et al.* 2003), la gata (de Groat y Ryall 1969), la perra (Li y Masuko 1997) y la coneja (Popesko *et al.* 1990), solo tienen un solo conducto. De tal manera que el aparato genital y el urinario están conectados por la desembocadura de la uretra en la vagina en un punto denominado conducto urogenital, que cumple con funciones reproductivas como la cópula y el parto y no reproductivas como la expulsión de orina (Wake 1992).

3.1. Gestación y parto

En los mamíferos, el cuerpo lúteo en el ovario es la estructura que secreta la mayor cantidad de progesterona durante el inicio de la gestación promoviendo su establecimiento y mantenimiento (Tessier *et al.* 2003). La progesterona es esencial en el mantenimiento del embarazo al establecer la quiescencia uterina. La membrana fetal participa en la iniciación y mantenimiento del parto al ser el sitio de mayor síntesis y metabolismo de las prostaglandinas. El incremento de la síntesis de prostaglandinas ocurre en el parto a término y pre-termino (Myatt y Sun 2010).

En las últimas semanas de gestación, el peso y el tamaño fetal incrementan considerablemente. Por lo que aumenta la presión intra-abdominal y se distiende la musculatura estriada adyacente a las vísceras pélvicas, rompiéndose algunas de

sus fibras musculares y nerviosas. El parto es un periodo breve del ciclo reproductor, pero de gran relevancia para la sobrevivencia de la madre y las crías. Se caracteriza por contracciones de la musculatura estriada abdominal y del útero asociadas con la dilatación cervical, que permiten la expulsión de la(s) cría(s) y placenta (s; Tresguerres 1992), venciendo la resistencia ofrecida por el cuello uterino y la fricción creada en el canal del parto durante el paso del feto. Cuando el cuello del útero se dilata totalmente, la fuerza más importante en la expulsión del feto es la presión intra-abdominal materna generada por la contracción de músculos abdominales en forma simultánea con esfuerzos respiratorios forzados (Hellman *et al.* 1975; Cunningham *et al.* 1998). Durante la fase de expulsión del feto, los músculos, las fascias y los nervios del piso pélvico son expuestos a una distensión en dirección longitudinal por la cabeza del producto hasta la apertura máxima del canal del parto (Figura 2). Esta distensión propicia un decremento en la contracción de la musculatura estriada del piso pélvico, daños en la inervación y en las fascias (Shüssler *et al.* 1994).

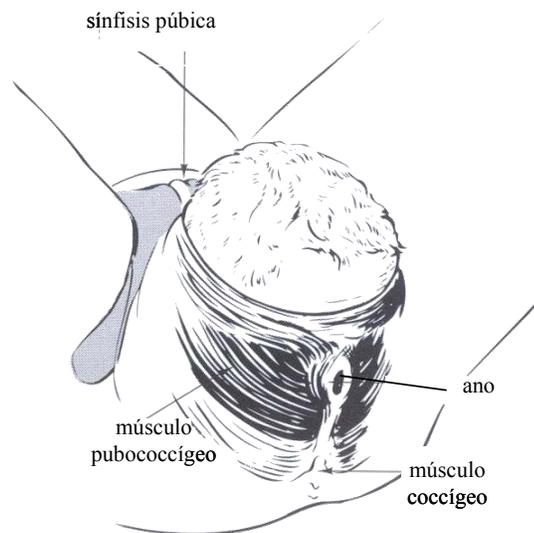


Figura 2. Esquema de la región perineal que ilustra la distensión de las fibras de musculatura estriada adyacente a la apertura vaginal durante la expulsión de la cría. Modificada de Schüssler *et al.* 1994.

4. La coneja como modelo de estudio

La coneja presenta un conducto urogenital que se asocia con músculos estriados de la región pélvica (coccígeo, iliococcígeo y pubococcígeo, obturador externo e interno) y perineal (constrictor vestibular, isquiocavernoso y bulboesponjoso; Martínez-Gómez *et al.* 1997; Cruz *et al.* 2002). De acuerdo a su posición anatómica podemos dividir al conducto vaginal en tres regiones: abdominal, pélvica y perineal (Rodríguez-Antolín *et al.* 2009; Figura 3). Esta regionalización es análoga a la ya descrita por otros autores donde se divide al conducto vaginal en anterior, media y posterior (Al-Hijji *et al.* 2000; Giraldi *et al.* 2002; Oh *et al.* 2003). La región abdominal se ubica en la cavidad abdominal y se relaciona con la vejiga y el doble cérvix; la pélvica se encuentra alojada en la cavidad pélvica y es el sitio en el cual la uretra distal desemboca en el seno urogenital rodeado por un plexo venoso; la región perineal o porción protuida se relaciona con la musculatura estriada perineal y con las glándulas inguinales y prepuciales (Martínez-Gómez *et al.* 1997).

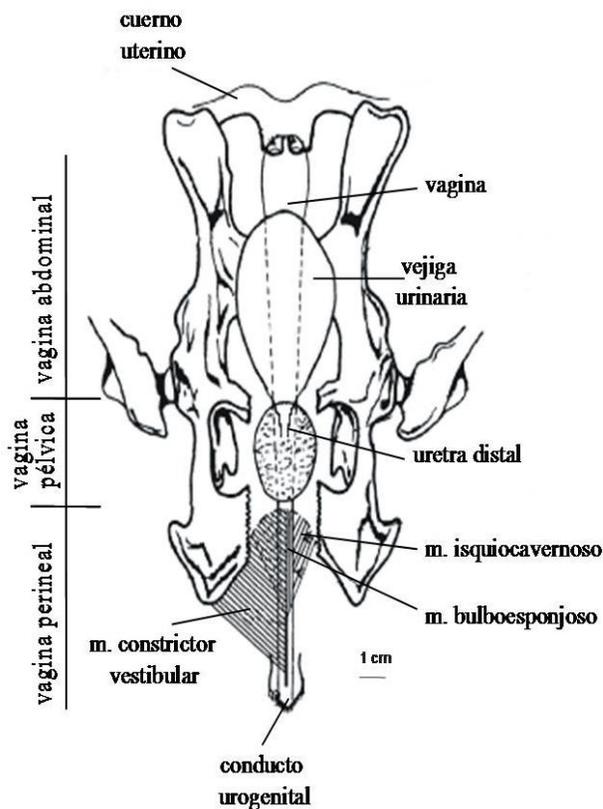


Figura 3. Esquema que ilustra las características anatómicas del aparato urogenital inferior en la coneja. Modificada de Martínez-Gómez *et al.* 1997.

La vagina es el receptáculo del pene durante la cópula por lo que la respuesta fisiológica femenina depende de la regulación neuronal vaginal y de la relajación del músculo liso que promueve el flujo sanguíneo y el flujo de fluidos vaginales, lubricando la vagina para facilitar la penetración (Giraldi *et al.* 2002). La vagina es un conducto músculo-membranoso que se extiende desde el cuello uterino a la vulva. Se sitúa por delante del recto, por detrás de la vejiga y por debajo del cuello uterino. La superficie interna es rugosa, por la presencia de pliegues longitudinales y transversales, formados por cúmulos de tejido elástico que permite al órgano distenderse (Quiroz 2004). Histológicamente, la vagina está constituida por una capa externa formada por tejido conjuntivo; una capa media muscular de musculatura lisa (Giraldi *et al.* 2002; Resplande *et al.* 2002) y una mucosa de epitelio plano estratificado (Geneser 2000; Figura 4).

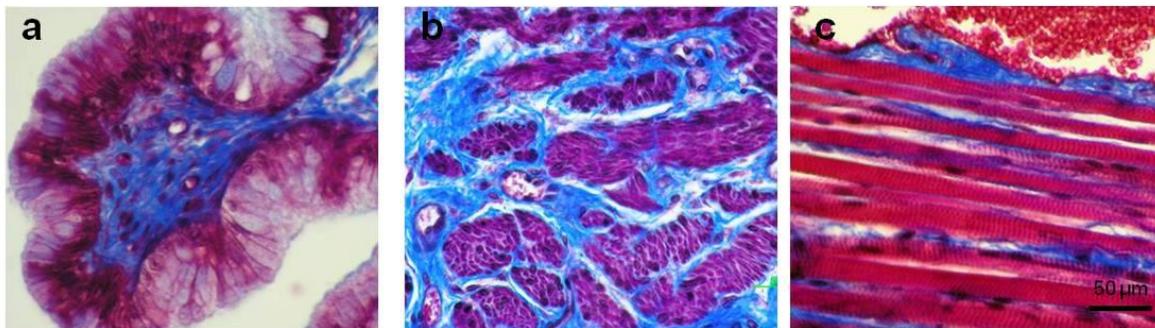


Figura 4. Fotomicrografías de la pared vaginal teñidas con Tricrómica de Masson de una coneja virgen. a) Mucosa; b) muscular y c) externa. Barra = 50µm (Xelhuantzi Arreguin 2012).

5. Hormonas gonadales

Las hormonas gonadales femeninas (progesterona y estradiol), también llamadas esteroides ováricos, son derivados del colesterol por lo que son liposolubles. Son sintetizadas por las células de la granulosa (estradiol, E2) y de la teca (progesterona, P4) del folículo ovárico. Su síntesis es regulada por hormonas hipofisarias: hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) cuya producción a su vez, es promovida por una hormona hipotalámica, la hormona

estimulante de gonadotropinas (GnRH). La hormona FSH controla la síntesis estrogénica de los folículos ováricos y actúa sobre las células de la granulosa. La LH también actúa sobre la síntesis de estrógenos ya que controla la producción de testosterona (molécula precursora esencial) por las células de la teca interna. Las hormonas gonadales afectan la liberación de gonadotrofinas, ya que a bajas concentraciones de estradiol y progesterona provocan un aumento en la síntesis de LH y FSH, mientras que altas concentraciones bloquean la síntesis de las hormonas hipofisarias. La síntesis de progesterona que realiza el cuerpo lúteo está controlada por la LH (Nussey y Whitehead, 2001).

Para su transporte, los esteroides ováricos se unen a proteínas plasmáticas acarreadoras, como la globulina fijadora de hormonas sexuales y la albúmina. Menos del 5% de las hormonas gonadales permanecen en forma libre, el resto viaja unido a proteínas acarreadoras, quienes las llevan hasta los tejidos u órganos diana donde ejercerán su acción (Britt y Findlay, 2002).

La expresión del receptor de estrógenos (RE) en los órganos varía dependiendo del tipo de tejido. El RE- α es expresado en útero, glándula mamaria, hígado y en el sistema nervioso central, el RE- β se expresa en el tracto urogenital, ovario, hueso, endotelio, pulmones, el sistema nervioso central y próstata. De esta forma, los estrógenos poseen diferentes acciones en el tracto reproductivo femenino: a) estimulan el crecimiento del endometrio (necesario para el mantenimiento del cigoto antes de la implantación), b) causan actividad secretora en el oviducto (lo que favorece la supervivencia de óvulo y espermatozoide), c) regulan la secreción de gonadotrofinas, d) favorecen la liberación de prostaglandinas (moléculas que promueven la contracción de la musculatura lisa) por el útero grávido y no grávido, y e) promueven la liberación de mucinas para la lubricación en la vagina (Britt y Findlay 2002).

6. Inervación del aparato urogenital

La inervación de los órganos reproductivos proviene del plexo pélvico, el cual está formado por una red de ramas de diferentes nervios entre los que se encuentran el nervio pélvico (parasimpático), el nervio hipogástrico (simpático) y el nervio pudendo (somático; de Groat 2006). La estructura anatómica del plexo pélvico puede variar dependiendo de la especie. En la mujer (Imai *et al.* 2006), la coneja (Langley y Anderson 1896; Castelán *et al.* 2013; Cruz *et al.* 2017) y la perra (Li y Masuko 2001), el plexo forma una red de ramas nerviosas con un gran número de ganglios incorporados en ella (Figura 5). A diferencia de lo que ocurre en el cobayo y la rata donde existe un ganglio de mayor tamaño denominado ganglio pélvico principal (Hondeaun *et al.* 1995).

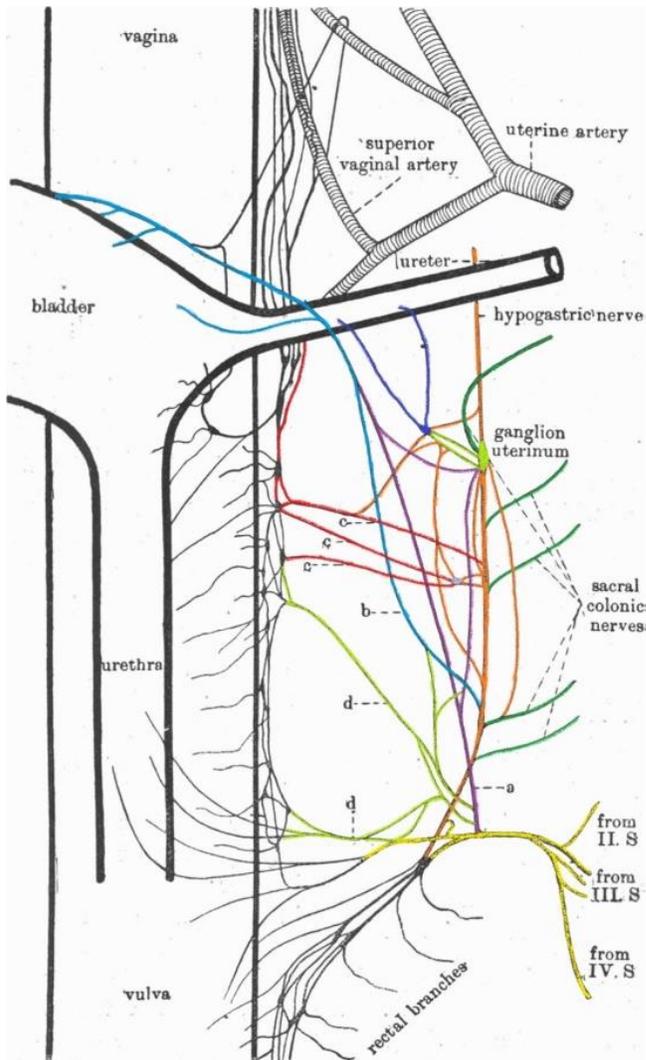


Figura 5. Esquema del plexo pélvico en la coneja, a) rama vesical (púrpura), b) hebra vesical (azul), c) nervio pélvico (rojo), d) filamentos del nervio pélvico (verde). S, proveniente de la raíz dorsal de las vértebras sacras (amarillo), nervio hipogástrico (anaranjado) Langley y Anderson, 1896.

Los ganglios pélvicos son ganglios mixtos que contienen neuronas simpáticas y parasimpáticas (Wanigasekara *et al.* 2005). Dichos ganglios proveen la mayoría de las conexiones nerviosas autonómicas a la vejiga, intestino grueso y órganos reproductivos (Keast 2006). La inervación vaginal autonómica se completa con la de los ganglios adosados a la pared vaginal como los paracervicales (Dail 1996; Hondeau *et al.* 1995) y los paravaginales (Langley y Anderson 1896; Owman y Sjöberg 1966; Castelán *et al.* 2013; Cruz *et al.* 2017; figura 6). Por lo tanto, alteraciones en la inervación de este conducto podrían generar trastornos en la fisiología reproductiva y la micción femenina.

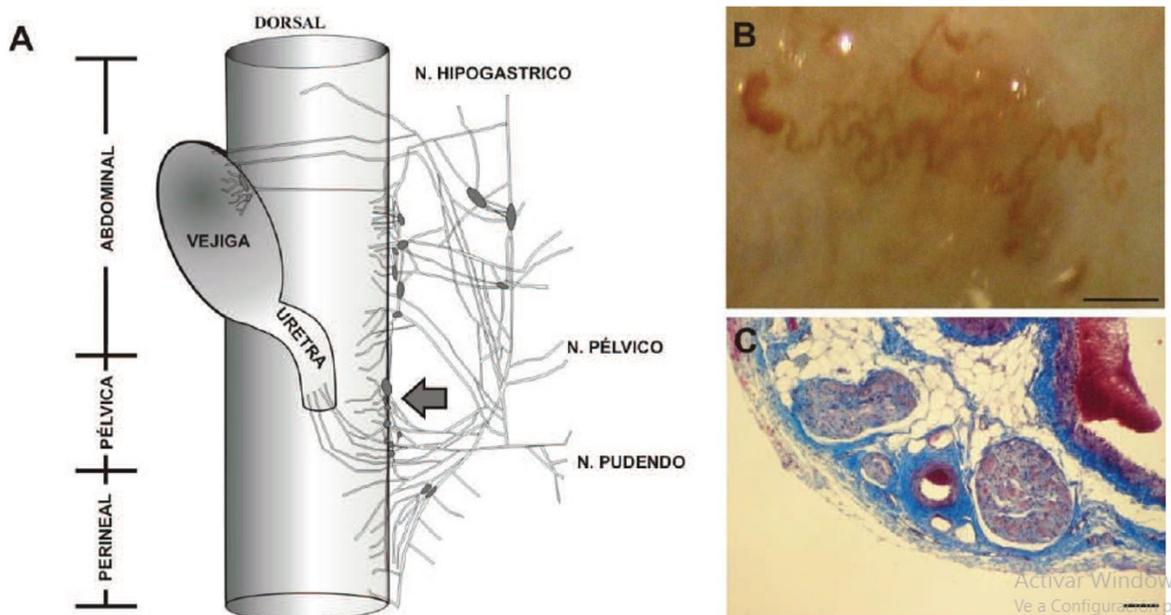


Figura 6. A) Esquema que ilustra la inervación vaginal a nivel de la desembocadura de la uretra en la vagina en la coneja, B) fotomicrografía de los ganglios paravaginales inmersos en el tejido conectivo paravaginal teñidos con acetilcolinesterasa, C) fotomicrografía de las neuronas inmersas en los ganglios paravaginales teñidos con tricrómica de Masson; Barra 100 µm (Xelhuantzi Arreguin 2012).

En nuestro grupo de investigación hemos observado consistentemente nervios y ganglios en el tejido paravaginal dorsolateral de la coneja (Castelán *et al.* 2013). Los ganglios paravaginales forman parte del plexo pélvico (Langley y Anderson 1896).

Los ganglios paravaginales están envueltos en una densa cápsula de tejido conectivo. Frecuentemente se observan con formas circulares y ovales, aunque en ocasiones tienen una forma de bastón. La mayoría de las neuronas ganglionares son de distintos tamaños, y tienen forma poligonal u ovoide (Figura 7). Sus prolongaciones citoplásmicas son escasas. Los núcleos de las células de la glía satelital ganglionar se observan alrededor de los somas neuronales y en el espacio entre ellos.



Figura 7. Reconstrucción de la innervación autonómica en conejas vírgenes, que muestran los ganglios y nervios adosados a la vagina pélvica. fotomicrográficas de secciones longitudinales teñidas con acetilcolinesterasa. El diagrama muestra el punto de inserción de la uretra (punta de flecha) en la vagina pélvica (línea gruesa); B: vejiga, U: uretra, V: vagina. Barra, 50 μ m; (Castelán *et al.* 2013).

La inmunorreactividad anti- β -tubulina III evidencia axones cortados transversal y longitudinalmente. Los ganglios paravaginales contienen neuronas noradrenérgicas (tirosina hidroxilasa positivas) y colinérgicas (acetilcolina transferasa positivas), siendo estas últimas las que predominan (Castelán *et al.* 2013, Figura 8).

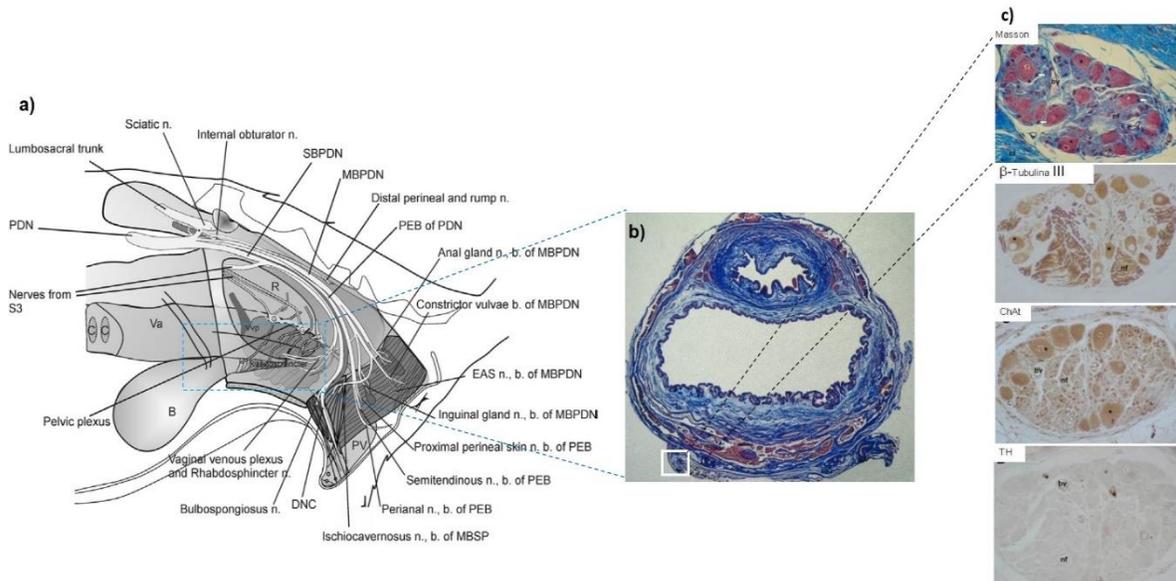


Figura 8. a) Plexo pélvico de la coneja. b) Fotomicrografía de un corte transversal de la vagina pélvica. c) Fotomicrografías de ganglios paravaginales teñidos con tricrómica de Masson y marcaje inmunohistoquímico, (Cruz *et al.* 2017; Castelán *et al.* 2013).

7. Factores neurotróficos

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

7.1. Factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales

El factor de crecimiento neuronal derivado de células gliales (GDNF) se caracterizó originalmente en 1993 como un factor de crecimiento de la promoción de la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio ventral, las cuales se degeneran en la enfermedad de Parkinson (Lin *et al.* 1993). Más tarde, se encontró que tiene efecto sobre la supervivencia de las neuronas motoras y otras sub-poblaciones de neuronas en el sistema nervioso central y periférico (Airaksinen *et al.* 1999 y 2002; Henderson *et al.* 1994). Además de su papel como factor de supervivencia, el GDNF también es esencial para la proliferación, migración y diferenciación de las células neuronales. Este factor pertenece a la familia de factores de ligandos (GFLs) los cuales participan en el desarrollo y la función del sistema nervioso (Airaksinen *et al.* 1999 y 2002). Una característica común del complejo de receptores para la GFLs es tener dos subunidades del receptor: la tirosina quinasa del receptor Ret, la cual es especializada en la señalización transmembrana y otra relacionada con la unión del ligando, la glucosilfosfatidilinositol anclada al co-receptor GFR α (el receptor α de la familia GDNF; Paratcha y Ledda 2008). Factores como la neurturina (NRTN) y artemina (ART) son importantes para diversos tipos de neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas, así como para subpoblaciones de neuronas periféricas autonómicas y sensoriales (Buj-Bello *et al.* 1995; Trupp *et al.* 1995).

7.1.1. Co-receptores GFR α -RET de la familia de GFLs

Recientemente se ha descrito que la señalización de los GFLs es a través de un complejo receptor multicomponente (Figura 9; Paratcha y Ledda 2008). Dicho complejo está formado por dos unidades co-receptoras; el receptor alfa de la familia de receptores de los GFLs (GFR α , 1-4) el cual está unido a la superficie celular a través de un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) y el co-receptor transmembrana de tirosina cinasa de RET (Durbec *et al.* 1996, Jing *et al.* 1996, Treanor *et al.* 1996, Trupp *et al.* 1996).

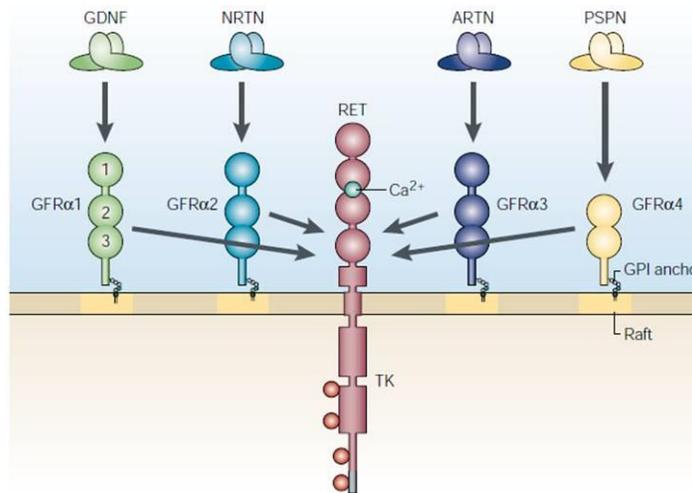


Figura 9. Familia de ligandos del factor de crecimiento derivado de células gliales (GDNF). Actúan mediante 2 co-receptores: tirosina cinasa del receptor RET y glucosilfosfatidilinositol anclada al co-receptor GFR α 1–4, Tomado de Airaksinen y Saarma 2002.

Se conocen 4 isoformas de la subunidad GFR α -1 del receptor, que va del GFR α -1 al GFR α -4 manteniendo su especificidad para el ligando y el complejo GFR α -RET; GDNF se une a GFR α -1 posteriormente se une con RET y se forma un complejo, NRTN se une a GFR α -2, persepina (PSPN) se une a GFR α -3 y ARTN se une con GFR α -4 (Takahashi 2001). Los GFR α por lo general están anclados a la membrana, pero por medio de la acción de alguna proteasa o fosfolipasa se pueden obtener formar libres de este co-receptor.

RET es una proteína transmembrana la cual está compuesta por cuatro caderinas (dominio extracelular) y un dominio intracelular de tirosina quinasa. Se sugiere que un dímero de GDNF se pega al GFR α -1, formando un complejo GDNF-GFR α -1, este complejo se une a RET induciendo su homodimerización y autofosforilación en la tirosina (Airaksinen y Saarma 2002). RET por sí solo no puede activar a los GFLs, se requiere de GFR α y RET para formar un receptor GFL funcional (Baloh *et al.* 2000, Airaksinen *et al.* 1999 y 2002; Figura 10).

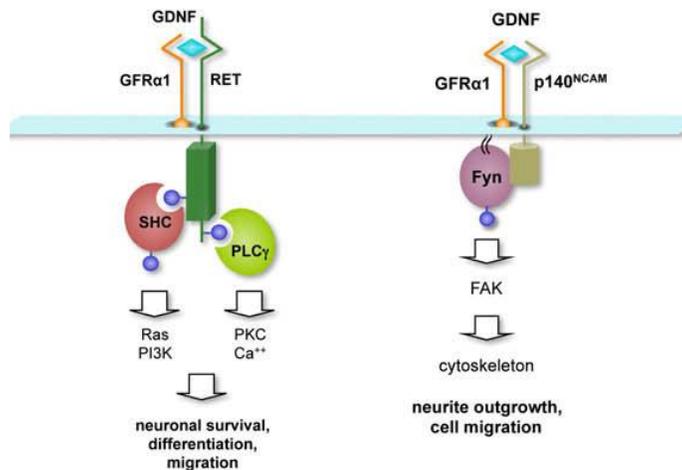


Figura 10. Ilustración esquemática de las diferentes funciones del GDNF a través del receptor GFR α -1. El GDNF activa dos vías de señalización. (A), Vía de señalización de SHC (proteína adaptadora) enlazada al co-receptor de GFR α -1 (RET). Esta vía induce la activación de moléculas de señalización que promueven la supervivencia neuronal, la diferenciación y la migración. (B). Vía de señalización de la cinasa Fyn a través del co-receptor NCAM. Esta vía induce el crecimiento neurítico y la migración celular. Tomado de Ibáñez *et al.* 2010.

8. La experiencia reproductiva modifica la inervación autonómica

Estudios en diferentes especies, incluyendo humanos, han mostrado que la gestación está asociado a la pérdida progresiva de inervación uterina simpática a través de la degeneración de las terminales axónicas (Brauer, 2008). En la gestación, disminuye el área de las fibras de colágeno y el fenotipo de las células de músculo es transformado. En el periodo postparto tardío estas características se observan similares a las observadas antes de la gestación (Daucher *et al.* 2007). Además, se ha reportado un incremento del área de la capa submucosa vaginal de ratas gestantes a término con respecto de las gestantes en el período temprano. Este cambio previo al parto, probablemente favorece la distensión mecánica (Liao y Smith 2011). La capacidad de distensión vaginal incrementa durante el embarazo (Alperin *et al.* 2010). Este hallazgo caracteriza una importante adaptación maternal.

La capacidad de la vagina para distenderse con un incremento mínimo de presión durante la gestación está vinculada a la reducción de riesgo de daño tanto a la madre como al feto durante el parto. En eventos donde la máxima capacidad para distenderse es excedida como el caso de fetos de gran tamaño, la vagina y los tejidos que la rodean se dañan y es posible que no tengan una recuperación efectiva (Alperin *et al.* 2010).

Datos obtenidos por nuestro grupo de investigación muestran que la multiparidad (cuatro partos consecutivos) promueve un desarreglo en la matriz extracelular y contenido de colágeno de los ganglios paravaginales. El área de las neuronas ganglionares no se modifica, a pesar de que existe una ligera tendencia a aumentar en las múltiparas. De manera interesante, 30% menos neuronas ganglionares fueron cuantificadas en los ganglios de las conejas múltiparas de la misma edad (Castelán *et al.* 2013; Xelhuantzi-Arreguin 2012; Figura 11). La gestación y el parto afectan la morfología de las neuronas ganglionares. Se ha reportado que tanto el área del soma de la neurona y el área ganglionar es menor, aunque no existen diferencias en el número de ganglios, neuronas por ganglio y nervios en conejas gestantes a término y primíparas tres días posparto comparadas con conejas vírgenes de la misma edad (Castelán *et al.* 2013; Hernández-Aragón 2012, Figura 12). En un modelo artificial en el cual se utilizaron conejas ovariectomizadas y ovariectomizadas con reemplazo hormonal de estrógenos se observó que el área del ganglio es menor en el grupo ovariectomizado con respecto al grupo control y el reemplazo hormonal no revierte tal efecto; para el área del soma de las neuronas también se observó una disminución en el grupo ovariectomizado con respecto al grupo control y este parámetro es revertido con el reemplazo hormonal (Hernández-Aragón *et al.* 2017; Ramírez-Corona 2011).

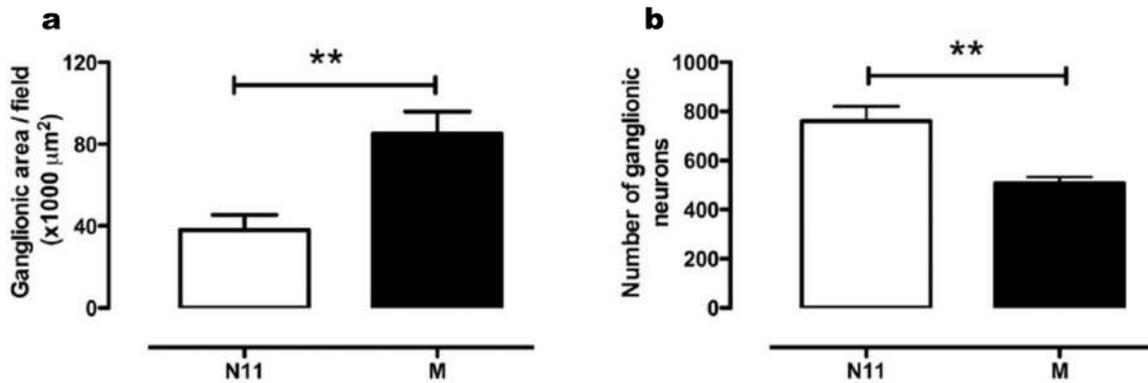


Figura 11. Efecto de la multiparidad en la morfometría de los ganglios paravaginales. a) Área ganglionar por campo, b) número de las neuronas por ganglio. Se utilizaron una ANOVA de dos vías seguido de una *post-hoc* de *t-de Student* para determinar las diferencias entre los grupos (** $P < 0,01$; Castelán *et al.* 2013).

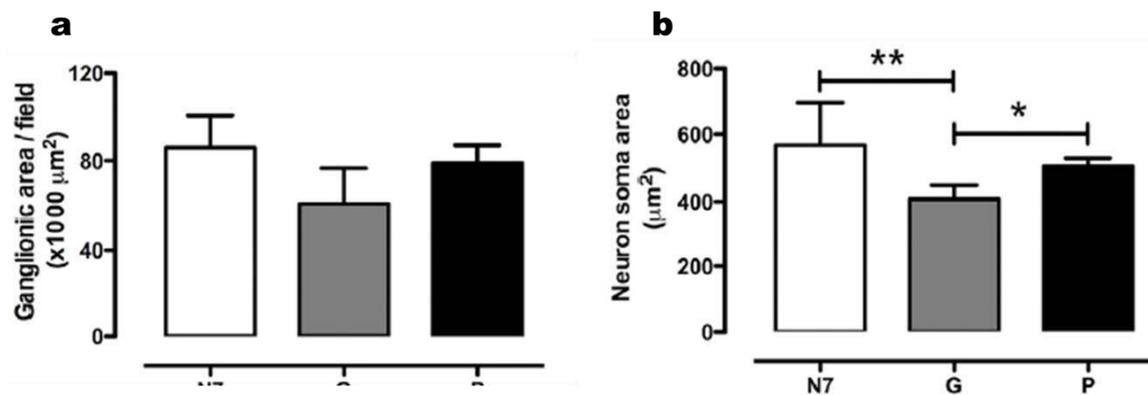


Figura 12. Efectos de la gestación (G) y primiparidad (P) en la morfometría de los ganglios paravaginales. a) Área ganglionar por campo, b) área del soma de las neuronas. Los datos muestran la media \pm error estándar. Se utilizó una ANOVA de una vía seguido de una prueba *post-hoc* de *Newman-Keuls*, para determinar diferencias entre los grupos (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; Castelán *et al.* 2013).

9. Influencia de los estrógenos sobre la inervación autonómica

Los estrógenos son un potente regulador de la inervación periférica, particularmente de los órganos reproductivos. Los ganglios paravaginales en la coneja poseen receptores de estrógenos alfa, beta (Castelán *et al.* 2013) y NOS

neuronal que modulan su expresión y actividad con la deficiencia de estrógenos (Batra y Al-Hijji, 1998; Yoon *et al.* 2001). Los receptores de estrógenos (ER) abundantes en los tejidos del aparato urogenital inferior (Hextall 2000), son abundantes en el tejido vaginal (MacLean *et al.* 1990; Mowa e Iwanaga 2000). En la vagina, los estrógenos inducen proliferación del epitelio vaginal y remodelación vascular a través de los subtipos alfa y beta del receptor de estrógenos (Buchanan *et al.* 1998). Estos receptores actúan como factores de transcripción activados por ligando o como receptores de membrana acoplados a cascadas de señalización intracelular (Papka y Mowa 2003). Los ER han sido localizados en el sistema nervioso simpático y parasimpático, principalmente en neuronas sensitivas del tracto reproductor femenino (Zoubina y Smith 2002; Papka y Mowa 2004).

Se ha mostrado que los estrógenos participan en las dimensiones de las ramas sensoriales genitales. Se ha observado que la ovariectomía disminuye la longitud del nervio clitoral que emerge del nervio pudendo en la rata. Este efecto es revertido mediante la administración de estradiol y alcanza una longitud similar a la de ratas intactas (Komisaruk 1981). Por otro lado, en neuronas del núcleo grácil (ubicado en el límite entre la médula y el bulbo) se ha observado que la ovariectomía aumenta la respuesta excitatoria generada por la distensión vaginal y esta respuesta disminuye con el tratamiento de estradiol en concentraciones fisiológicas. Por lo que se ha propuesto que las fibras del nervio pudendo podrían proyectarse desde el núcleo grácil y expresan receptores de estrógenos (Bradshaw H.B. y cols. 2003). El incremento en los niveles de estrógenos se ha asocia con un incremento en la inmunorreactividad de genes relacionados con la inervación sensitiva en la glándula mamaria (Blacklock y Smith 2004) y la depleción de la inervación simpática del útero (Brauer *et al.* 1995; Zoubina *et al.* 2001). Por lo que es muy probable que los estrógenos modulen la inervación vaginal. Ting y colaboradores (2004) han propuesto que las hormonas reproductivas además de regular al tejido vaginal, también regulan la su inervación. Lo cual implica que los estrógenos modulan la neuro-plasticidad vaginal. Por lo que, la disfunción vaginal durante la menopausia puede relacionarse con cambios en la inervación. El incremento de terminales simpáticas en ratas ovariectomizadas puede favorecer la vasoconstricción y

sequedad vaginal. Mientras que la proliferación de axones sensoriales puede contribuir a la percepción de dolor, ardor y comezón asociados a la menopausia (Ting *et al.* 2004). Es posible que los estrógenos afecten directamente la inervación vaginal contribuyendo de esta forma a cambios en la función vaginal.

Se ha demostrado que los estrógenos son un potente regulador de la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en la corteza cerebral y bulbo olfatorio. Estudios recientes han extendido sus hallazgos y reportan que los estrógenos regulan la expresión de BDNF en diferentes especies (Dittrich *et al.* 1999, Krizsan-Agbas *et al.* 2003). Cambios en la inervación simpática de la vagina se asocian a los cambios en los niveles de estrógenos, sustancialmente se ha reportado una hiperinervación, la cual ocurre después de la ovariectomía (OVX; Zoubina y Smith 2000; Zoubina *et al.* 1998; Zoubina *et al.* 2001). En un estudio utilizando un modelo de ovariectomía al cuantificar los niveles séricos de estradiol se observa una disminución a partir de la cuarta semana de ovariectomía y se muestran modificaciones en la morfometría de los ganglios paravaginales (Hernández-Aragón *et al.* 2017; Ramírez-Corona 2011).

10. Factores neurotróficos y los ganglios pélvicos

La extensión del axón y la migración neuronal en el sistema nervioso periférico se ve influida por numerosos factores neurotróficos como los factores de la familia de neurotrofinas que consta de cuatro miembros: el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor derivado del encéfalo (BDNF) y las neurotrofinas 3 y 4 (NT-3, NT-4), además de algunos miembros de la familia GFL. El NGF, NT-3, NT-4 y GDNF se expresa en los tejidos inervados por las neuronas pélvicas como en el colon, los conductos deferentes del pene y la vejiga (García-Suarez *et al.* 1996; Henderson 1996; Taraviras *et al.* 1999; Tuttle *et al.* 1994). En estudios realizados en animales después del parto y adultos, observaron cambios en las neuronas pélvicas, destacando una inervación deficiente ya que hay denervación parasimpática en los órganos reproductivos (Laurikainen *et al.* 2000; Kawakami *et al.* 2003).

El aparato urogenital sintetiza el NGF y las neuronas noradrenérgicas de los ganglios pélvicos expresan receptores para este factor, como p75^{NTR} y Trk-A (Keast 2006). La señalización de factores neurotróficos es relevante para la recuperación de lesiones que afecten la inervación simpática y parasimpática. En esta última el GDNF es crítico para supervivencia neuronal; las neuronas parasimpáticas expresan los receptores para este ligando (GFR α -1 y 2; Keast 2006). En el ganglio pélvico principal del macho de la rata se ha identificado la expresión del GFR α -2 (Hisasue *et al.* 2006) y el GFR α -3 (Laurikainen *et al.* 2000), así como la expresión del GDNF y neurturina (Laurikainen *et al.* 2000), lo que apoya las propuestas sobre la importancia de los miembros de la familia del GDNF en la inervación autonómica del área pélvica. Hisasue y colaboradores en el 2006 demostraron que la edad y la castración influye sobre el número de neuronas pélvicas inmunorreactivas al GFR α -2 y la sintetasa neuronal del óxido nítrico (nNOs), lo que sugiere que el efecto de la edad y el estado hormonal afecta a los tejidos cavernosos y a la plasticidad de su inervación, ambos involucrados en la erección peneana. En cuanto a la modulación hormonal y la señalización de GDNF, se ha reportado que la expresión del receptor Ret en la hipófisis de la rata varía con la experiencia reproductiva, siendo mayor al final de la gestación y al inicio de la lactancia y en coincidencia con la plasticidad funcional de la hipófisis mediada por el GDNF (Guillou *et al.* 2011).

11. Justificación

La reproducción de las hembras de mamíferos incluye diversos procesos fisiológicos y conductuales, los cuales podrían modificar la inervación autonómica vaginal y con ello alterar su función. En mujeres se ha mostrado una correlación positiva entre patologías como la incontinencia urinaria y el parto vaginal, sugiriendo que el daño uretral, y a la musculatura estriada pélvica y perineal es irreversible (Delgado y cols. 1971, Thom y cols.1997).

El aparato urogenital y su inervación autonómica no solo se exponen al efecto mecánico de la distensión vaginal durante la expulsión de la cría, sino que también existe un control hormonal que regula la experiencia reproductiva de una hembra.

La experiencia reproductiva induce una serie de cambios transitorios en las neuronas y células gliales de los ganglios paravaginales (multiparidad, Castelán *et al.* 2013; ovariectomía y restitución hormonal, Hernández-Aragón *et al.* 2017). Ciertamente, algunos de ellos podrían depender de acciones ejercidas por factores neurotróficos a través de receptores específicos. En este contexto no hay información sobre la asociación de factores neurotróficos con la remodelación de ganglios pélvicos en hembras de mamíferos, pero se puede sugerir que la señalización de factores neurotróficos es relevante para la recuperación de lesiones que puedan afectar la inervación simpática y parasimpática.

12. Hipótesis

La experiencia reproductiva modificada la morfometría y la expresión de factores neurotróficos en los ganglios paravaginales de la coneja.

13. Objetivo general

Determinar si la experiencia reproductiva modifica la morfometría y aumenta la expresión de factores neurotróficos en los ganglios paravaginales de la coneja.

13.1 Objetivos específicos

En la vagina pélvica de conejas control (C), gestantes a término (G30) y primíparas tres días posparto (P3):

- 1) Determinar las características morfométricas de las neuronas de los ganglios paravaginales.
- 2) Cuantificar el número de células de la glía satélite por neurona.
- 3) Determinar la expresión de GFAP en los ganglios paravaginales.
- 4) Determinar la expresión de GDNF en los ganglios paravaginales.
- 5) Determinar la expresión del receptor $GFR\alpha-1$ y $p75^{NTR}$ en los ganglios paravaginales.
- 6) Determinar la expresión del receptor Trk-A y Trk-B en los ganglios paravaginales.

14 Metodología

14.1. Animales y grupos. Se utilizaron conejas (*Oryctolagus cuniculus*) de la raza Chinchilla de 6 meses de edad, las cuales se mantuvieron en el bioterio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Las conejas se alojaron en jaulas individuales de acero inoxidable (50 x 60 x 40 cm) en condiciones ambientales habituales (16 h / 8 h de luz y oscuridad; T= 22 ± 2°C) y se alimentaron con (Conejina, Purina) y agua *ad libitum*. Se dividieron en tres grupos: conejas control (C); conejas gestantes a término (día 30 de gestación, G30), primíparas tres días posparto (P3). El número de animales por grupo fue de seis. El uso y manejo de estos animales para experimentación fue aprobado por la Comisión de Ética del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta.

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

14.3. Obtención de la vagina pélvica. Se realizó una incisión sobre la línea media, desde la cavidad abdominal hasta la vagina perineal. De acuerdo con el protocolo descrito por Rodríguez-Antolín y colaboradores (2009), los músculos abdominales y el tejido adiposo del área se extrajeron. Después se removieron los huesos isquion y pubis, así como los músculos obturadores externos e internos. Se ligaron venas y arterias que irrigan al plexo venoso para evitar hemorragias y se extrajo el segmento pélvico de la vagina. Usando la desembocadura uretral como referencia se cortó el segmento vaginal pélvico comprendido 3 cm en dirección craneal y 3 cm en dirección caudal (Figura 13; Castelán *et al.* 2013).

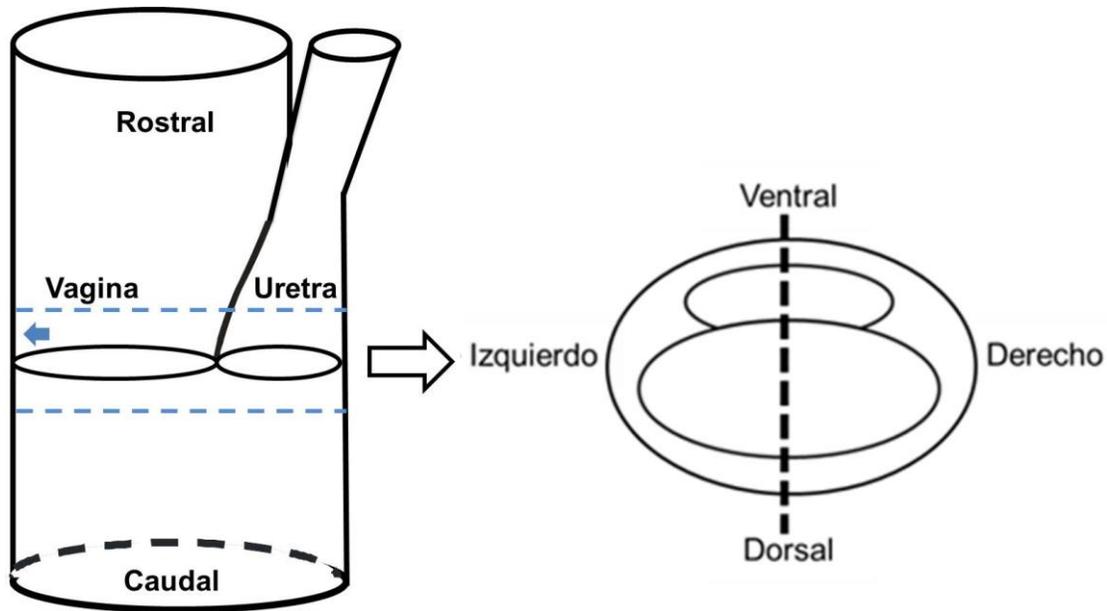


Figura 13. Esquema que representa la incisión en la vagina para la obtención de los fragmentos, modificado de Castelán et al. 2013).

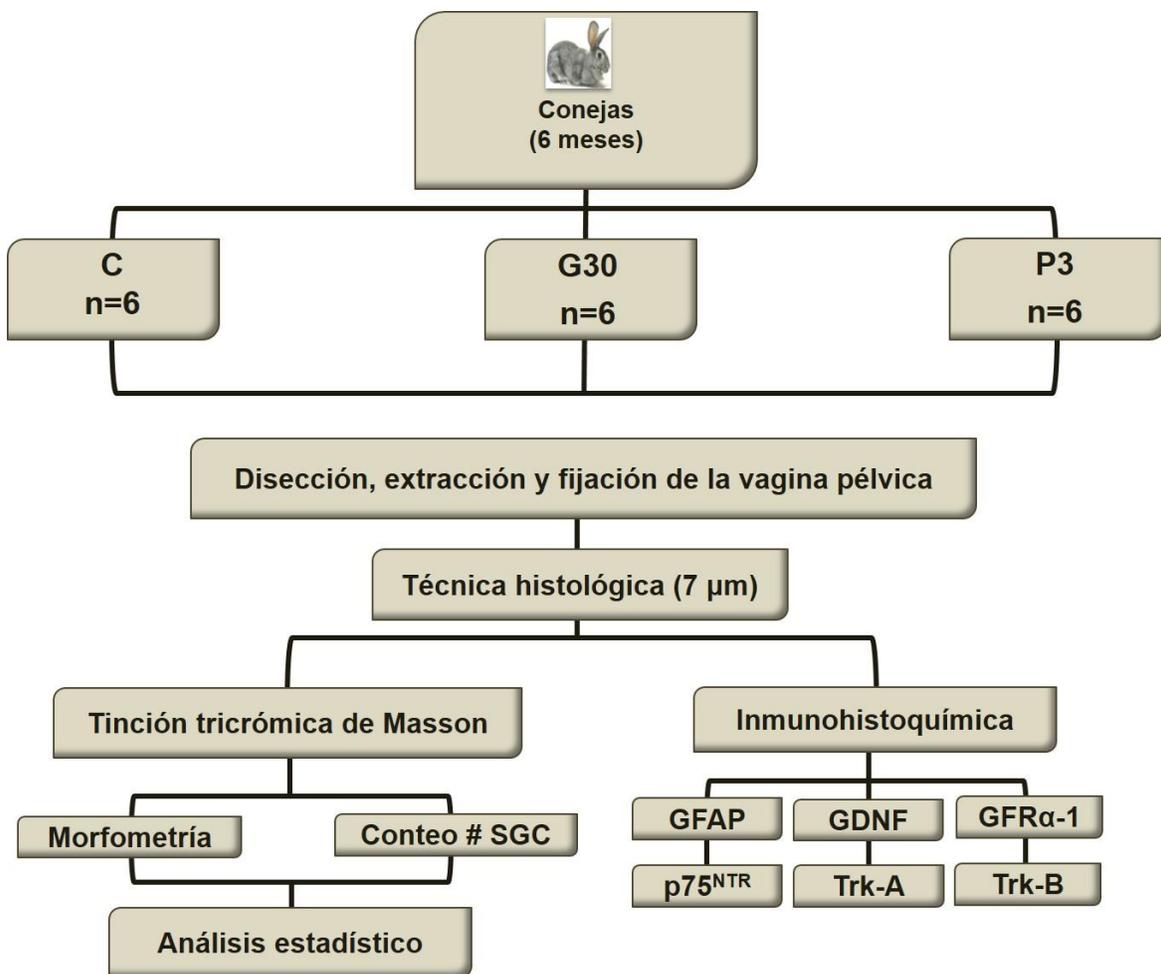
14.4. Análisis histológico. La vagina pélvica se sumergió en fijador de Bouin-Duboscq durante 24h. Posteriormente, el tejido se deshidrató con etanol en concentración ascendente (70, 80, 96 y 100%), se aclaró en xileno y se incluyó en Paraplast-Xtra (McCormick Scientific) para obtener cortes transversales ($7\mu\text{m}$) en un micrótopo; estos fueron recolectados formando series de tres en portaobjetos preparados con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich). Para el análisis histológico fueron seleccionados diez cortes (seleccionando uno de cada 10 en la serie) en dirección craneal y otros diez en dirección caudal, considerando la desembocadura uretral como punto de referencia (Castelán et al. 2013; Hernández-Aragón et al. 2017). Estos cortes fueron teñidos con la tinción tricrómica de Masson, secados y deshidratados antes de que fueran cubiertos con medio de montaje y un cubreobjetos. Las preparaciones histológicas se observaron con el microscopio a 100 aumentos totales. Se tomarán fotografías con una cámara digital (Nikon) y estas se utilizarán para medir la densidad ganglionar, el número y área del soma de las neuronas pélvicas por campo de observación (x100) (Castelán et al. 2013;

Hernández-Aragón *et al.* 2017). El número de células gliales satélite por neurona se estimó en los mismos cortes teñidos con Masson por coneja (10 craneales y 10 caudales con respecto a la desembocadura de la uretra), se contaron los núcleos periféricos de los somas de las neuronas con núcleo (Hernández-Aragón *et al.* 2017).

14.5. Marcaje inmunohistoquímico. La expresión de GDNF, GFR α -1, GFAP, p75^{NTR}, Trk-A y Trk-B en las neuronas ganglionares se determinó mediante inmunohistoquímica. Para tal fin, los cortes seleccionados fueron desparafinados e incubados en 100 mM citrato de sodio (pH 6) para exponer de nuevo los antígenos ocultos por la fijación del tejido. Después se incubaron con 3% H₂O₂ en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS; 0.16mM NaH₂PO₄, 0.34mM Na₂HPO₄, 154mM NaCl), removiendo el exceso mediante lavados con PBS adicionado con 0.3% triton x-100 (PBS-T). Las preparaciones fueron incubadas en solución de bloqueo (5% suero normal de cabra/PBS), para bloquear uniones inespecíficas y después se incubaron durante 18h a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes (anti-GDNF (1:100) sc-13147 Santa Cruz Biotechnology, Inc; anti-GFR α -1 (1:100) sc-271546 Santa Cruz Biotechnology, Inc; anti-p75^{NTR} (1:100) MAB5386 Millipore; anti-Trk-B (1:100) sc-8316 Santa Cruz Biotechnology, Inc; anti-GFAP (1:100) sc-6170 Santa Cruz Biotechnology, Inc) diluidos en PBS-T. Después se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a biotina (goat anti-mouse IgG-B (1:250) sc-2039 SantaCruz Biotechnology, Inc; donkey anti-goat IgG-B (1:250) sc-2042 Santa Cruz Biotechnology, Inc; goat anti-rabbit (1:250) sc-2040 Santa Cruz Biotechnology, Inc) diluido en PBS-T durante 2h a temperatura ambiente. Los cortes se cubrieron con medio de montaje (HYCel Reactivos Químicos) y un cubreobjetos. Las preparaciones histológicas se observaron con el microscopio (Nikon) acoplado a una cámara digital (Nikon DS-Ri2) para cuantificar el número de células inmunorreactivas anti-GFAP, anti-GDNF, anti-GFR α 1, anti-p75^{NTR}; anti-Trk-A y Trk-B se hicieron fotografías a 100 aumentos totales.

14.6. Análisis estadístico. La comparación de las variables cuantificadas en los distintos objetivos particulares se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de una prueba *post-hoc* de *Newman-Keuls* para identificar las diferencias significativas entre grupos. Todas las pruebas estadísticas mencionada se realizaron con el programa de análisis estadístico GraphPad Prism (v.4c) para PC.

Figura 14: Diseño experimental



15. Resultados

15.1. Morfometría

En la pared dorsolateral de la vagina pélvica se encuentran adosados los ganglios y nervios (Figura 15). Se evaluó el área total y número de las estructuras observadas por campo, así como, el número y área de neuronas contenidas en dichos ganglios por campo.

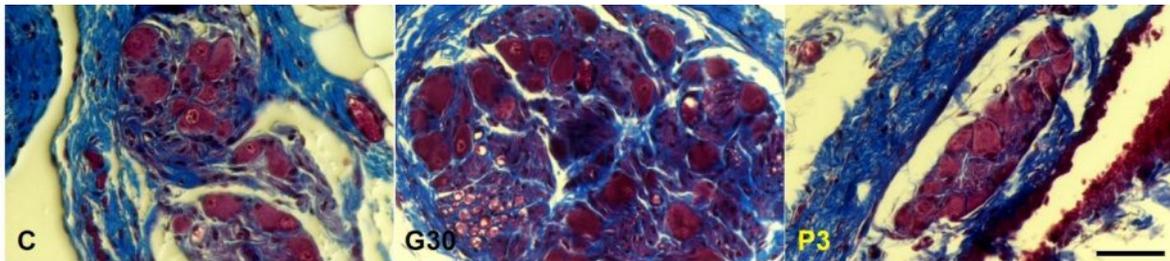


Figura 15. Fotomicrografías de ganglios paravaginales tenidas con tricrómica de Masson en conejas control (C), gestante a término (G30) y primípara tres días posparto (P3). Barra, 50 μm .

15.1.1. Área ganglionar

Al analizar los campos donde se apreciaban los ganglios, en el área ganglionar total por campo no encontramos diferencias estadísticamente significativas, aunque se observó una ligera disminución durante el periodo posparto, con respecto a los grupos control y gestante a término. Los datos se analizaron mediante una ANOVA de una vía seguido de una prueba *post-hoc* de *Newman-Keuls*, $P= 0.3354$ (Figura 16).

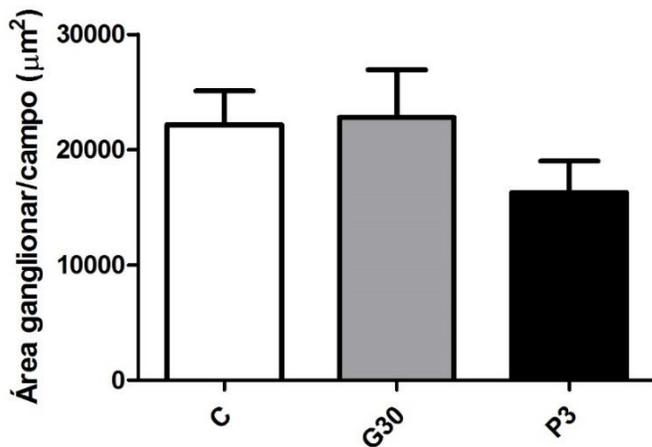


Figura 16. Área ganglionar total por campo en la vagina pélvica de conejas: control, gestante a término y primípara 3 días postparto. Los datos representan la media \pm ee, $P=0.3354$.

15.1.2. Las neuronas en los ganglios paravaginales

Al teñir las preparaciones con la tinción tricrómica de Masson es posible observar el soma de las neuronas de color rosa, el núcleo traslucido y el nucléolo de color púrpura (Figura 15). La evaluación morfológica de las neuronas contenidas en los ganglios paravaginales mostró un citoplasma basófilo (cuerpos de Nilss) y en algunas neuronas se puede apreciar un núcleo con cromatina laxa y conteniendo uno o dos nucléolos centrales.

Se evaluó el área del soma de todas las neuronas, en las cuales se distinguiera el núcleo. El área del soma en conejas gestantes a término disminuyó con respecto al grupo control de manera estadísticamente significativa (Figura 17). Durante el período posparto con respecto del grupo control no encontramos diferencias, estadísticamente significativas. Los datos fueron analizados mediante una prueba de ANOVA, seguido una prueba *post hoc* de *Newman-Keuls* $P=0.0215$ (Figura 17).

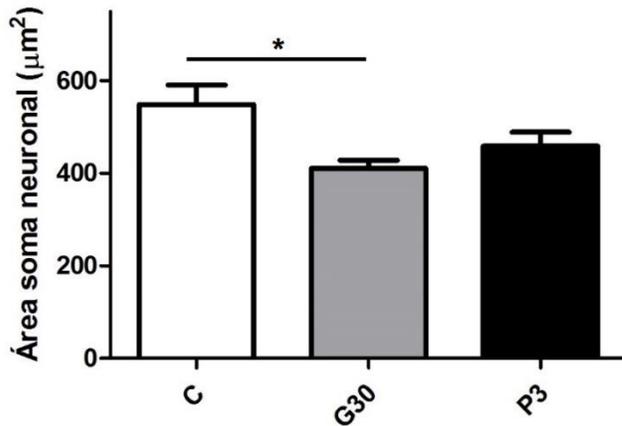


Figura 17. Área del soma de las neuronas de los ganglios paravaginales de conejas: control, gestante a término y primípara 3 días postparto. Los datos representan la media \pm error estándar (ee). *, $P < 0.05$ con respecto del grupo control.

Además del área, se cuantificó el número de neuronas contenidas en los ganglios por campo. Se observó que las conejas control tienen 12.94 ± 1.6 neuronas/campo, durante la gestación a término se contaron 10.58 ± 1.4 neuronas/campo. En el periodo postparto se registraron 9.442 ± 1.4 neuronas/campo. Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA, $P = 0.1626$, la cual mostró que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales (Figura 18).

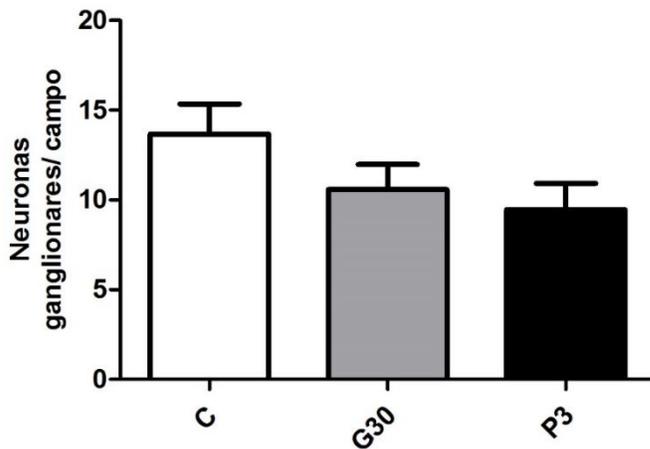


Figura 18. Número de neuronas ganglionares totales por campo en la vagina pélvica de conejas: control, gestante a término y primípara 3 días postparto. Los datos representan la media \pm ee, $P = 0.1626$.

15.1.3. Número de células gliales satélite

Al cuantificar el número de células gliales satélite por neurona, así como el número total de células gliales satélite no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes condiciones experimentales, ni antes ni después de la desembocadura de la uretra. Los datos se analizaron mediante una ANOVA de una vía (Figura 19).

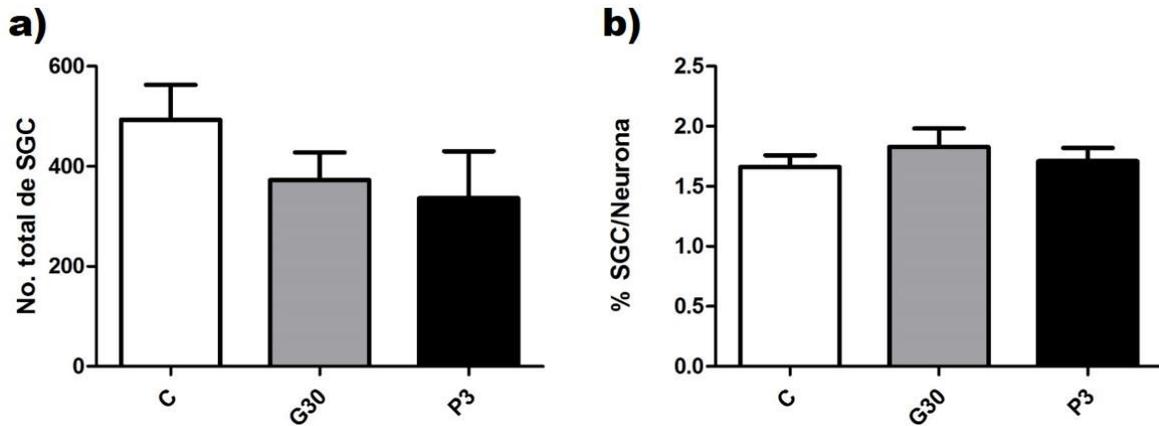


Figura 19. Cuantificación de células gliales satélite, (a) número total de células gliales satélite por grupo, $P= 0.5154$; (b) porcentaje de células gliales satélite por neurona, $P= 0.5871$. Los datos representan la media \pm ee.

15.2. Marcaje inmunohistoquímico anti-GFAP

El marcaje se observa en la periferia de las neuronas de los tres grupos experimentales. La intensidad del marcaje anti-GFAP que envuelve las neuronas paravaginales fue mayor en las conejas gestantes a término y las primíparas tres días posparto comparadas con el grupo control (Figura 20).

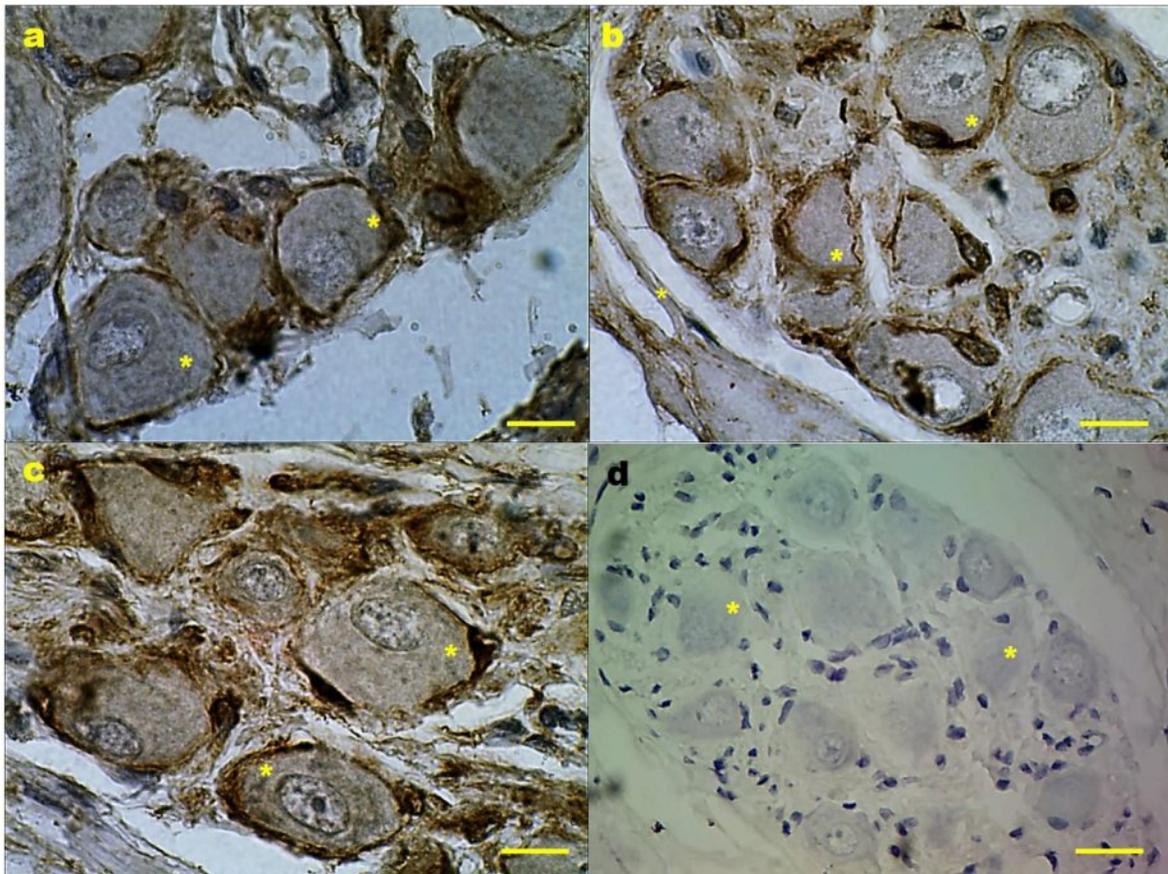


Figura 20. Marcaje inmunohistoquímico anti-GFAP en ganglios paravaginales en conejas: control (a), gestante a término (b), primípara tres días posparto (c), sin anticuerpo (d), Barra 50 μ m. *Muestra soma de las neuronas inmunorreactivas.

Al cuantificar el número de neuronas envueltas por la inmunorreactividad anti-GFAP, no encontramos diferencias estadísticas significativas entre nuestros grupos experimentales y el control (Figura 21).

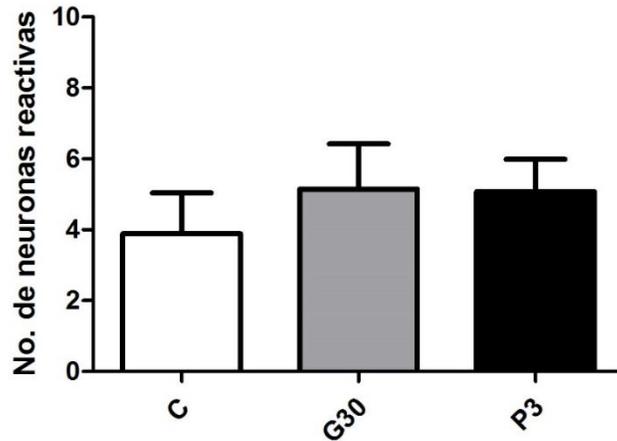


Figura 21. Número de neuronas inmunorreactivas anti-GFAP en ganglios paravaginales, no existen diferencias estadísticas significativas entre los grupos. Los datos representan la media \pm ee. Se realizó un ANOVA de una vía, $P= 0.7275$.

15.3. Marcaje inmunohistoquímico anti-GDNF

Las neuronas de los ganglios paravaginales expresan GDNF.

El marcaje se observa en el citoplasma de las neuronas, pero no en el núcleo. La expresión de dicho factor es mayor en las conejas primíparas tres días posparto comparadas con el grupo control y las conejas gestantes a término (Figura 22). En las primíparas el marcaje es más intenso en la periferia de las neuronas.

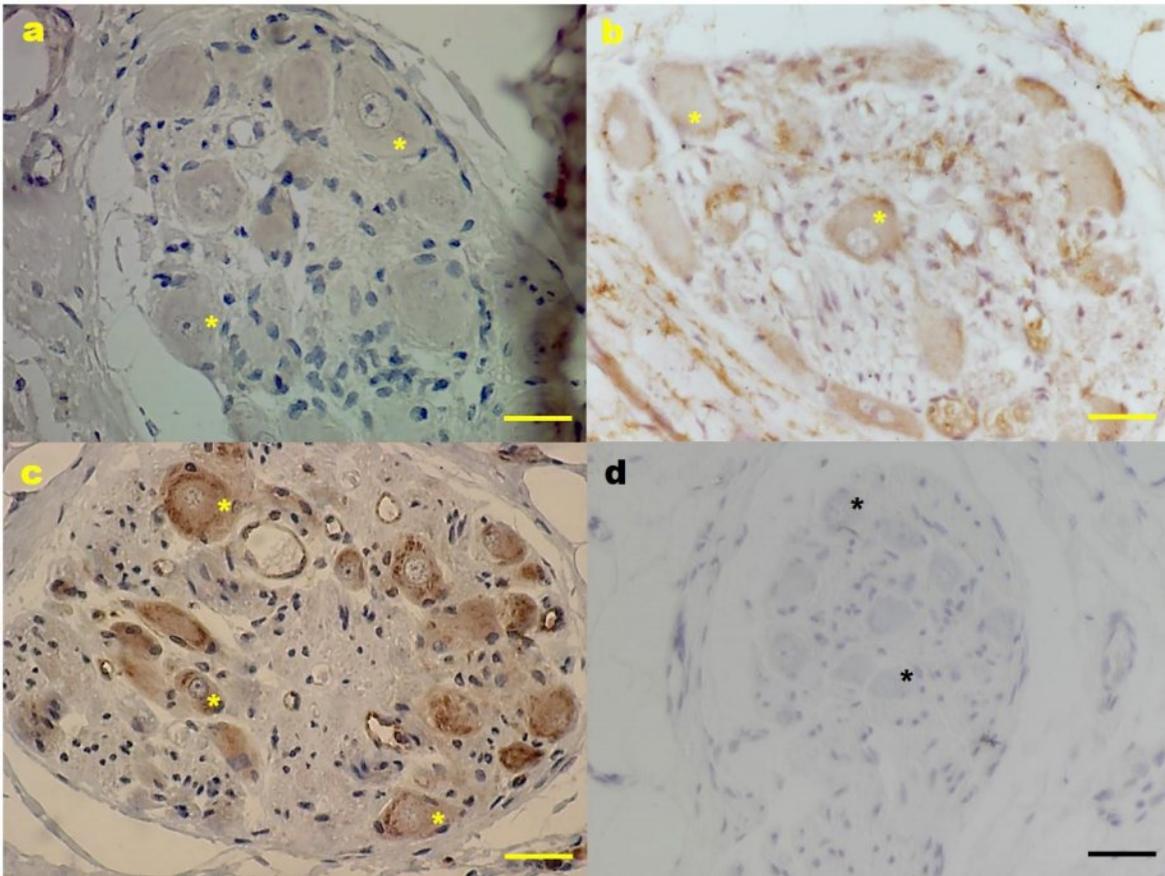


Figura 22. Marcaje inmunohistoquímico anti-GDNF en ganglios paravaginales de la coneja: control (a), gestante a término (b), primípara tres días posparto (c), sin anticuerpo (d), Barra 50 μ m. *Muestra soma de las neuronas inmunorreactivas.

15.4. Marcaje inmunohistoquímico anti-GFR α -1

Las neuronas de los ganglios paravaginales expresan GFR α -1.

El marcaje se observa en el citoplasma de las neuronas, pero no en el núcleo, siendo más intenso en la periferia de la neurona. La expresión de dicho receptor fue mayor en las conejas gestantes a término comparadas con el grupo control y el de las primíparas tres días posparto (Figura 23).

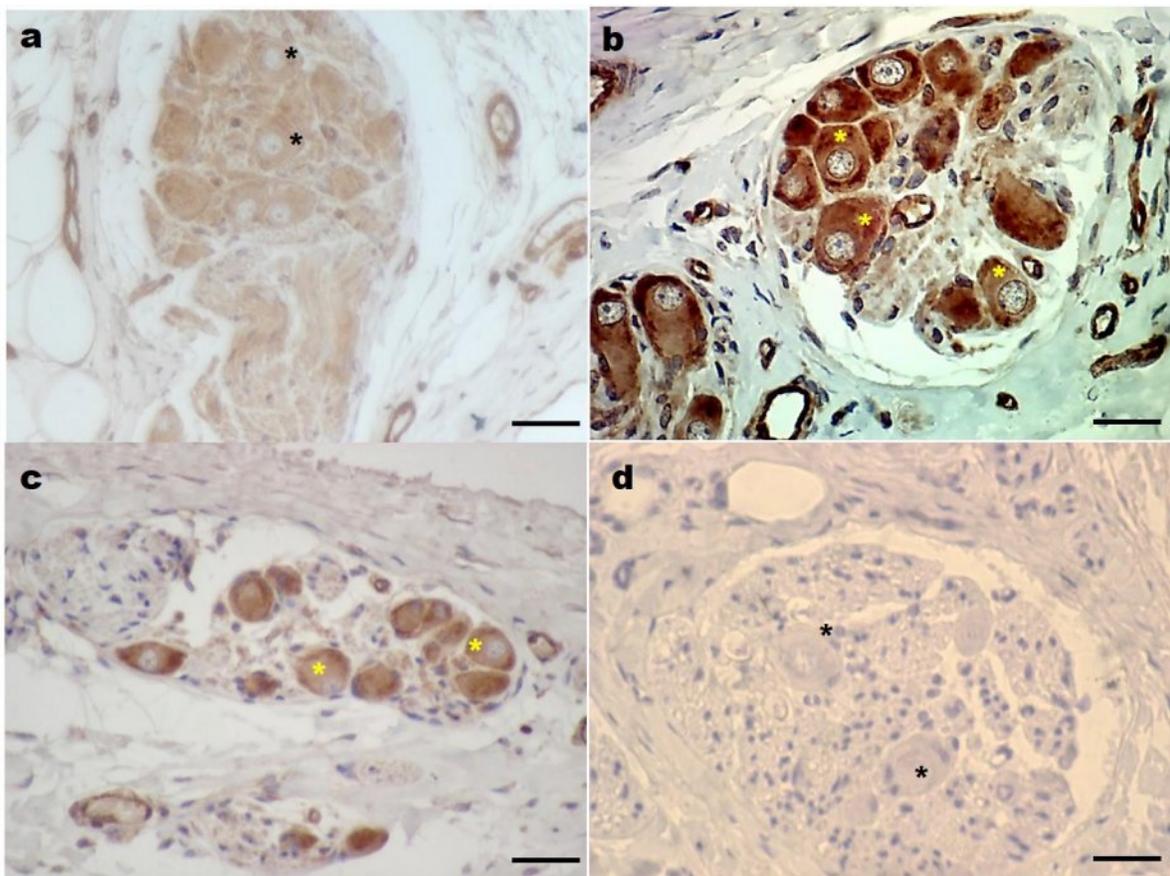


Figura 23. Marcaje inmunohistoquímico anti-GFR α -1 en ganglios paravaginales de conejas control (a), gestante a término (b), primípara tres días posparto (c), sin anticuerpo (d), Barra 50 μ m. *Muestra el soma de las neuronas inmunorreactivas.

15.5. Marcaje inmunohistoquímico anti-p75^{NTR}

Las neuronas de los ganglios paravaginales expresan p75^{NTR}.

El marcaje se observa en el citoplasma de las neuronas y la periferia de la neurona. La expresión este receptor incrementa en las conejas gestantes a término y primíparas tres días posparto comparadas con el grupo control (Figura 24).

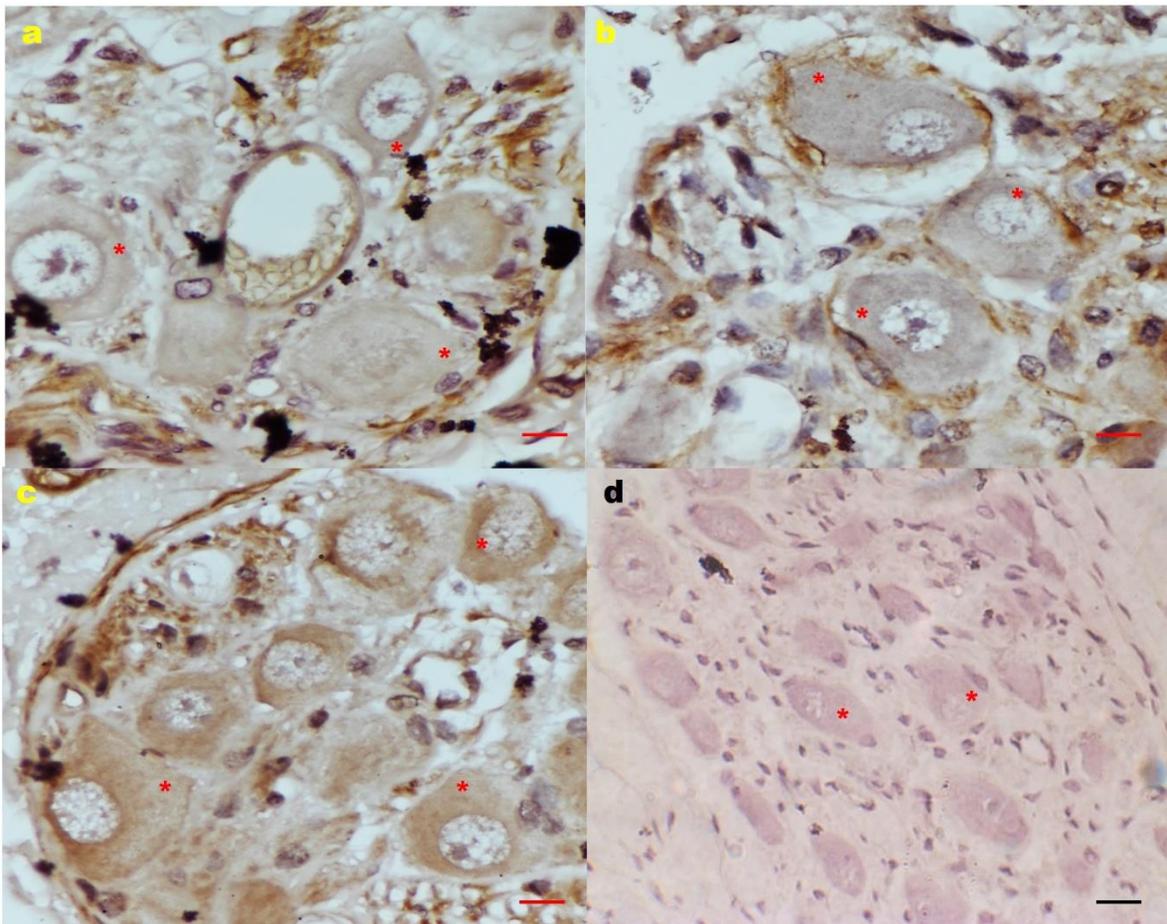


Figura 24. Marcaje inmunohistoquímico anti-p75^{NTR} en ganglios paravaginales de conejas: control (a), gestante a término (b), primípara tres días posparto (c), sin anticuerpo (d), * muestra el soma. Barra 50 μ m.

En el grupo control la inmunorreactividad es diferente debido a que unas neuronas expresan marcaje y unas no, en las G30 el marcaje aumenta y se localiza principalmente en la periferia de las neuronas y en el grupo de las primíparas el marcaje es mayor comparado con las otras dos condiciones (Figura 25).

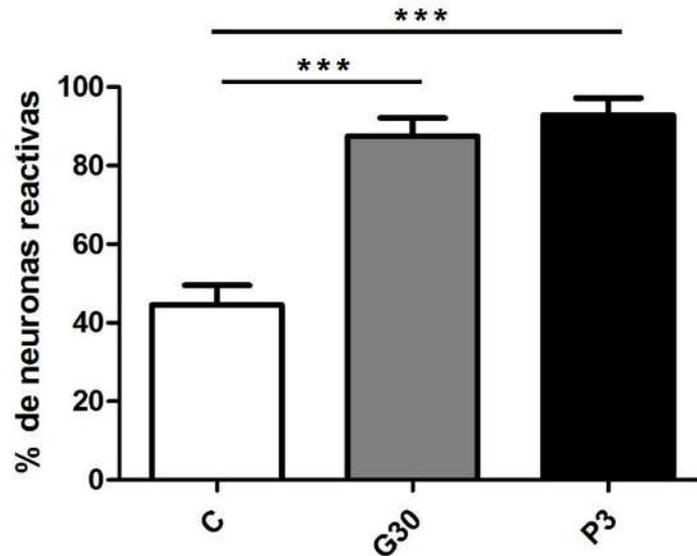


Figura 25. Porcentaje de neuronas inmunorreactivas anti-p75^{NTR} en ganglios paravaginales. Se realizó una ANOVA de una vía, seguido de una prueba *post-hoc* de *Newman-Keuls* para determinar las diferencias indicadas con los *** ($P= 0.0001$).

15.6. Marcaje inmunohistoquímico anti-Trk-A

Las neuronas de los ganglios paravaginales expresan Trk-A

El marcaje se observa en el citoplasma de las neuronas y la periferia de la neurona. La expresión de dicho receptor incrementa en las conejas gestantes a término y primíparas tres días posparto comparadas con el grupo control (Figura 26).

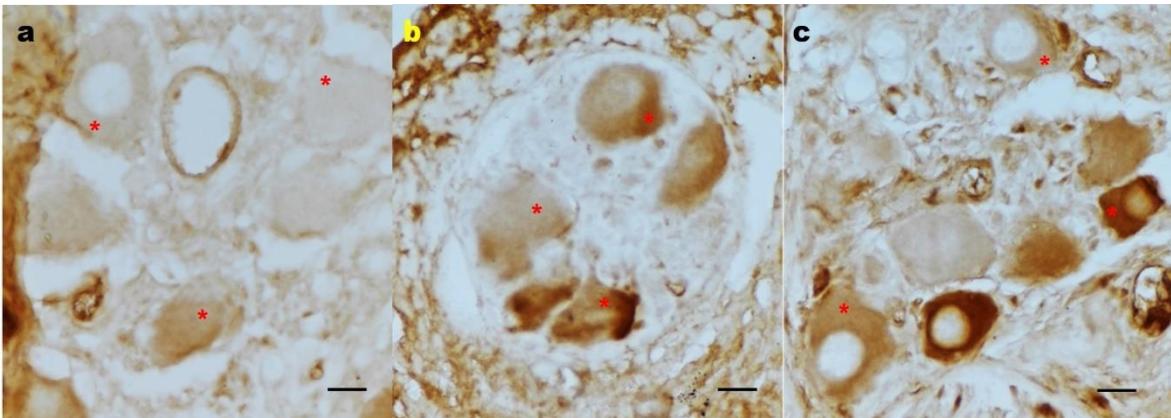


Figura 26. Marcaje inmunohistoquímico anti-Trk-A, en ganglios paravaginales de conejas: control (a), gestante a término (b), primípara tres días posparto (c), sin anticuerpo (d), * muestra el soma. Barra 50 μ m

En el grupo control la inmunorreactividad es diferente debido a que unas neuronas expresan marcaje y unas no, en las G30 el marcaje aumenta y se localiza principalmente en la periferia de las neuronas y en el grupo de las primíparas el marcaje es mayor y se localiza en el soma, comparado con las otras condiciones. Y al cuantificar el número de neuronas inmunorreactivas en cada condición no encontramos diferencias estadísticas significativas, $P=0.5671$ (Figura 27).

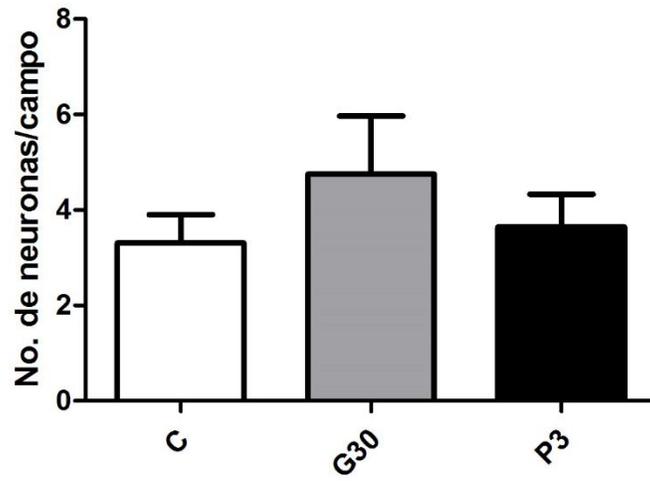


Figura 27. Número de neuronas inmunorreactivas anti Trk-A en ganglios paravaginales. Los datos muestran la media \pm ee. Se realizó una Kruskal-Wallis $P=0.4886$.

15.7. Marcaje inmunohistoquímico anti-Trk-B

Las neuronas de los ganglios paravaginales expresan Trk-B.

El marcaje se observa en el citoplasma y la periferia de la neurona. La expresión de dicho receptor incrementa en las conejas gestantes a término y primíparas tres días posparto comparadas con el grupo control (Figura 28). En el grupo control la inmunorreactividad en algunas neuronas se observa en la periferia del soma y en otra en el citoplasma, en las G30 el marcaje aumenta y se localiza principalmente en la periferia de las neuronas y en el grupo de las primíparas el marcaje es mayor y se localiza tanto en el citoplasma como en la periferia, comparado con las otras dos condiciones.

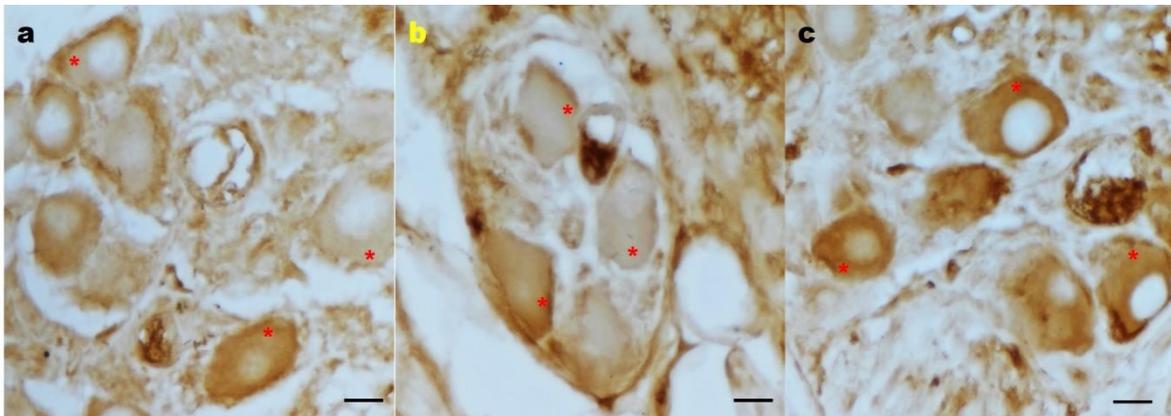


Figura 28. Marcaje inmunohistoquímico anti-Trk-B, en ganglios paravaginales de conejas: control (a), gestante a término (b), primípara tres días posparto (c), sin anticuerpo (d), * muestra el soma. Barra 50 µm.

Se contaron las neuronas inmunorreactivas anti-Trk-B cada una de nuestras condiciones experimentales y no encontramos diferencias estadísticas significativas, $P=0.9463$ (Figura 29).

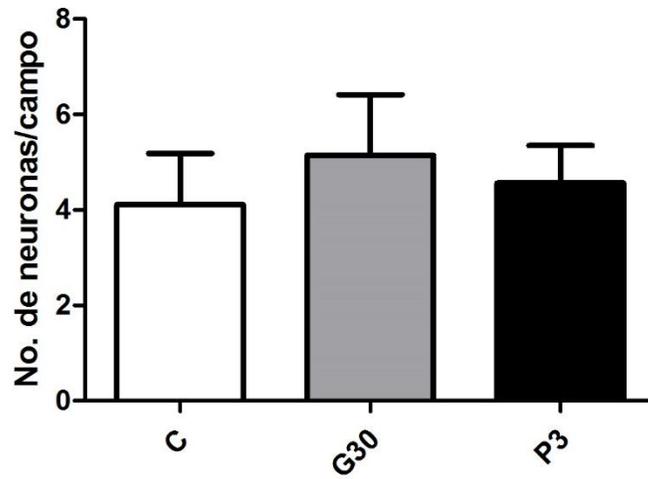


Figura 29. Número de neuronas inmunorreactivas anti Trk-B en ganglios paravaginales. Los datos muestran la media \pm ee. Se realizó una *Kruskal-Wallis* $P=0.9463$.

16. Discusión

16.1. La experiencia reproductiva modifica el área del soma de las neuronas paravaginales, pero no las células gliales satélite

Cuando analizamos la morfometría en los ganglios paravaginales, como el área de los ganglios y el número de neuronas no encontramos diferencias estadísticas significativas. Por otro lado, en el área del soma neuronal en las G30 es menor con respecto a los otros grupos. Comparando nuestro estudio vs un modelo de multiparidad (Castelán *et al.* 2013; Xelhuantzi Arreguin 2013), donde no se modifica el área del soma de las neuronas, -aunque existe una tendencia a aumentar en las múltiparas- este podría ser asociado con modificaciones en el ambiente celular como reportan Warburton y Santer, quienes sugieren que los componentes de la matriz extracelular no son constantes a lo largo de la vida adulta y que la matriz extracelular puede influir en la supervivencia neuronal (Warburton y Santer 1997). Claro cuando hablamos de un modelo de multiparidad podemos argumentar que las modificaciones encontradas son multifactoriales, por lo cual en un trabajo de gestación y primiparidad (Castelán *et al.* 2013; Hernández-Aragón 2012) donde analizan las mismas variables y de igual manera se modifica el mismo parámetro que en nuestro estudio podemos argumentar lo mismo de las modificaciones en el ambiente celular.

Por otra parte, otra posible explicación de la modificación en el soma de las neuronas puede ser debido a una modificación en las células de la glía satélite. La glía tiene un lugar central en los trastornos neurológicos, la inflamación y el dolor (Giaume *et al.* 2007; Milligan y Watkins 2009). Pero cuando cuantificamos el número de SGC total y las asociadas a cada neurona no encontramos diferencias. Lo cual nos puede llevar a sugerir que estas modificaciones más allá de un factor mecánico pueden ser debido a un factor hormonal. Se ha sugerido que la fluctuación de hormonas (los estrógenos) podría modular la organización histológica del

conducto vaginal previo y posterior al evento del parto (Bridges y Byrnes 2006; Matt *et al.* 1986). En un modelo de ovariectomía crónica sugieren que existe una correlación de los estrógenos con respecto a las SGC las cuales modifican la plasticidad neuronal, lo cual se traduce en una modificación en el tamaño del soma de las neuronas paravaginales (Hernández-Aragón *et al.* 2017).

16.2. Expresión de factores neurotróficos

Diversos estudios sobre la inervación pélvica en diferentes especies establecen que, además de los neurotransmisores autonómicos clásicos, ACh y NA, existen otros neurotransmisores y neuromoduladores liberándose en el tejido vaginal y paravaginal. Entre éstos puede mencionarse el VIP (péptido intestinal vasoactivo), el NPY (neuropéptido Y), el NO (óxido nítrico) y la sustancia P (Al-Hijji *et al.* 2000; Giraldi *et al.* 2002; Jöbling 2011; Mitchell y Satauber 1990) entre otros como por numerosos factores neurotróficos como los de la familia de neurotrofinas y la familia de los GFL's (García-Suarez *et al.* 1996; Henderson 1996; Taraviras *et al.* 1999; Tuttle *et al.* 1994).

La comunicación mediante factores neurotróficos denominada no neural entre las neuronas y células gliales, es esencial para la conducción axonal, la transmisión sináptica además del procesamiento de la información, mantenimiento y buen funcionamiento del sistema nervioso durante el desarrollo y durante la vida adulta (Fields y Stevens-Graham 2002). La señalización de factores neurotróficos es relevante para la recuperación de lesiones que afecten la inervación simpática y parasimpática.

Al no encontrar diferencias en el número de SGC tal vez nos esté indicando que las modificaciones en el tamaño del soma están relacionadas con la actividad de las SGC más que con la cantidad de las mismas. Al evaluar la expresión de algunos indicadores de activación glial como GFAP no encontramos diferencias significativas en cuanto al número de neuronas inmunorreactivas en ninguno de nuestros grupos, aunque en la localización de GFAP la expresión aumenta en las

G30 y P3, contrario a lo que ocurre en el grupo C, donde el marcaje solo se aprecia en algunas células.

Otra opción del porque no tuvimos diferencias en la expresión de la mayoría de las moléculas utilizadas en este estudio, probablemente es que la expresión este modulada por el estado hormonal. Los estrógenos son de particular importancia para la diferenciación y función de distintos sistemas neuronales (Zoubina y Smith 2002; Papka y Mowa 2004). Se ha reportado que la concentración de estrógenos influye en el tamaño del soma neuronal en los ganglios pélvicos en ratas y conejas (Castelán *et al.* 2013; Yamaguchi 1998). Por otro lado, se ha descrito que las acciones de estrógenos y andrógenos implicadas en la plasticidad de neuronas pélvicas están relacionadas con la señalización de factores neurotróficos como el GDNF (Keast 2006; Stewart *et al.* 2008). La interacción estrógenos-factor de crecimiento es de particular importancia para el desarrollo de células nerviosas (Ivanova *et al.* 2002).

En cultivos neuronales encontraron que los efectos del estradiol en el desarrollo de células dopaminérgicas requieren de la coordinación oportuna y espacial de la expresión del GDNF (Ivanova *et al.* 2002). Estudios realizados en la glándula pituitaria en el cual evalúan diferentes etapas reproductivas muestran que las variaciones tanto en la expresión y localización subcelular de RET durante la gestación y la lactancia están temporalmente correlacionadas con los cambios en función pituitaria. Además, demostraron que la señalización del GDNF por medio del receptor RET podría tener dos roles funcionales diferentes, dependiendo del estado fisiológico. Concluyen diciendo que la relación GDNF–RET es un factor pleiotrópico capaz de influir en la fisiología pituitaria durante un período de alta plasticidad (Guillou *et al.* 2011). En un modelo de primiparidad temprana donde cuantifican la cantidad de GDNF y GFR α -1 no encontraron diferencias en los WB, pero si en la inmunolocalización de ambas proteínas, esto concuerda con nuestros resultados: aumento en la expresión tanto de GDNF y GFR α -1 en las conejas G30 y P3, con respecto al control en los ganglios paravaginales (García-Villamar *et al.*

20017). De este modo podemos sugerir que la cantidad de estas proteínas a nivel local (ganglio) no se ve afectada en las neuronas debido a que dicha cantidad puede estar mantenida con ayuda de la producción de factores propia de las células gliales satélite, mediante comunicación yuxtacrina además de que puede estar mantenida con los factores provenientes del torrente sanguíneo. Esto es porque pueden provenir de otros tejidos ya que todas las células de los tejidos que reciben inervación y todas las células del sistema nervioso producen factores neurotróficos (Bustamante 2007). Se ha descrito que en el sistema nervioso el GDNF se localiza en el soma neuronal, dendritas y axones de las neuronas (Kawamoto *et al.* 2000). Esto nos podría decir que la comunicación entre las neuronas y las células gliales satélite es relevante en el mecanismo de plasticidad neuronal.

Se ha descrito que las familias del NGF y la de GFLs no funcionan simplemente como sistemas neurotróficos paralelas, sino que es probable que se superponen y se alternan en su influencia del desarrollo de neuronas periféricas (Snider 1997). Existen numerosas similitudes y solapamientos potenciales con la familia del factor de crecimiento nervioso (NGF) ya que al igual que este regula el desarrollo del sistema nervioso periférico (Baloh *et al.* 2000). Durante la vida postnatal, GDNF tiene un efecto trófico más potente que NGF en neuronas sensoriales del DRG (Wright y Snider, 1996, Molliver *et al.* 1997).

En animales adultos, las células ganglionares del DRG requieren de las neurotrofinas para su mantenimiento (Verge *et al.* 1996). En neuronas sensoriales los receptores Trk se expresan de una manera que no se solapan con el receptor de baja afinidad de las neurotrofinas p75^{NTR} (Wright y Snider 1995). Esto podría explicar por qué cuando analizamos la expresión de los Trk A y B. no existen diferencias significativas, pero si existe un aumento en la expresión de estas moléculas en los grupos experimentales.

Mientras que la contribución del Trk para la supervivencia de neuronas y crecimiento de los axones se entiende bien, no se puede decir lo mismo para p75^{NTR}. Existen controversias entre que es lo que hace este receptor Se informó primero que p75^{NTR} mejora la señalización de Trk-A en presencia de NGF (Barker y

Shooter, 1994). Que la fosforilación de MAPK puede estar mediada directamente a través de la unión a NGF del p75^{NTR} (Susen *et al.* 1999). Por el contrario, otros estudios han presentado pruebas de que la señalización de p75^{NTR} tiene efectos perjudiciales sobre la supervivencia neuronal, debido a que puede desencadenar algunas vías de apoptosis neuronal (Bamji *et al.* 1998; Majdan *et al.* 2001; Salehiet *et al.* 2000).

En experimentos *in vitro* se ha demostrado que las neuronas simpáticas con expresión hipomórfica de p75^{NTR} (-/-) tienen una mayor capacidad de crecimiento en las neuritas (Kohn *et al.* 1999). También han proporcionado evidencia de que el crecimiento axonal simpático se puede limitar mediante p75^{NTR}, con respecto a los niveles de NGF, cuando los niveles de NGF se elevan por encima de los niveles biológicos. Cuando evaluamos la expresión de p75^{NTR} en nuestras neuronas, cuantificamos un mayor número de neuronas reactivas a este receptor en los grupos G30 y P3 con respecto al C. ocurriendo lo mismo con la expresión de los Trk. podría apoyar la hipótesis de que tienen efectos sinérgicos en conjunto.

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

16.3. Implicaciones de nuestro modelo de estudio

En mujeres, las alteraciones estructurales del piso pélvico y del tracto urogenital como prolapsos viscerales, se han relacionado con factores de riesgo como la gestación, trauma de parto, edad y deficiencia hormonal (Tapp *et al.* 1988; Skoner *et al.* 1994). Durante el parto el piso pélvico es expuesto directamente a la compresión del feto y la fuerza de expulsión de la madre (Hale *et al.* 1999). Lo cual puede relacionarse con alteraciones funcionales y estructurales de los músculos, nervios y fibras de tejido conectivo de la uretra y músculos del piso pélvico (Allen *et*

al 1990; Bakircioglu *et al.* 2000; Rortveit *et al.* 2003). Se ha determinado que parto es una fuente de variabilidad del plexo pélvico que puede conducir a algunos síntomas urológicos y ginecológicos (Inal *et al.* 2010; Quinn 2016; Spackman *et al.* 2007).

Se ha mostrado que la distensión vaginal o el daño del nervio pudiendo por compresión resultan en un decremento del punto de presión de goteo y disminuye el número de fascículos nerviosos, lo que evidencia un proceso de degeneración que contribuye a la disfunción de los órganos del piso pélvico (Damaser *et al.* 2003). 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 *et al.* 2001). El decremento del flujo sanguíneo y el incremento de hipoxia tisular pueden significar que ocurre isquemia tisular durante la distensión vaginal significando un daño en los órganos del piso pélvico (Damaser *et al.* 2005).

El impacto de los cambios en los niveles de hormonas esteroides durante el embarazo y el posparto en el tracto urogenital inferior (LUT) se ha subestimado. Las acciones de estrógenos son interesantes ya que apoyan las terapias utilizadas para aliviar algunos síntomas urológicos en mujeres posmenopáusicas (Keast 2006; Weber *et al.* 2015). En este contexto debo mencionar que en este estudio no medimos la concentración sérica de estradiol.

Los ganglios pélvicos proporcionan la mayor parte de la inervación autonómica a los órganos urogenitales (Jobling 2011). Se ha evidenciado en mujeres que el estatus hormonal contribuye a la disfunción post-menopausica afectando la inervación (Komisaruk *et al.* 2011). El marcador PGP-9.5 se expresa constitutivamente en todos los tejidos neuronales, su densidad incrementa significativamente en tejido vaginal de ratas ovariectomizadas comparadas con ratas en la fase estro de su ciclo (Ting *et al.* 2004). Se ha evidenciado que el estradiol es la hormona principal que medía el cambio en la inervación vaginal. En ratas ovariectomizadas se observa un incremento de la inervación vaginal, la cual disminuye con la administración de estrógenos a niveles cuantitativamente idénticos

a los observados durante la fase estro (Ting *et al.* 2004). En este último modelo, se ha evidenciado que el incremento de inervación simpática provoca la contracción de musculo liso, generando vasoconstricción, incremento en el tomo vaginal, disminución del flujo sanguíneo y lubricación vaginal (Giraldi *et al.* 2002). La disminución de estrógenos en suero está asociada con la reducción de la actividad de las sintasas del óxido nítrico en la vagina (Al-Hijji *et al.* 2000). En este contexto se han observado diferencias importantes en la neuroplasticidad uterina y vaginal, implicando que diferentes mecanismos operan en estos dos tejidos (Ting *et al.* 2004). En la coneja, se ha descrito que la experiencia reproductiva remodela la inervación de la vagina pélvica, perteneciente al plexo pélvico (Castelán *et al.* 2013; Hernández Aragón *et al.* 2017; García-Villamar *et al.* 2017).

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

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

interacción del estatus hormonal con respecto a algunas moléculas, como el aumento en la expresión de GDNF- GFR α -1; los cuales se saben que tienen efectos sinérgicos en la plasticidad neuronal, y algunos receptores de las neurotrofinas las cuales también promueven la supervivencia y muerte celular dependiendo de la concentración e interacción de sus receptores. Ahora se podría plantear el evaluar qué pasa con NGF con respecto a sus receptores y por otro lado se podrían evaluar algunos otros receptores del GDNF como RET.

17. Conclusiones

- ❖ El tamaño del soma neuronal está reducido al final de la gestación; se recupera al día tres días posparto.
- ❖ El número de células gliales satélite fue similar en las conejas control, gestantes y primíparas. La intensidad del marcaje anti-GFAP en las conejas gestantes y primíparas sugiere la activación de las células gliales satélite.
- ❖ La experiencia reproductiva incrementa la presencia de GDNF en las células gliales satélite pero no la de las neuronas paravaginales. Por el contrario, incrementa la presencia de GFR α -1 en las neuronas paravaginales.
- ❖ La experiencia reproductiva incrementa la proporción de neuronas inmunorreactivas a p75^{NTR}.
- ❖ La experiencia reproductiva incrementa la presencia de Trk-A en las neuronas paravaginales y la de Trk-B en las células gliales satélite.

La plasticidad morfométrica de las neuronas paravaginales está asociada con un proceso activo de neuroplasticidad que involucra la interacción de las células gliales satélite, posiblemente a través de GDNF/GFR α -1 y la participación de los receptores p75^{NTR}, Trk-A y Trk-B.

18. Perspectivas

- ❖ Caracterizar los procesos fisiológicos y moléculas involucradas en la posible adaptación de las células gliales satélite de los ganglios pélvicos durante la experiencia reproductiva.
- ❖ Identificar las moléculas que desencadenan la reducción del área del soma, y su relación con los niveles hormonales durante la gestación.
- ❖ Determinar la proporción y/o población de neuronas pélvicas que sobreviven en la coneja múltipara, así como sus correlatos funcionales.

19. Referencias

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

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

Allen NJ, Barres BA. (2009) Glia – more than just brain glue. *Nature,* 457, 675-677.

Al-Hijji J, Larsson B, Batra S. (2000) Nitric oxide synthase in the rabbit uterus and vagina: Hormonal regulation and functional significance. *Biol Reprod.* 62(5), 1387-92.

Alonso A, Fernández R, Ordóñez P, Moreno M, Patterson AM, González C. (2006) Regulation of estrogen receptor alpha by estradiol in pregnant and estradiol treated rats. *Steroids.* 71(13-14), 1052-61.

Alperin M, Feola A, Duerr R, Moalli P, Abramowitch S. (2010) Pregnancy- and delivery-induced biomechanical changes in rat vagina persist postpartum. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 21(9):1169-74.

Araque A, Carmignoto G, Haydon PG. (2001) Dynamic signaling between neurons and glia. *Annu Rev Physiol.* 63: 795-813.

Aranda A, Pascual A. (2001) Nuclear hormone receptors and expression. *Physiol Rev.* 81(3), 1269-304.

Azcoitia I, Fernandez-Galaz C, Sierra A, Garcia-Segura LM. (1999) Gonadal hormones affect neuronal vulnerability to excitotoxin induced degeneration, *J. Neurocytol.* 28, 699-710.

Baljet B, Drukker J. (1980) The extrinsic innervation of the pelvic organs in the female rat. *Acta Anat (Basel).* 107(3), 241-67.

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

Barres BA. (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60, 430–440.

Baulieu EE, Schumacher M, Koenig H, Jung-Testas I, Akwa Y. (1996) Progesterone as a neurosteroid: actions within the nervous system. *Cell Mol. Neurobiol.* 16, 143-154.

Berkley KJ, Hotta H, Robbins A, Sato Y. (1990) Functional properties of afferent fibers supplying reproductive and other pelvic organs in pelvic nerve of female rat. *J Neurophysiol.* 63, 256-72.

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

Blacklock AD, Smith PG. (2004) Estrogen increases calcitonin gene-related peptide-immunoreactive sensory innervation of rat mammary gland. *J Neurobiol*. 59, 192-204.

Borras C, Sastre J, Garcia-Sala D, Lloret A, Pallardo FV, Vina J. (2003) Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males, *Free Radic Biol Med*. 34, 546-552.

Brauer MM, Corbacho AM, Burnstock G. (1995) Effects of chronic and acute oestrogen treatment on the developing noradrenaline-containing nerves of the rat uterus. *Int J Dev Neurosci*. 13, 791-798.

Bridgham JT, Brown JE, Rodríguez-Marí A, Catchen JM, Thornton JW. (2008) Evolution of a new function by degenerative mutation in cephalochordate steroid receptors. *PLoS Genet*. 12; 4(9).

Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, Morgan TE, Pike CJ, Mack WJ, Stanczyk FZ, Nilsen J. (2008) Progesterone receptors: form and function in brain. *Front Neuroendocrinol*. 29(2), 313-39.

Britt KL, Findlay JK. (2002) Estrogen actions in the ovary revisited. *J Endocrinol*. 175(2), 269-76.

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

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

Camacho-Arroyo I, González-Arenas A, Espinosa-Raya J, Piña-Medina AG, Picazo O. (2011) Short- and long-term treatment with estradiol or progesterone modifies the expression of GFAP, MAP2 and Tau in prefrontal cortex and hippocampus. *Life Sci*. 89(3-4), 123-8.

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

Castelán F, Xelhuantzi N, Hernández-Aragón LG, Rodríguez-Antolín J, Cuevas E, Martínez-Gómez M. (2013) Morphometry of paravaginal ganglia from the pelvic plexus: impact of multiparity, primiparity, and pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 170(1), 286-92.

Castroviejo (1996) Plasticidad cerebral. *Rev Neurol*.

Coolen LM, Peters HJPW, Veening JG. (1996) Fos-immunoreactivity in the rat brains following consummatory elements of sexual behavior: a sex comparison. *Brain Res.* 738, 67-82.

Cruz Y, Hudson R, Pacheco P, Lucio RA, Martínez-Gómez M. (2002) Anatomical and physiological characteristics of perineal muscles in the female rabbit. *Physiol Behav.* 75(1-2), 33-40.

Cruz Y, Hernández-Plata I, Lucio RA, Zempoalteca R, Castelán F, Martínez-Gómez M. (2017) Anatomical organization and somatic axonal components of the lumbosacral nerves in female rabbits. *Neurourology and Urodynamics.* 9999: 1-8

Cunha GR, Wang Y, Place NJ, Liu W, Baskin L, Glickman SE. (2003) Urogenital system of the spotted hyena (*Crocuta crocuta Erxleben*): a functional histological study. *J Morphol.* 256(2), 205-18.

Cunningham G, MacDonald P, Grant N, Leveno F, Gilstrap L, Hankins G y Clark S. (1998) *Williams Obstetricia.* Editorial Medica Panamericana.

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

Daucher JA, Clark KA, Stolz DB, Meyn LA, Moalli PA. (2007) Adaptations of the rat vagina in pregnancy to accommodate delivery. *Obstet. Gynecol;* 109(1):128–135.

de Groat WC, Ryall RW. (1969) Reflexes to sacral parasympathetic neurones concerned with micturition in the cat. *J Physiol.* 200(1), 87-108.

de Groat WC. (2006) Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective. *Br J Pharmacol.* 147(S2), S25-S40.

Dittrich F, Feng Y, Metzdorf R, Gahr M. (1999) Estrogen-inducible, sex-specific expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in a forebrain song control nucleus of the juvenile zebra finch. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(14), 8241-6.

Dudley CA, Moss RL. (1987) Effects of a behaviorally active LHRH fragment and septal area stimulation on the activity of mediobasal hypothalamic neurons. *Synapse.* 1, 240-247.

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

Fegiz G, Trenti A, Ambrogi V, Papini PapiM, Tucci G, Angelini L. (1986) Sexual and bladder dysfunctions following surgery for rectal carcinoma. *Ital J Surg Sci.* 16, 103-9.

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

Fiore M, Chaldakov GN, Aloe L. (2009) Nerve growth factor as a signaling molecule for nerve cells and also for the neuroendocrine-immune systems. *Rev Neurosci.* 20(2), 133-45.

Fontaine-Lenoir V, Chambraud B, Fellous A, David S, Duchossoy Y, Baulieu EE, Robel P. (2006) Microtubule-associated protein 2 (MAP2) is a neurosteroid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(12), 4711-6.

Geneser F (2000) *Histología. Editorial Médica Panamericana. México.*

Giaume C, Kirchhoff F, Matute C, Reichenbach A, Verkhratsky A. (2007) Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death Differ.* 14, 1324-1335.

Gibson CL, Constantin D, Prior MJ, Bath PM, Murphy SP. (2005) Progesterone suppresses the inflammatory response and nitric oxide synthase-2 expression following cerebral ischemia. *Exp Neurol.* 193, 522-530.

Giraldi A, Alm P, Werkstrom V, Myllymaki L, Wagner G, Andersson KE. (2002) Morphological and functional characterization of a rat vaginal smooth muscle sphincter. *Int J Impot Res.* 14(4), 271-82.

Giuliano F, Rampin O, Allard J. (2002) Neurophysiology and pharmacology of female genital sexual response. *J Sex Marital Ther.* 28, 101-121.

González SL, López-Costa JJ, Labombarda F, Deniselle MC, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF. (2005) Progesterone effects on neuronal ultrastructure and expression of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in rats with acute spinal cord injury. *Cell Mol Neurobiol.* 29(1), 27-39.

Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I. (2000) Progesterone receptor isoforms: function and regulation. *Rev Invest Clin.* 52(6), 686-91.

Guillou A, Romanò N, Bonnefont X, Le-Tissier P, Mollard P, Martin AO. (2011) Modulation of the tyrosine kinase receptor Ret/glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) signaling: a new player in reproduction induced anterior pituitary plasticity? *Endocrinology.* 152(2), 515-25.

Hanani M. (2005) Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Research Reviews.* 48, 457-476.

Hanani M. (2010) Satellite glial cells in sympathetic and parasympathetic ganglia: In search of function. *Brain Research Reviews.* 64, 304–327.

Haydon PG, Carmignoto G. (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol. Rev.* 86, 1009–1031.

Hellman L, Pritchard J, Wynn R. (1975) *Williams Obstetricia. Editorial Salvat Editores SA. Barcelona Madrid.*

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

Hernández-Aragón LG. (2012) Efecto de la gestación y el parto sobre la organización histológica de la vagina pélvica de la coneja. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Hisasue S, Kato R, Suetomi T, Kato K, Suzuki K, Kobayashi K, Itoh N, Kiyama H, Tsukamoto T. (2006) Age-related alteration of neurturin receptor GFRa-2 and nNOS in pelvic ganglia. *Neurobiol Aging*. 27(10), 1524-30.

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

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

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

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

Jobling P. (2011) Autonomic control of the urogenital tract. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 165,113-126

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

Kawamoto Y, Nakamura S, Matsuo A, Akiguchi I, Shibasaki H. (2000) Immunohistochemical localization of glial cell line-derived neurotrophic factor in the human central nervous system. *Neuroscience*. 100(4): 701-712,

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

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

Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. (2013) Microglía: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*, 77, 10-18.

Krizsan-Agbas D, Pedchenko T, Hasan W, Smith PG. (2003) Oestrogen regulates sympathetic neurite outgrowth by modulating brain derived neurotrophic factor synthesis and release by the rodent uterus. *Eur J Neurosci.* 18, 2760-2768.

Laurikainen A, Hiltunen JO, Thomas-Crusells J, Vanhatalo S, Arumäe U, Airaksinen MS, Klinge E, Saarma M. (2000) Neurturin is a neurotrophic factor for penile parasympathetic neurons in adult rat. *J Neurobiol.* 43(2), 198-205.

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

Langworthy OR. (1965) Innervation of the pelvic organs of the rat. *Invest Urol.* 2, 491-511.

Laurence L. Brunton, Bruce A. Chabner, Björn C. Knollmann. *Hormones and Hormone Antagonists*, en Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 12 edición. Editorial The McGraw-Hill Companies, Inc.

Liao Z, and Smith PG. (2011) Adaptive Plasticity of Vaginal Innervation in Term Pregnant Rats. *Reproductive Sciences* 2011 18: 1237.

Li M, Masuko S. (1997) Neuronal circuitry between the inferior mesenteric ganglion and lower intestine of the dog. *Arch Histol Cytol.* 60(4), 391-404.

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

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

Lonstein JS, Stern JM. (1998) Site and behavioral specificity of periaque-ductal gray lesions on postpartum sexual, maternal, and aggressive behaviors in rats. *Brain Res.* 804, 21-35.

MacLean AB, Nicol LA, Hodgins MB. (1990) Immunohistochemical localization of estrogen receptors in the vulva and vagina. *J Reprod Med.* 35, 1015-1016.

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

Matthews MR. (1983) *The ultrastructure of junctions in sympathetic ganglia of mammals.* Autonomic Ganglia. Wiley. 27-66.

McCarthy MM, Pfaff DW, Schwartz-Giblin S. (1991) Midbrain central gray GABA receptor activation enhances and blockade reduces, sexual behavior in the female rat. *Exp Brain Res.* 86, 108-116.

- McKenna KE. (2002) The neurophysiology of female sexual function. *J Urol.* 20, 93-100.
- Milligan ED, Watkins LR. (2009) Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 23-36.
- Mizota K, Ueda H. (2008) N-terminus of MAP2C as a neurosteroid-binding site. *Neuroreport.* 19(15), 1529-33.
- Mobley WC. (2001) Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci.* 24, 1217-81.
- Molliver DC, Wright DE, Leitner ML, Parsadanian AS, Doster K, Wen D, Yan Q y Snider WD. (1997). IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron.* 19, 849-861.
- Mowa CN, Iwanaga T. (2000) Differential distribution of oestrogen receptor-alpha and -beta mRNAs in the female reproductive organ of rats as revealed by in situ hybridization. *J Endocrinol.* 165, 59-66.
- Murakami K, Fellous A, Baulieu EE, Robel P. (2000) Pregnenolone binds to microtubule-associated protein 2 and stimulates microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(7), 3579-84.
- Myatt L, Sun K. (2010) Role of fetal membranes in signaling of fetal maturation and parturition. *Int J Dev Biol.* 54(2-3):545-53.
- Ng KY, Wong YH and Wise H. (2010) The role of glial cells in influencing neurite extension by dorsal root ganglion cells. *Neuron Glia Biology.*
- Nilsen J, Brinton RD. (2002) Impact of progestins on estrogen induced neuroprotection: synergy by progesterone and 19-norprogesterone and antagonism by medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology.* 143, 205-212.
- Nilsen J, Brinton RD. (2003) Divergent impact of progesterone and medroxyprogesterone acetate (Provera) on nuclear mitogen-activated protein kinase signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100, 10506–10511.
- Nussey S, Whitehead S. 2001. *Endocrinology: un acercamiento integrado.* Oxford. Londres. Págs. 252.
- Ogawa S, Eng V, Taylor J, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW. (1998) Roles of estrogen receptor-alpha gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. *Endocrinology.* 139(12), 5070-81.
- Oh SJ, Hong SK, Kim SW, Paick JS. (2003) Histological and functional aspects of different regions of the rabbit vagina. *Int J Impot Res.* 15(2), 142-50.
- Owman C, Rosengren E, Sjöberg NO. (1966) Origin of the adrenergic innervation to the female genital tract of the rabbit. *Life Sci.* 5(15), 1389-96.

Pannese E. (1981) The satellite cells of the sensory ganglia. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 65, 1-111.

Pfaff DW, Sakuma Y. (1979, a) Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Physiol.* 288, 203-210.

Pfaff DW, Sakuma Y. (1979, b) Facilitation of the lordosis reflex of female rats from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Physiol.* 288, 189-202.

Pfaff DW, Schwanzel-Fukuda M, Parhar IS, Lauber AH, McCarthy LM, Kow LM. (1994) GnRH neurons and other cellular and molecular mechanisms for simple mammalian reproductive behaviors. *Recent Prog Horm Res.* 49, 1-25.

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

Papka RE, Newton BW, McNeill DL. (1991) Origin of galanin- immunoreactive nerve fibers in the rat paracervical autonomic ganglia and uterine cervix. *J Auton Nerv Syst.* 33, 25-34.

Paratcha G, Ledda F. (2008) GDNF and GFR α : a versatile molecular complex for developing neurons. *Trends Neurosci.* 31(8), 384-91.

Pelletier G, El-Alfy M. (2000) Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab.* 85(12), 4835-40.

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

Peter IC, Kristal MB, Komisaruk BR. (1987) Sensory innervation of the external and internal genitalia of the female rat. *Brain Res.* 408, 199-204.

Popesko P, Pajtová V, Horák J. (1990) A color atlas of the anatomy of small laboratory animal. Editorial Wolfe Publishing Lt. Inglaterra.

Purinton PT, Fletcher TF, Bradley WE. (1976) Innervation of pelvic viscera in the rat. Evoked potentials in nerves to bladder and penis (clitoris). *Invest Urol.* 14(1), 28-32.

Quiroz F (2004) *Tratado de Anatomía Humana*. Editorial Porrúa. México.

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.

Resplande J, Gholami SS, Graziottin TM, Rogers R, Lin CS, Leng W, Lue TF. (2002) Long-term effect of ovariectomy and simulated birth trauma on the lower urinary tract of female rats. *J Urol.* 168(1), 323-30.

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* 20:53-60.

Sakuma Y, Pfaff DW. (1979) Facilitation of female reproductive behavior from mesencephalic central gray in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 237, R278-R284.

Scemes E, Giaume C. (2006) Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia* 54, 716-725.

Schumacher M, Coirini H, Robert F, Guennoun R, El-Etr M. (1999) Genomic and membrane actions of progesterone: implications for reproductive physiology and behavior. *Behav Brain Res.* 105, 37-52.

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

Schwartz-Giblin S, McCarthy MM. (1995) A sexual column in the PAG. *Trends Neurosci.* 18(3), 129.

Simard M, Nedergaard M. (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129, 877-896.

Simpkins JW, J.A. Dykens JA. (2007) Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Brain Res Rev.* 57(2), 421-30.

Singh M. (2001) Ovarian hormone selicit phosphorylation of Akt and extracellular signal regulated kinase in explants of the cerebral cortex. *Endocrine.* 14,407-415.

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

Sullivan AM, Toulouse A. (2011) Neurotrophic factors for the treatment of Parkinson's disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22(3), 157-65.

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

Tessier C, Prigent-Tessier A, Bao L, Telleria CM, Ferguson-Gottschall S, Gibori GB, Gu Y, Bowen-Shauver JM, Horseman ND, Gibori G. (2003) Decidual activin: its role in the apoptotic process and its regulation by prolactin. *Biol Reprod.* May; 68(5):1687-94.

Ting AY, Blacklock AD, Smith PG. (2004) Estrogen Regulates Vaginal Sensory and Autonomic Nerve Density in the Rat. *Biology of Reproduction.* 71, 1397-1404.

Tischkau SA, Ramírez VD. (1993) A specific binding protein for progesterone in rat brain: sex differences and induction by estrogens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90, 1285-89.

Tortora GJ, Derrickson B. (2000) El Sistema endocrino. En: principios de anatomía y fisiología. 11ª edición. Editorial panamericana médica. Pp 620-668.

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

Tresguerres JAF. (1992) Fisiología Humana. Editorial Mc Graw Hill. Madrid.

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

Truss M, Beato M. (1993) Steroid hormone receptors and interactions with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocrine Rev*. 14, 459-79.

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

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

Wang J, Green PS, Simpkins JW. (2001) Estradiol protects against ATP depletion, mitochondrial membrane potential decline and the generation of reactive oxygen species induced by 3-nitropropionic acid in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *J Neurochem*. 77, 804-811.

Wanigasekara Y, Keast JR. (2005) Neurturin has multiple neurotrophic effects on adult rat sacral parasympathetic ganglion neurons. *Eur J Neurosci*. 22(3), 595-604.

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

Xelhuantzi Arreguin N. (2012) Organización tisular del aparato urogenital inferior en conejas jóvenes multíparas. Tesis de doctorado. Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Yang CC, Bowen JR, Kraft GH, Uchio EM, Kromm BG. (2000) Cortical evoked potentials of the dorsal nerve of the clitoris and female sexual dysfunction in multiple sclerosis. *J Urol*. 164, 2010-3.

Zoubina EV, Fan Q, Smith PG. (1998) Variations in uterine innervation during the estrous cycle in rat. *J Comp Neurol*. 397, 561-571.

Zoubina EV, Mize AL, Alper RH, Smith PG. (2001) Acute and chronic estrogen supplementation decreases uterine sympathetic innervation in ovariectomized adult virgin rats. *Histol Histopathol.* 16, 989-996.

Zoubina EV, Smith PG. (2000) Axonal degeneration and regeneration in rat uterus during the estrous cycle. *Auton Neurosci.* 84, 176-185.

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

20. Anexos

20.1. Anexo 1.- Tinción tricrómica de Masson

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

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

	22	Agua corriente	40 seg
	18	Etanol 96%	40 seg
	19	Etanol 96%	40 seg
	20	Etanol 100%	30 seg
Deshidratación	21	Etanol 100%	30 seg
	22	Etanol : Xileno	10 seg
	23	Xileno 1	10 seg
	24	Xileno 2	10 seg

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

20.2. Anexo 2.- Inmunohistoquímica anti-GFAP, anti-GDNF, anti-GFR α -1, anti-p75^{NTR}, anti-Trk-A y Trk-B en cortes transversales de la región pélvica de la vagina.

Desparafinar		
Destape de antígenos	Citrato de Sodio a pH 6 y 10mM	Tres noches
	Se ponen a temperatura ambiente	15 minutos
	Se hierven en el microondas a potencia máxima	2 minutos
	Se calientan en el microondas a potencia 10	10 minutos
Preparación	Se secan y se hace el recuadro y se colocan en la cámara húmeda	
Lavar	PBS 1x (tres lavados)	10 minutos c/u
Bloqueo de peroxidasas endógenas	Agua oxigenada al 3% en PBS 1x	30 minutos
Lavar	PBS 1x (dos lavados)	10 minutos c/u
	PBS 1x-Tritón al 0.3%	10 minutos
Bloquear uniones inespecíficas	Bloqueo con suero de cabra o burro al 5% en PBS 1x-Tritón al 0.3%	1 hora
Lavar	PBS 1x-Tritón al 0.3% (tres lavados)	10 minutos c/u

Primer anticuerpo	Anticuerpo Primario 1:100, en PBS 1x-Triton al 0.3%	3 noches a 4°C, en la cámara húmeda
Lavar	PBS 1x-Tritón al 0.3% (tres lavados)	10 minutos c/u
Segundo anticuerpo	Anticuerpo Secundario 1:250, en PBS 1x-Tritón al 0.3%	2 horas. A temperatura ambiente en la cámara húmeda
Lavar	PBS 1x-Tritón al 0.3% (dos lavados)	10 minutos c/u
	PBS 1x	10 minutos
Complejo Avidina-Biotina-peroxidasa (ABC)	ABC: 1:200, en PBS-1x	1 hora
Lavar	PBS 1x (tres lavados)	10 minutos c/u
Revelar	Diaminobencidina	
Lavar	PBS 1x (tres lavados)	Por decantación
Contratinción	Hematoxilina de Mayer	10 minutos
Lavar	Agua corriente	Por decantación
Deshidratación		

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

21. Publicaciones



Original Article

Int Neurourol J 2018;22 Suppl 1: S1-11
<https://doi.org/10.5213/inj.1834974.487>
pISSN 2093-4777 · eISSN 2093-6931



Expression of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) and the GDNF Family Receptor Alpha Subunit 1 (GFR α -1) in the Paravaginal Ganglia of Nulliparous and Primiparous Rabbits

Verónica García-Villamar^{1,2}, Laura G. Hernández-Aragón^{1,2}, Jesús R. Chávez-Ríos¹, Arturo Ortega⁴, Margarita Martínez-Gómez^{2,3}, Francisco Castellán^{2,4}

¹ Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México

² Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México

³ Depto. de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biotécnicas, Unidad Fortín Tlaxcala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlaxcala, México

⁴ Depto. de Toxicología, Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México



Purpose: To evaluate the expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and its receptor, GDNF family receptor alpha subunit 1 (GFR α -1) in the pelvic (middle third) vagina and, particularly, in the paravaginal ganglia of nulliparous and primiparous rabbits.

Methods: Chinchilla-breed female rabbits were used. Primiparas were killed on postpartum day 3 and nulliparas upon reaching a similar age. The vaginal tracts were processed for histological analyses or frozen for Western blot assays. We measured the ganglionic area, the Abercrombie-corrected number of paravaginal neurons, the cross-sectional area of the neuronal somata, and the number of satellite glial cells (SGCs) per neuron. The relative expression of both GDNF and GFR α -1 were assessed by Western blotting, and the immunostaining was semiquantitated. Unpaired two-tailed Student *t*-test or Wilcoxon test was used to identify statistically significant differences ($P \leq 0.05$) between the groups.

Results: Our findings demonstrated that the ganglionic area, neuronal soma size, Abercrombie-corrected number of neurons, and number of SGCs per neuron were similar in nulliparas and primiparas. The relative expression of both GDNF and GFR α -1 was similar. Immunostaining for both GDNF and GFR α -1 was observed in several vaginal layers, and no differences were detected regarding GDNF and GFR α -1 immunostaining between the 2 groups. In the paravaginal ganglia, the expression of GDNF was increased in neurons, while that of GFR α -1 was augmented in the SGCs of primiparous rabbits.

Conclusions: The present findings suggest an ongoing regenerative process related to the recovery of neuronal soma size in the paravaginal ganglia, in which GDNF and GFR α -1 could be involved in cross-talk between neurons and SGCs.

Keywords: Pelvic ganglia; Nerve growth factors; Neuronal plasticity; Reproduction; Lower urogenital tract

• **Grant/Fund Support:** This study was partially funded by CONACyT through funds for the acquisition of scientific equipment (number: 225126 of the Cuerpo Académico de Fisiología del Comportamiento).

• **Research Ethics:** The Ethics Committee of the Universidad Autónoma de Tlaxcala approved all experimental procedures.

• **Conflict of Interest:** No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Corresponding author: Francisco Castellán <http://orcid.org/0000-0002-9035-2335>
Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biotécnicas, Depto. de Biología Celular y Fisiología, Unidad Fortín Tlaxcala, Carr. Fed. Tlaxcala-Puebla km 1.5, s/n, 90370-Tlaxcala, México
E-mail: fccastellan@iibiotec.unam.mx / Tel: +52-555-622-6553 / Fax: +52-246-462-1557

Submitted: September 4, 2017 / Accepted after revision: November 30, 2017



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

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 Castellán^{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 Fordes Tlaxcala, Tlaxcala, Tlax., Mexico

Correspondence should be addressed to Francisco Castellán; fo Castellan@biomedicas.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.

1. Introduction

The pelvic plexus supplies most of the autonomic innervation that receives the lower urogenital tract in vertebrates [1]. Childbirth has been postulated as a source of variability of the pelvic plexus that may lead to some urological and gynecological symptoms [2–4]. The impact of changes in steroid hormone levels during pregnancy and postpartum on the lower urogenital tract (LUT) has been underestimated despite the widespread expression of their receptors in pelvic neurons [5]. Estrogen actions are particularly interesting because they support therapies used to alleviate some urological symptoms in postmenopausal women [6].

The estrogenic status influences the size of neuronal somata of pelvic ganglia in female rats and rabbits [7, 8]. In this regard, it has been hypothesized that the increase in the serum estradiol (E2) levels at term of pregnancy is involved in the recovery of the soma size of paravaginal neurons during the postpartum period in rabbits [7, 9]. Under physiological conditions, however, such a peak of serum E2 occurs concomitantly to an increase in serum testosterone (T) levels [10]. Androgens modulate the morphology of pelvic neurons as showed for male rats, which could require their conversion into estrogens by the cytochrome P450 aromatase (hereafter aromatase) [5, 11, 12]. Estrogen and androgen actions involved in the morphological plasticity of pelvic

Aromatase expression is linked to estrogenic sensitivity of periurethral muscles in female rabbits

María de los Ángeles Carrasco-Ruiz^{1,2}, Verónica García-Villamar^{1,3}, Kenia López-García^{1,4}, Octavio Sánchez-García^{1,2}, Pablo Pacheco^{5,6}, Estela Cuevas¹, Margarita Martínez-Gómez^{1,5} and Francisco Castellán^{1*}

¹Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Tlaxcala, México

²Doctorado en Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México

³Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México

⁴Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México

⁵Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, México

⁶Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México

Beyond its role in the conversion of androgens to estrogens, the expression of aromatase could influence on the estrogenic signalling in targeted tissues. Considering the well-defined biochemical and physiological differences between the pubococcygeus (Pcm) and bulbospongiosus (Bsm) muscles in female rabbits, it is presently hypothetical that the aromatase expression is differentially linked to the estrogen sensitivity of each muscle. To this end, serum estradiol levels and the aromatase expression, presence of ER α and ER β and morphometry were evaluated in the Pcm and Bsm of female rabbits allocated in control, ovariectomized (OVX) and OVX treated with estradiol benzoate (OVX + EB) groups. Aromatase expression was high in the Pcm. Independently to serum estradiol, ovariectomy increased aromatase expression in the Pcm while decreased it in the Bsm. The EB treatment avoided the effect of ovariectomy only in the Pcm. The number of immunoreactive nuclei anti-ER α and anti-ER β was high in the Pcm of OVX and OVX + EB rabbits, while those in the Bsm remained unchanged. The number of peripheral nuclei per fibre and the cross-sectional area-to-myofibrils ratio were modified only in the Pcm. Our findings support aromatase expression in the Pcm, and Bsm of rabbits is differentially linked to estrogenic sensitivity of each muscle. Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS—bulbospongiosus muscle; estradiol; estrogen receptor; pelvic floor; pubococcygeus muscle

INTRODUCTION

Pelvic and perineal skeletal muscles play important roles in the physiology of the lower urogenital tract in where they accomplish particular reproductive and excretory functions. Morphometric and functional alterations in these muscles are related to the onset of gynaecological and urinary dysfunctions in women, some of them modelled in experimental animals.^{1–4} The variation in the expression of estrogen receptors (ER) in the lower urogenital tract has been associated with some pelvic dysfunctions.^{5–8} Estrogen replacement therapy is commonly prescribed for the treatment of pelvic dysfunctions; however, its efficacy is controversial.⁹ The effect of the estrogen administration on periurethral skeletal muscles has been previously approached,^{6,8,10,11} although some issues regarding their estrogenic sensitivity remain to be addressed. Estrogens influence mass, contractile

properties, damage/repair processes and the expression of ER in hindlimb skeletal muscles.^{12–15}

The pubococcygeus (Pcm; a pelvic muscle) and the bulbospongiosus (Bsm; a perineal muscle) show differences regarding to the fibre type composition,¹⁶ reflex activity during micturition¹⁷ and muscle/damage repair responses in female rabbits.¹⁸ Morphometric characteristics of fibres and the ER expression in these muscles are differentially affected by multiparity, suggesting a dissimilar estrogen sensitivity.¹⁹ Remarkably, some of these modifications are independent of serum estradiol levels, evoking a plausible local synthesis of estradiol in both muscles.¹⁹

The expression of cytochrome P450 aromatase (hereafter aromatase), the rate-limiting enzyme converting androgens to estrogens,²⁰ has been characterized in hindlimb skeletal muscles of women and rats.^{14,21} In the vastus lateralis muscle of postmenopausal women, the aromatase expression and muscle estradiol levels are coincident with reduced serum estradiol levels.¹³ In the white adipose tissue, the expression of aromatase and the local synthesis of estradiol seem to be independent of the concentration of serum estradiol.²² The

*Correspondence to: Francisco Castellán, PhD, Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Carr. Fed. Tlaxcala-Pueblotlán 1.3, s/n, 90070-Tlaxcala, Mexico. Email: fcastellan@uax.mx

Received 7 August 2014

Revised 8 March 2015

Accepted 9 March 2015

Capítulo 16

Plasticidad conductual: De las alteraciones epigenéticas a las interacciones sociales

Francisco Castelán, Laura G. Hernández Aragón,
Verónica García Villamar*, Octavio Sánchez García,
Ma. de los Ángeles Carrasco Ruiz y Kenia López García*

La conducta se define como la actividad o movimiento de un organismo (1). A través de ella los individuos determinan dónde vivir, reproducirse, qué recursos usar, con quién aparearse y cómo responder a competidores y depredadores (2). Esto es posible debido a la interacción entre el sistema nervioso, el muscular y el endocrino, que permite responder a las señales provenientes de entornos cambiantes (3). El despliegue de algunas conductas es capaz de modificar el entorno. Supongamos dos escenarios. El primero en el que un individuo permanece en el entorno original pero interactúa con él de modo diferente a como lo hacen otros individuos de la misma especie. En un escenario alternativo, el mismo individuo podría desplazarse a otro entorno y enfrentarse con nuevas experiencias que podrían seleccionar una conducta diferente. Para algunos autores, esta plasticidad conductual puede considerarse como una rápida respuesta adaptativa que conduce a cambios morfológicos que posteriormente pueden incluirse en el genotipo, favoreciendo así la evolución de las especies (2, 4, 5). No obstante, también es posible que la conducta desplegada en respuesta al entorno inhiba la evolución de las especies, considerando que se trata de un rasgo más inestable que aquellos morfológicos y fisiológicos, evitando modificaciones genéticas (2, 6). Ambas hipótesis se concentran en la respuesta conductual sin considerar los mecanismos que subyacen a su expresión ni la influencia que al respecto pudiera tener el desarrollo de cada individuo (2).

* Estudiantes del Doctorado en Ciencias Biológicas, UATx.