



Semaforinas y neuropilinas: aportes a la plasticidad de la innervación uterina

Mág. Analía Richeri Corral

Laboratorio de Biología Celular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Montevideo, Uruguay

Tribunal

Orientadora: Dra. Mónica Brauer

Dr. Omar Trujillo-Cenoz (Presidente)

Co-orientadora: Dra. Cora Chalar

Dra. Patricia Cassina (Vocal)

Dr. Flavio Zolessi (Vocal)

A Nico

A Julieta

Al tribunal, por su tiempo, su apoyo y sus comentarios enriquecedores.

A Mónica por el lugar que me ha dado en su laboratorio. Por todo lo que me enseñó...

A Ceci Scorza y a Cora por su apoyo incondicional, por siempre estar acá y allá

A la gente del lab: Jess, Gaby, Bianchis, Xime, José Pedro, Martín, Paola,

Mica, Patito, a TODOS por TODO

A 'los gordos' por los momentos compartidos... por su amistad

A Timothy Cowen y Keith Crutcher, por sus valiosos comentarios y apoyo

A la gente de Neuroquímica-IIBCE, Caroli, Flor, Giselle, Fer, Feli, Andrés, Gustavo y Dajas;
de Microbiología-IIBCE, Pablo Zunino y Paola Scavone; y de Facultad de Ciencias, a Andrea
y Nibia de Biología Celular; y a Todos los de Bioquímica

A todo el Clemente

Al PEDECIBA y la ANII por el apoyo económico durante la realización de la tesis

A mis padres, a la fuerza de mi madre, a mi hermano

A mi esposo Nico porque siempre está, y junto con JULIE mi hija son todo para mi...

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	3
El útero	3
Inervación del útero	4
Plasticidad de la inervación uterina como modelo neurobiológico	7
1. EFECTOS DE LA PUBERTAD	7
2. EFECTOS DEL CICLO SEXUAL	8
3. PAPEL DE LOS ESTRÓGENOS	9
4. EFECTORES DEL ESTRÓGENO	10
5. PAPEL DEL ÚTERO EN LA REMODELACIÓN DE LA INERVACIÓN UTERINA	11
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	13
Señales pro- y anti- neuritogénicas producidas por el útero	13
1. NEUROTROFINAS Y SUS RECEPTORES NEURONALES	13
2. NEUROTRIMINA	16
3. OTRAS SEÑALES ASOCIADAS AL SUSTRATO: EVIDENCIAS DEL CRIOCULTIVO	17
4. NUESTRA VISIÓN ES AÚN FRAGMENTARIA.	17
5. ¿ POR QUÉ LAS SEMAFORINAS?	18
Semaforinas	21
SEÑALES NEGATIVAS QUE SE EXPRESAN EN LAS VÍAS DE CRECIMIENTO DE LOS AXONES	21
FAMILIA DE LAS SEMAFORINAS	24
PAPEL DE LAS SEMAFORINAS EN EL SISTEMA NERVIOSO	25
Receptores para semaforinas	30
NEUROPILINAS (NRPs)	30
1. NRP1	30
2. NRP2	31
Del receptor al citoesqueleto	35
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	38
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	39
MATERIALES Y MÉTODOS	42
RESULTADOS y DISCUSIONES PARCIALES	61
Capítulo 1: Semaforinas en el útero: una visión desde la proteína	61
Capítulo 2: Identificación de semaforinas específicas -Sema3A y Sema3F	68
Capítulo 3: Otras semaforinas presentes en el útero	89
Capítulo 4: Receptores para semaforinas	96
DISCUSIÓN GENERAL	116
PERSPECTIVAS	122
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
ANEXO	140

La remodelación de la inervación uterina por las hormonas sexuales es un modelo particularmente ventajoso para estudiar los mecanismos que regulan la plasticidad del sistema nervioso del adulto. La inervación simpática del útero sufre ciclos de degeneración y regeneración que son controlados por variaciones en los niveles sistémicos de estrógenos. Estas acciones neurodegenerativas son iniciadas por cambios en el tejido uterino efector e involucran la regulación selectiva de moléculas con efectos positivos y negativos para los nervios simpáticos. En este marco, surge el presente trabajo de tesis que apunta a proveer información que ayude a completar el panorama de señales que cambian en el microambiente uterino en respuesta a los estrógenos y ejercen efectos negativos sobre su inervación.

Las semaforinas son una familia de glicoproteínas secretadas, transmembranas y ancladas a la membrana plasmática, que se encuentran entre las señales mejor caracterizadas como reguladores negativos de distintas poblaciones neuronales, incluyendo las simpáticas. Las acciones de las semaforinas son mediadas por dos tipos de receptores, las plexinas y las neuropilinas. Si bien las semaforinas juegan un papel clave durante el desarrollo, se sabe que estas señales continúan expresándose en la vida adulta, siendo capaces de afectar negativamente a los axones maduros. Esta propiedad posiciona a estas moléculas como candidatos interesantes para explicar el modelo de neuroplasticidad uterina. En este contexto, surge la hipótesis de que las semaforinas y sus receptores neuronales contribuyen a la denervación simpática del útero iniciada por los estrógenos.

Con el fin de probar esta hipótesis, utilizamos el modelo de tratamiento crónico con estradiol (E2) a ratas prepúberes, el cual genera un microambiente uterino fuertemente negativo para los nervios simpáticos y los conduce a la degeneración. Usando abordajes moleculares a nivel transcripcional y traduccional, evaluamos si el útero expresa semaforinas y si su expresión es regulada por el E2. Inicialmente usamos técnicas de inmunodetección *in situ* y *Western blot* empleando un anticuerpo que reconoce el dominio SEMA presente en todos los miembros de la familia de las semaforinas. Observamos que el E2 aumenta la expresión de SEMA en las áreas de distribución de los nervios simpáticos en un marco temporal consistente con su degeneración.

Los estudios transcripcionales de RT-PCR nos permitieron identificar tres semaforinas: dos miembros secretados del grupo 3 (Sema3A y Sema3F) y uno transmembrana del grupo 4 (Sema4B). En concordancia con los estudios proteicos, demostramos que el E2 induce la expresión de los tres miembros. Los estudios de hibridación *in situ* mostraron la distribución tisular y celular de los transcritos para Sema3A y Sema3F. Observamos que ambas semaforinas se localizan en el tejido conjuntivo que rodea a los haces de músculo liso uterino (miometrio) y también alrededor de los grandes vasos sanguíneos intramiométriales. Las células responsables de su síntesis fueron identificadas como presuntos fibroblastos y granulocitos eosinófilos. La

expresión de semaforinas por los fibroblastos ha sido bien caracterizada en las áreas neurorepulsivas que se forman en el sistema nervioso central en respuesta a lesiones. Por otra parte su expresión en los granulocitos eosinófilos apoya observaciones que vinculan a las semaforinas con procesos neurodegenerativos selectivos que se asocian con la inflamación.

En una segunda etapa exploramos si las neuronas simpáticas que inervan al útero expresaban los receptores específicos para Sema3A y Sema3F, las neuropilinas-1 y -2 (NRP1, NRP2). Complementariamente, evaluamos la presencia de NRP1 en las neuronas sensoriales de proyección uterina de los ganglios de la raíz dorsal, debido a que Sema3A también tiene efectos sobre este tipo neuronal. La utilización de métodos de trazado retrógrado e inmunofluorescencia permitió demostrar que las neuronas simpáticas y sensoriales de proyección al útero, expresan NRP1, mientras que las simpáticas expresan además NRP2. Encontramos también distintos perfiles de regulación de la expresión de NRPs asociados a las diferentes poblaciones de neuronas. Así, NRP2 se hace detectable en una población de fibras simpáticas en degeneración; mientras que los niveles de NRP1 disminuyen en la subpoblación de neuronas medianas de proyección uterina. Estos resultados sugieren que los incrementos en la producción de Sema3A y Sema3F en el útero estrogenizado pueden ser detectados por los nervios uterinos, dando apoyo adicional a nuestra hipótesis. Cabe mencionar además, que detectamos inmunorreactividad para NRP1 en los vasos sanguíneos intrauterinos, lo que sugiere su participación adicional en procesos angiogénicos.

Tomados en su conjunto, los resultados obtenidos sustentan la hipótesis de que las semaforinas y sus receptores neuronales estarían implicados en los fenómenos de plasticidad de la inervación uterina. La expresión simultánea de Sema3A, 3F y 4B en el útero estrogenizado se suma a la ya demostrada redundancia de otras señales con efectos negativos para los nervios simpáticos. Esta redundancia pone de manifiesto la relevancia biológica del proceso neurodegenerativo que ocurre en el útero en respuesta a los estrógenos y que hoy se sabe está alterado en varias patologías ginecológicas. Finalmente, nuestros resultados apoyan el concepto de que las señales de guiado axónico que actúan durante el desarrollo son re-utilizadas en la vida postnatal como reguladores de la plasticidad.

El útero

En los mamíferos, el aparato reproductor femenino está compuesto por órganos internos y externos. Los primeros están ubicados a nivel dorsal dentro de la cavidad pélvica, e incluyen a los ovarios, los oviductos, el útero y la vagina. El útero es un órgano hueco que presenta variaciones morfológicas en distintos grupos de mamíferos (Figura 1). En los roedores, el útero consta de dos cuernos uterinos, los cuales se unen caudalmente en el cuerpo del útero el que se continúa con el cuello uterino (Figura 1B), (Hafez, 1970).

Independientemente de la morfología, la pared del útero presenta a la sección tres capas de tejido que son, desde afuera hacia adentro: i) *Serosa o perimetrio*, que corresponde al peritoneo; ii) *Miometrio*, formado principalmente por tejido muscular liso; y iii) *Endometrio*, compuesto por una mucosa con un sistema de glándulas tubulares y un epitelio que reviste la luz del órgano (Figura 1).

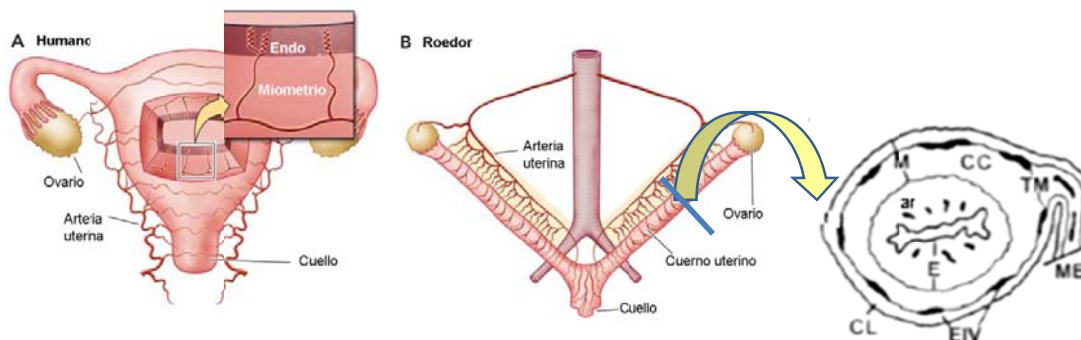


Figura 1: Anatomía del útero de la mujer (A) y de la rata (B). La figura B, muestra además un diagrama esquemático de un corte transversal de cuerno uterino de rata. M-Miometrio, CL- capa muscular longitudinal / CC- capa muscular circular; ME- mesometrio / TM-triángulo mesometrial / E- endometrio / ar- arterias radiales. EIV espacio intermiometrial vascular. Tomado de Chávez y col., 2002; Osol y Mandala 2009.

En los roedores, el miometrio está compuesto por dos capas. La más externa presenta sus fibras musculares orientadas longitudinalmente, mientras que la más interna tiene sus fibras orientadas circularmente. Ambas capas se encuentran separadas por una hoja de tejido conectivo que contiene un plexo vascular bien desarrollado. La capa longitudinal se extiende lateralmente formando una extensión muscular bilaminar denominada tejido parametrial o mesometrio (Figura 1B), la cual acompaña al cuerno uterino en toda su extensión longitudinal y es el sitio por donde

ingresan los nervios así como los vasos sanguíneos y linfáticos. Opuesto al mesometrio, el músculo liso longitudinal forma una zona engrosada conocida como borde antimesometrial o *línea uteri*.

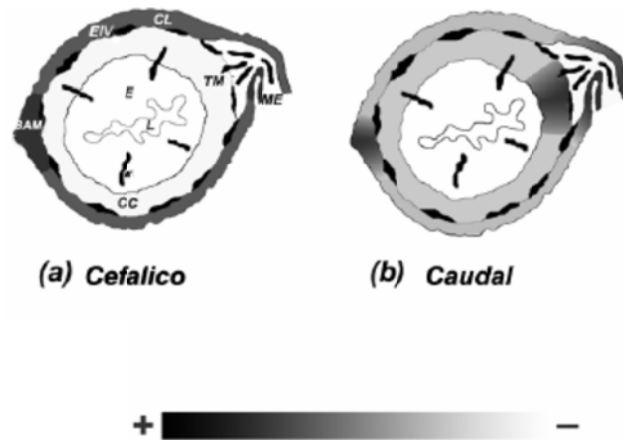
Inervación del útero

Muchas funciones uterinas se encuentran bajo el control de los nervios autónomos y aferentes (Marshall, 1970; Owman, 1981; Owman y Stjernquist, 1988; Papka y Traurig, 1993; Traurig y Papka, 1993; Gnanamanickam y Llewellyn-Smith, 2011). Dado que existen marcadas diferencias respecto de los orígenes, rutas de acceso y densidad de inervación de los nervios uterinos entre distintas especies de mamífero, nos centraremos en la rata, que es nuestro modelo de trabajo (revisado en Brauer y Smith, 2014).

Los nervios simpáticos que inervan al útero se originan en ganglios prevertebrales y paravertebrales. El 90% de las fibras simpáticas que inervan la porción cefálica del cuerno uterino se originan en neuronas localizadas en los ganglios suprarrenales y de la región tóraco-lumbar la cadena simpática (T10-L3). La inervación asociada a la región caudal del cuerno uterino y al cuello proviene de neuronas de los ganglios paravertebrales, principalmente de la región L2-L4 (Houdeau y col., 1995; 1998). Los ganglios paracervicales proveen poca inervación al útero de la rata (Houdeau y col., 1998). El plexo ovárico es la ruta de entrada de los nervios que inervan la porción cefálica del cuerno uterino mientras que los nervios hipogástricos y pélvicos aportan la inervación de la región caudal del cuerno y el cuello del útero (Thorbert y col., 1977; Houdeau y col., 1998).

Las fibras nerviosas simpáticas penetran al útero a través del mesometrio, asociadas con los vasos sanguíneos o en forma de haces nerviosos independientes (Figura 2). Dentro del útero, las fibras terminales se distribuyen en las dos capas miometriales y se asocian con los vasos sanguíneos. Este patrón general presenta variaciones regionales. En el miometrio de la región cefálica del cuerno uterino, las fibras se encuentran principalmente asociadas a la capa longitudinal (Figura 2a), mientras que en la región caudal, éstas aparecen confinadas mayormente a la capa muscular circular y concentradas en el triángulo mesometrial (Figura 2b). Esta especificidad regional podría ser esencial para algunos procesos reproductivos, tales como las contracciones que se propagan desde la extremidad tubárica de los cuernos uterinos y contribuyen por ejemplo, al espaciamiento

Figura 2: Representación esquemática que ilustra el patrón y las variaciones en la densidad de innervación simpática del cuerno del útero de la rata en sus regiones cefálica y caudal. La densidad de fibras simpáticas intrauterinas se simboliza en escala de grises, en donde el negro representa los sectores más innervados. Modificado de [Chávez-Genaro y col., 2002](#).



to de los blastocistos. Cabe recordar que la norrenalina (NA) liberada por los nervios simpáticos causan la contracción o relajación del miometrio actuando respectivamente sobre los receptores alfa y beta adrenérgicos ([Traurig y Papka, 1993](#)). El estrógeno determina la dominancia relativa de ambos tipos de receptores ([Brauer y Burnstock, 1997](#)). A nivel vascular, la NA provoca vasoconstricción.

La innervación colinérgica del útero se origina en los ganglios paracervicales y llega al útero por la vía del plexo pélvico. Estos nervios se distribuyen en el miometrio y en el sistema microarterial uterino ([Papka y Traurig, 1993](#); [Papka y col., 1999](#)). La acetilcolina provoca la contracción miometrial y evoca vasodilatación en los vasos sanguíneos uterinos ([Papka y Traurig, 1993](#); [Traurig y Papka, 1993](#); [Papka y col., 1999](#)).

El útero está también innervado por fibras nerviosas aferentes que llevan información hacia el sistema nervioso central y poseen roles eferentes, regulando la contractilidad miometrial y vascular. Estos nervios son positivos para una variedad de neuropéptidos, incluyendo entre otros a la sustancia P (SP) y al péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), (revisado en [Brauer y Smith, 2014](#)). En la ratona, las fibras nerviosas aferentes que llegan al útero se originan en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) asociados con los segmentos T13-L1 de la médula espinal ([Nance y col., 1988](#)). La mayor parte de estas fibras son sensibles a la capsaicina, indicando que son del tipo C. El ganglio nodoso vía el nervio vago, contribuye también a la innervación del útero ([Ortega-Villalobos y col., 1990](#)). Dentro del útero estas fibras se distribuyen en el miometrio y

alrededor de los vasos sanguíneos (Haase y col., 1997; Zoubina y col., 1998; Gnanamanickam y Llewellyn-Smith, 2011). La SP contrae al miometrio y es vasodilatadora. El CGRP es también vasodilatador y relaja al miometrio.

Finalmente, cabe mencionar que los componentes vasculares y glandulares del endometrio presentan una escasa inervación, aunque ocasionalmente algunas fibras penetran en el endometrio asociadas a las arterias radiales (Figura 2) (Gnanamanickam y Llewellyn-Smith, 2011). En el endometrio humano normal, las fibras nerviosas están restringidas a la capa basal, mientras que la capa funcional – que se desprende en la menstruación – está desprovista de inervación (Tokushige y col., 2006). Recientemente, se ha observado la presencia de una inervación anormalmente desarrollada en la capa funcional del endometrio de las pacientes con endometriosis, que incluye fibras sensoriales, simpáticas y parasimpáticas (Tokushige y col., 2006; 2007). La presencia de estas fibras se considera un marcador de la patología y está siendo evaluado como un posible método diagnóstico (Al-Jefout y col., 2007, 2009; Bokor y col., 2009). Es interesante destacar, que los focos endometrióticos ectópicos están inervados y esa inervación participaría en el dolor que caracteriza a la patología (Kobayashi y col., 2014).

La plasticidad de la innervación uterina como modelo neurobiológico

Una particularidad de la innervación del útero es su capacidad de remodelarse en la vida adulta, en función de las fluctuaciones cíclicas en los niveles sistémicos de estrógenos y durante la gestación. Los efectos inhibitorios provocados por el estradiol sobre la innervación del útero son variados y dependen fundamentalmente del tipo de nervios considerados, siendo los nervios simpáticos los más vulnerables. Contrariamente, todos los tipos de nervios uterinos son igualmente sensibles a los efectos neurodegenerativos transitorios asociados con la gestación (revisado en [Latini y col., 2008](#); [Brauer, 2008](#); [Brauer y Smith, 2014](#)). Si bien existen evidencias que estos procesos ocurren en la mujer, mucha de la información disponible proviene de estudios en roedores. Estos modelos poseen numerosas ventajas, tales como pubertad temprana y ciclos estrales y gestaciones breves. Adicionalmente, los roedores permiten evaluar de manera sencilla y controlada, los efectos provocados por la castración y la administración de hormonas sexuales ovárico-placentarias exógenas, particularmente estradiol y progesterona.

1. Efectos de la pubertad

En la rata, la innervación simpática del útero comienza a desarrollarse en etapas tempranas de la vida postnatal y crece progresivamente entre los períodos infantil y prepuberal, lo que se acompaña por un aumento gradual en el contenido total y la concentración de NA. Al ocurrir la primera ovulación en la pubertad, ocurre una marcada disminución en la densidad de nervios simpáticos miometriales la que se acompaña por un descenso en la concentración de NA. Contrariamente, el contenido total de NA no se reduce, sugiriendo que los nervios simpáticos son inhibidos de crecer en forma paralela con el aumento de tamaño que las hormonas sexuales provocan en el útero ([Brauer y col., 1992](#); [Chávez-Genaro y col., 2002](#)). La reducción en la densidad de innervación alcanzada luego de la pubertad es irreversible, por lo que la existencia de fenómenos neurodegenerativos no puede ser completamente desestimada. Los efectos de la pubertad natural son emulados por la administración de estradiol ([Brauer y col., 1995](#)). La densidad de innervación de la arteria uterina y sus ramas intrauterinas no se ve afectada por la pubertad, reforzando la idea que la innervación vascular es menos vulnerable a las acciones de las hormonas sexuales ([Corbacho y col., 1997](#)). Los efectos de la pubertad sobre la innervación colinérgica y sensorial del útero no han sido estudiados.

2. Efectos del ciclo sexual

Estudios histoquímicos y bioquímicos realizados hacia finales de la década de 1960 mostraron que en varias especies de mamíferos, incluyendo a la mujer, los niveles de NA fluctuaban a lo largo del ciclo sexual, descendiendo en las fases del ciclo en que los niveles de estrógenos predominan respecto a los de progesterona (Cha y col., 1965; Adham y Schenk, 1969; Sjöberg, 1968; Falk y col., 1974, 1975; Owman y col., 1976; Thorbert y col., 1978; Van Orden y col., 1980). Dos posibles explicaciones podrían explicar estos cambios. Una es que una cantidad fija de axones estructuralmente intactos se “vaciaran y llenaran” de NA en respuesta a las fluctuaciones hormonales; mientras que la segunda, es que los axones degeneraran durante el ciclo sexual.

En 1998, Elena Zoubina y Peter Smith, utilizando inmunodetección *in situ* asociada a métodos de cuantificación de fibras nerviosas, mostraron la existencia de una remodelación estructural de la innervación simpática del útero. Esta implicaba una pérdida genuina de nervios en las fases de dominancia estrógena (proestro y estro) y la posterior recuperación de la innervación en las fases con niveles bajos de estrógenos (metaestro y diestro), (Figura 3). Estudios de microscopía electrónica revelaron que estos cambios estructurales involucraban la degeneración y posterior regeneración de los nervios (Zoubina y Smith, 2000). Cabe destacar, que se observó que los cambios estructurales observados durante el proestro y el estro eran precedidos de alteraciones metabólicas, tales como la depleción de las enzimas involucradas en la síntesis de noradrenalina (la tirosina hidroxilasa, TH y dopamina beta hidroxilasa, (DβH). No se detectaron cambios cíclicos en los nervios colinérgicos y aferentes (Zoubina y col., 1998).

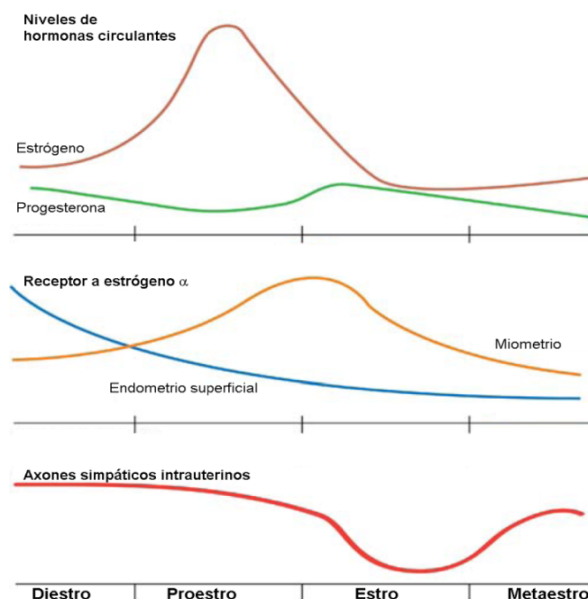


Figura 3. Diagrama que ilustra cómo varían los niveles séricos de progesterona y estrógeno; el receptor a estrógeno alfa y la densidad de fibras simpáticas en el útero durante las cuatro fases del ciclo estral (Diestro, proestro, estro y metaestro). Modificado de Latini y col., 2008.

Estudios recientes (Barcena de Arellano y col., 2013) mostraron que la densidad de nervios simpáticos miometriales también varía en ciclo menstrual de la mujer. En este estudio también se observó que en las pacientes afectadas por la adenomiosis no se observan los cambios cíclicos detectados en las mujeres sanas.

3. Papel de los estrógenos

Varias líneas de evidencia apoyan la idea que los estrógenos son las hormonas claves en la remodelación de la innervación uterina. Estas evidencias surgen de estudios que mostraron que la castración así como la administración exógena de estradiol (E2) modifican la innervación uterina. En ratas inmaduras la ovariectomía provoca un aumento generalizado en la innervación simpática del útero (Chávez-Genaro y col., 2002), mientras que en los animales adultos la incrementa a los niveles observados en el diestro (Zoubina y col., 2001).

En las ratas prepúberes, el tratamiento agudo con una única dosis de 40µg de 17β-estradiol emula los efectos de la pubertad natural, mientras que su administración crónica (4x 10µg) provoca una completa degeneración de los nervios simpáticos intrauterinos, similar a la observada al término de la gestación (Brauer y col., 1995). En las ratas adultas castradas, la inyección de una dosis de 10µg/k de 17β-estradiol reduce el número total de nervios a valores similares a los del estro, mientras que el tratamiento crónico con niveles fisiológicamente elevados de estradiol (*pellets subcutáneos*) provoca un descenso en la innervación uterina similar al observado luego del tratamiento agudo (Zoubina y col., 2001). Esto sugiere que los nervios simpáticos del útero reducen su vulnerabilidad al estrógeno a medida que el animal madura.

Si bien los estudios en el ciclo estral de la rata, no revelaron cambios en la innervación colinérgica y sensorial del útero (Zoubina y col., 1998), la administración crónica de E2 a ratas inmaduras reduce la densidad de los nervios sensoriales intrauterinos sin causar su completa degeneración (Chalar y col., 2003). Más aún este tratamiento provoca un aumento en la densidad de las fibras colinérgicas intrauterinas de tamaño grande y mediano, la cual no se ve reflejada en un aumento de las fibras finas terminales (Richeri y col., 2002).

4. Efectores del estrógeno

Los efectos del estrógeno son mediados a través de los receptores a estrógeno (RE), que son factores de transcripción inducibles por el ligando, los cuales se unen a secuencias específicas de ADN denominadas Elementos de Respuesta al Estrógeno (EREs) (Evans, 1988; Kushner y col., 2000). Las acciones neurodegenerativas que el estrógeno ejerce sobre los nervios simpáticos del útero son mediadas a través del RE α , como lo demuestra la presencia de una hiperinervación uterina en los ratones mutantes deficientes en este receptor. Estos ratones además, no responden a la ovariectomía o al reemplazo estrogénico con cambios en los nervios del útero (Zoubina y Smith 2001).

Debido a la amplia distribución de este tipo de receptores estrogénicos en distintos efectores neurales y no neurales del organismo, es posible postular que el estrógeno podría afectar a la innervación simpática del útero actuando en por lo menos tres sitios potenciales: (a) las neuronas simpáticas post-ganglionares; (b) las neuronas pre-ganglionares localizadas en la médula espinal o en sectores más altos del sistema nervioso central; y/o (c) el propio tejido uterino.

Varios estudios han mostrado la presencia de RE α en el miometrio uterino (Ennis y Stumpf, 1989; Bjorling y col., 2002) así como en las neuronas periféricas que lo inervan (Zoubina y Smith, 2002). La posibilidad de que el estrógeno actúe directamente sobre las neuronas, se ve apoyada por evidencias que indican que en la rata, las neuronas simpáticas que inervan al útero presentan una población enriquecida de receptores alfa (Zoubina y Smith, 2002). Sin embargo, estudios *in vitro* indican que el estrógeno es poco eficiente afectando directamente el crecimiento neurítico en las neuronas simpáticas (Krizsan-Agbas y col., 2002). Llamativamente, en las pacientes con adenomiosis, la expresión de las aromatasas está inusualmente elevada en el miometrio, y la expresión de los RE- α predomina en las fibras nerviosas simpáticas intrauterinas. Estas variaciones serían responsables de la reducida innervación miometrial observada en estas mujeres (Barcena de Arellano y col., 2013).

Las neuronas colinérgicas preganglionares y postganglionares (Papka y Mowa, 2003) y las neuronas de los GRD que proyectan al útero expresan receptores a estrógeno (Papka y col., 2001; Papka y Mowa, 2003). Sin embargo, ni los nervios parasimpáticos ni los sensoriales presentan cambios en los ratones *knock out* (K.O.) para los RE α (Zoubina y Smith, 2001).

5. Papel del útero en la remodelación de la innervación uterina

La demostración del papel clave jugado por el propio tejido uterino en la remodelación de su innervación se inicia con experimentos de trasplante a la cámara anterior del ojo (Brauer y col., 1998; 2000). En ellos, se transplantaron fragmentos de miometrio provenientes de ratas prepuberales a la cámara anterior del ojo de hembras adultas ovariectomizadas (Figura 4) y se evaluó la innervación de los trasplantes tras el tratamiento sistémico de las hembras receptoras con E2. Luego de 5 semanas, los trasplantes de los animales receptores tratados con vehículo presentaban un patrón de innervación organotípico, caracterizado por la presencia de fibras simpáticas varicosas en asociación con los vasos sanguíneos y el miometrio (Figura 4A). Contrariamente, los trasplantes de los animales tratados con E2 mostraban una ausencia total de fibras noradrenérgicas (Figura 4B). Dado que los trasplantes estaban reinervados por fibras originadas en el ganglio cervical superior (GCS) y considerando que la innervación simpática del iris no se vio afectada (Figuras 4C y 4D) estos resultados sugirieron que los cambios iniciados por el E2 dependen de la relación de los nervios con un efector particular y no de las características intrínsecas de las neuronas que lo inervan.

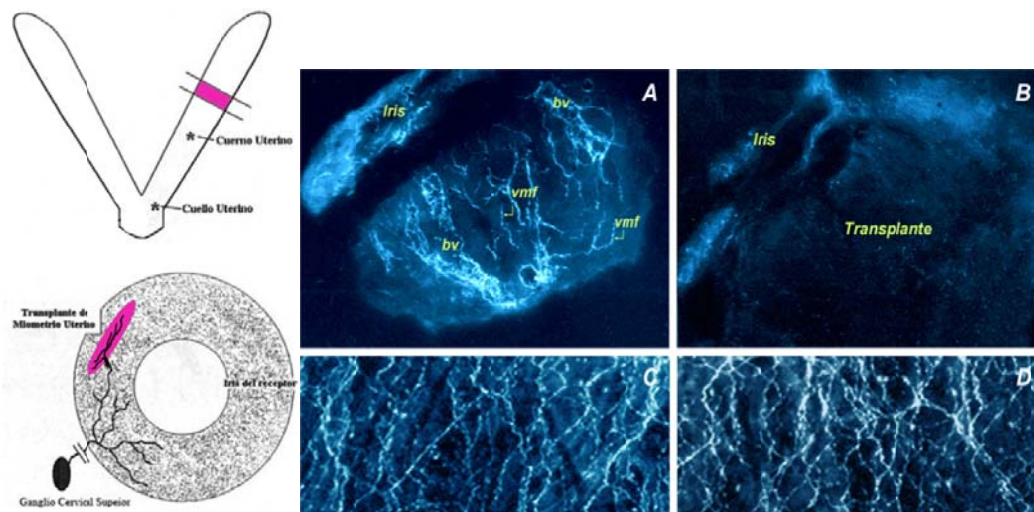


Figura 4: El esquema resume el método utilizado para transplantar fragmentos de miometrio a la cámara anterior del ojo. A la derecha se muestran imágenes de fluorescencia donde se observa la re-inervación noradrenérgica de los trasplantes de miometrio uterino en la cámara anterior del ojo. A, ilustra la innervación de un transplante tratado con vehículo, y B la innervación de un transplante tratado con estrógeno. Criocortes procesados con la técnica del ácido glioxílico. En C y D, se ilustran preparaciones de montaje total del iris de las hembras receptoras tratadas respectivamente con vehículo y estrógeno.

Estos hallazgos fueron confirmados por ensayos de co-cultivo de explantos de GCS y de miometrio (Krizsan-Agbas y col., 2002). Estos estudios mostraron que los explantos ganglionares extendían neuritas cuando eran cultivados solos en medio libre de suero, pero que el número de neuritas se duplicaba en presencia de explantos miometriales provenientes de ratas adultas castradas. Esta capacidad del miometrio de inducir neuritogénesis era abolida si los donantes recibían una inyección de E2 24hs antes de la colección de los tejidos para cultivo. La neuritogénesis que provocaba el miometrio también podía ser abolida si se agregaba E2 al medio de cultivo. Sin embargo, la presencia de estradiol en el medio no afectaba el crecimiento neurítico cuando los ganglios provenientes de ratas castradas eran cultivados en ausencia de tejido uterino. Estos resultados indican que la inhibición de la neuritogénesis provocada por el estrógeno se logra a través de cambios en el miometrio.

En su conjunto, estos resultados mostraron que el miometrio estimulado por los estrógenos es capaz de restringir su reinervación *in oculo* e inhibir la neuritogénesis *in vitro*. Estos hallazgos abrieron las puertas a numerosos estudios tendientes a identificar los mecanismos celulares y moleculares que regulan la remodelación de la inervación mediada por miometrio estrogenizado.

Señales pro- y anti-neuritogénicas producidas por el útero

Existe evidencia creciente de que el útero puede regular su inervación simpática en función de los niveles de estrógenos mediante cambios en la expresión de señales moleculares que ejercen efectos positivos o negativos sobre los nervios. En particular, numerosos estudios señalan que bajo la influencia de los estrógenos, el útero pierde su capacidad de sustentar su inervación simpática y se convierte en un terreno inhóspito para estos nervios (revisado en Brauer, 2008; Latini y col., 2008; Brauer y Smith, 2014). En esta sección se presentan los principales hallazgos que han revelado que el miometrio uterino produce diversas señales cuya expresión es afectada por los estrógenos, algunas de las cuales podrían ser capaces de alterar la inervación simpática.

1. Neurotrofinas y sus receptores neuronales

NGF y NT3. En una primera instancia se hipotetizó que la incapacidad del útero estrogenizado de sustentar su inervación podría vincularse con una disminución en la producción de factores neurotróficos con efectos positivos para los nervios simpáticos, tales como el NGF (del inglés, *Nerve Growth Factor*) o la neurotrofina-3 (NT-3). Esta hipótesis se basó en la estrecha relación observada entre la densidad de inervación simpática de los efectores periféricos y sus niveles endógenos de neurotrofinas en etapas tempranas de la vida (Korsching y Thoenen, 1983; Shelton y Reichardt, 1984). En consecuencia, varios autores postularon que los procesos de hipoinervación y neurodegeneración del adulto pudieran vincularse con una reducción del aporte neurotrófico (Gavazzi y Cowen, 1996). Varios grupos en simultáneo examinaron esta posibilidad en el modelo de plasticidad uterina iniciada por el E2 (Bjorling y col., 2002; Chavez-Genaro y col., 2002; Chalar y col., 2003; Krizsan-Agbas y col., 2003). Contrariamente a lo esperado, todos estos estudios coincidieron en que el E2 induce la síntesis de NGF y NT3, provocando que sus niveles se mantengan constantes a pesar del crecimiento que experimenta el útero en respuesta al E2.

BDNF. En 2003, el grupo de Peter Smith en EEUU, demostró que en respuesta al E2 el útero aumenta la síntesis del factor neurotrófico derivado del cerebro o BDNF (del inglés, *Brain-*

derived Neurotrophic Factor), (Krizsan-Agbas y col., 2003). El tratamiento agudo con una única dosis de E2 provoca a las 24hs, un aumento de BDNF con un perfil temporal coincidente con la degeneración de los nervios simpáticos del útero (Zoubina y col., 2001). Dado que el BDNF posee efectos inhibitorios para los nervios simpáticos (Rice y col., 1998; Kohn y col., 1999) este factor se posicionó como un candidato interesante como regulador negativo de la inervación del útero. En búsqueda del impacto funcional que pudiera tener sobre los nervios simpáticos intrauterinos el aumento de BDNF, se realizaron abordajes *in vitro* de co-cultivo de GCS con explantos de miometrio (Krizsan-Agbas y col., 2003). Como ya mencionamos, el miometrio explantado de ratas adultas castradas promueve la neuritogénesis (Krizsan-Agbas y col., 2002) y este efecto es inhibido por el E2. Los efectos supresores del crecimiento neurítico inducido por el E2 fueron parcialmente revertidos por la adición de un anticuerpo de bloqueo de función para el BDNF. Más aún, cuando los explantos de GCS fueron cultivados en presencia de miometrio proveniente de ratones mutantes heterocigotas que expresaban bajos niveles de BDNF (BDNF+/-) se observó que en ausencia de E2 el miometrio inducía una neuritogénesis similar a la provocada por el de los animales salvajes, sin embargo, el agregado de E2 era incapaz de reducir crecimiento neurítico. Estos hallazgos permitieron confirmar que la síntesis de BDNF por el efector es crítica para lograr la supresión de la neuritogénesis en respuesta al estrógeno. Sin embargo, la observación de que la neutralización del BDNF no revertía completamente sus efectos anti-neuritogénicos sugiere que otros factores difusibles derivados del efector uterino, deberían estar también involucrados.

Receptores para neurotrofinas. La regulación de la expresión de los receptores para señales producidas por los efectores es una estrategia muy utilizada durante el desarrollo y en fenómenos de plasticidad neuronal de la vida adulta (Pasterkamp, 2012). En línea con este concepto y considerando que las neuronas vinculadas al útero expresan receptores a estrógeno, no podemos olvidar que la receptividad de las neuronas a las neurotrofinas y otras señales producidas en el útero es otro potencial blanco de acción del E2.

Las neurotrofinas actúan a través de dos receptores, uno del tipo tirosina-quinasa (Trk) y otro denominado p75^{NTR}. El NGF se une a TrkA, el BDNF a TrkB y la NT-3 se une predominantemente a TrkC, aunque también puede activar menos eficientemente a los otros Trk. El receptor p75^{NTR} es capaz de unir a todas las neurotrofinas. A la promiscuidad del p75^{NTR} de unir variados ligandos se suma la posibilidad de interactuar con más de un tipo de receptor (Rodríguez-Tebar y col., 1990; 1992; Johnson, 1999; Schweigreiter, 2006).

Utilizando un trazador retrógrado que permitió reconocer las neuronas de proyección al útero en conjunto con métodos de inmunofluorescencia densitométrica, demostramos que el estrógeno regula la expresión de los receptores para el NGF en las neuronas simpáticas (Richeri y col., 2005) así como en las neuronas sensoriales (Chalar y col., 2003). Observamos que el estrógeno disminuye los niveles somáticos de TrkA exclusivamente en las neuronas simpáticas asociadas con el útero, sin afectar a otras neuronas simpáticas no relacionadas con el órgano. Estos datos muestran que las neuronas 'uterinas' son más sensibles a los cambios en los niveles de estrógeno que el resto de la población de neuronas simpáticas (Richeri y col., 2005). El efecto diferencial iniciado por el estrógeno podría deberse a diferencias en la expresión constitutiva de los receptores a estrógeno (Zoubina y Smith, 2002), o bien a efectos selectivos inducidos por la hormona en sus propios receptores, tanto en los niveles de expresión como en la localización subcelular de los mismos (Taleghany y col., 1999). Nuestros estudios sobre neuronas sensoriales también mostraron una reducción en los niveles de TrkA (Chalar y col., 2003). Otros autores ya habían reportado la influencia del estrógeno sobre las neuronas sensoriales de los GRD (Sohrabji y col., 1994).

Dado que TrkA desencadena la mayoría de las respuestas neurotróficas iniciadas por el NGF (Hempstead y col., 1991; Ibáñez y col., 1992; Orike y col., 2001; He y García, 2004), es posible pensar que la disminución de TrkA inducida por el estrógeno afecte selectivamente la receptividad de las neuronas uterinas al NGF y de esta manera contribuiría a los efectos inhibitorios y neurodegenerativos iniciado por la hormona. De manera similar, estos cambios en TrkA podrían explicar que la denervación inducida por el E2 ocurra en presencia de niveles sostenidos de NGF en el útero (Bjorling y col., 2002; Chávez-Genaro y col., 2002; Chalar y col., 2003; Krizsan-Agbas y col., 2003).

En vista de que el descenso de TrkA ocurre en ausencia de cambios en los niveles de $p75^{NTR}$ se produce una alteración en la relación $p75^{NTR}/TrkA$. Este cambio aumentaría la disponibilidad de $p75^{NTR}$, lo que podría alterar la receptividad a otras neurotrofinas, incluyendo el BDNF (Kohn y col., 1999), que aumenta en el útero en respuesta al E2 (Krizsan-Agbas y col., 2003). El BDNF ejerce acciones neurotróficas sobre distintas poblaciones neuronales del sistema nervioso central, actuando a través de $TrkB/p75^{NTR}$. Las neuronas simpáticas no expresan TrkB, y distintos estudios

han mostrado que el BDNF tiene un efecto inhibitorio sobre los nervios simpáticos, tras su interacción con p75^{NTR} (Brann y col., 1999; Kohn y col., 1999; Song y Posse de Chaves, 2003).

En su conjunto, estos resultados señalan que los fenómenos de plasticidad en la inervación uterina involucran no sólo cambios en la producción de señales por el efector, sino también cambios selectivos en la receptividad de las neuronas que lo inervan.

2. Neurotrimina

Los antecedentes presentados hasta ahora muestran evidencias de señales difusibles que son producidas por el miometrio y secretadas al microambiente que rodea a las fibras nerviosas intrauterinas. Cabe recordar, que en ese microambiente también existen señales no-difusibles, que incluyen a los componentes de la matriz extracelular; a las moléculas que se asocian a la matriz o a aquéllas que se expresan en las superficies de las células y señalizan a los axones que entran en contacto con ellas.

Entre estas últimas se encuentra la neurotrimina (Ntm). La Ntm es una proteína anclada a la membrana que participa en la adhesión celular y modula el crecimiento neurítico de diversas poblaciones neuronales. Estudios *in vitro* con neuronas hipocampales, sensoriales de GRD y simpáticas de GCS indican que la Ntm puede inhibir o promover el crecimiento, dependiendo del tipo de interacción que establece con los nervios. Así la Ntm promueve el crecimiento de las fibras hipocampales y sensoriales (que expresan Ntm) mediante interacciones homofílicas y contrariamente, inhibe el crecimiento neurítico de las fibras simpáticas que no expresan Ntm (Gil y col., 1998). Cabe destacar que la Ntm existe además como isoforma soluble, y para el caso particular de las fibras simpáticas se sabe que ambas isoformas inhiben su crecimiento (Gil y col., 1998; Krizsan-Agbas y col., 2008).

La Ntm es sintetizada por las células musculares lisas del miometrio de los roedores y su expresión es regulada por el estrógeno (Krizsan-Agbas y col., 2008). La expresión transcripcional de Ntm es fuertemente inducida a las 6hs y reprimida tan sólo a las 24hs de la administración de una única dosis de E2. La proteína presenta el mismo patrón temporal de expresión y se ha

observado que su patrón espacial coincide con algunas zonas de proyección de los nervios simpáticos dentro del útero. Asimismo, *in vivo* la Ntm aumenta selectivamente en esta zona durante la fase de dominancia estrogénica del ciclo sexual de la rata. Más aun, evidencias funcionales provenientes de ensayos en que se co-cultivaron neuronas simpáticas sobre monocapas de células miométriales transfectadas con siARN dirigido contra la Ntm, mostraron que el bloqueo de la inducción de Ntm revierte el efecto negativo sobre el crecimiento neurítico simpático que provoca el E2 agregado al medio de cultivo (Krizsan-Agbas y col., 2008).

3. Otras señales asociadas al sustrato: evidencias del criocultivo

Durante el desarrollo de esta tesis y en el marco de un proyecto FIRCA-NIH con el Prof. Keith Crutcher (*University of Cincinnati*, 2007-2010) se implementó en nuestro Laboratorio el método de criocultivo. Este método consiste en el cultivo de explantos ganglionares o neuronas aisladas sobre cortes a congelación de tejidos no fijados (en nuestro caso, miometrio). Este método nos permitió analizar la influencia del sustrato miométrial sobre el crecimiento neurítico, sin la interferencia de moléculas que son producidas de forma activa por las células vivas. Estos estudios generaron una serie de hallazgos, siendo el más relevante en el contexto de esta tesis, la observación de que el E2 modifica ciertos aspectos del sustrato uterino y reduce su capacidad de sustentar el crecimiento neurítico tanto de neuronas neonatales como adultas (ver Figuras 4, 5 y 6 en Richeri, Bianchimano y col., 2010, adjunto).

4. Nuestra visión es aún fragmentaria

A pesar de los avances que representan los estudios antes detallados, es evidente que nuestra visión de los factores involucrados en la denervación uterina sigue siendo fragmentaria. En 2008, Krizsan-Agbas y col. reportaron un análisis de microarreglos de 8800 sondas del genoma de la rata hibridado con ARN total de miometrio uterino mostrando que 306 y 505 genes eran inducidos a las 6 y 24hs luego de la administración aguda de E2 a ratas adultas castradas; y 274 y 415 genes eran reprimidos respectivamente. Si bien es probable que sólo una fracción de éstos esté vinculada a la remodelación de los nervios, los números dejan en evidencia la necesidad de seguir caracterizando las moléculas involucradas en un proceso de tanta importancia biológica como lo es la denervación uterina.

En este contexto, se desarrolló la presente tesis de doctorado cuyo cometido fue continuar la caracterización de las señales que participan en este modelo de neurodegeneración regulada inducida por el estrógeno. En este marco, surge nuestro interés por las semaforinas, una familia de proteínas altamente conservada evolutivamente y que constituyen una de las señales negativas mejor caracterizadas, tanto en el desarrollo como en la vida adulta (Pasterkamp, 2012).

5. ¿Por qué las Semaforinas?

Algunas de las evidencias que nos llevaron a estudiar la participación de las semaforinas en la remodelación de los nervios uterinos por el estrógeno fueron:

(a) Varios miembros de la familia de las semaforinas y sus receptores neuronales continúan siendo expresados en la vida adulta, regulando fenómenos de plasticidad que ocurren en condiciones fisiológicas y patológicas (Harel y Strittmatter, 2006; Niclou y col., 2006; Mann y col., 2007; Pasterkamp, 2012; Kamo y col., 2013; Vo y col., 2013).

(b) Algunos miembros secretados de la familia de las semaforinas han mostrado ser repulsivos para los nervios simpáticos (Chen y col., 1998; Renzi y col., 1999; Kawasaki y col., 2002; Miller y col., 2004; Taniguchi y col., 2005; Damon, 2006; Fassold y col., 2009; Ieda y Fukuda, 2009).

(c) Existen evidencias de expresión de receptores para semaforinas en neuronas simpáticas embrionarias, neonatales y adultas, así como en neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal (Chen y col., 1997; 1998; Reza y col., 1999; Gavazzi y col., 2000; Marko y Damon, 2008; Nangle y Keast, 2011).

(d) Algunas semaforinas son capaces de antagonizar los efectos promotores de crecimiento neurítico iniciados por el NGF (Atwal y col., 2003; Quach y col., 2004; Tang y col., 2004; Ben-Zevi y col., 2007).

(e) Las semaforinas son capaces de repeler de su campo de inervación a los axones maduros y completamente establecidos y evitan su regeneración luego de lesiones o durante la cicatrización (Tanelian y col. 1997; De Winter y col., 2002; Kaneko y col., 2006).

(f) Los genes que codifican para algunas semaforinas presentan sitios de respuesta al estrógeno (Análisis Bioinformático con el programa Genomatrix-MatInspector, Richeri y Chalar 2009), habiéndose observado además, que el estrógeno modula la expresión de genes involucrados en sus vías de señalización en ciertas líneas celulares ováricas y de cáncer de mama (Chang y col., 2006; Joseph y col., 2010).

(g) Los datos publicados acerca de regulación de expresión de semaforinas y/o de sus receptores neuronales por las hormonas sexuales son escasos, existiendo hasta la fecha sólo dos trabajos que abordan este problema y lo han hecho en distintos contextos hormonales y en diferentes especies, ratón y humano.

* En el ratón, se ha reportado que el estradiol y el tamoxifeno regulan la expresión de la semaforina 3F en el útero (Fong y col., 2007).

* Un trabajo evidenció la presencia de la semaforina 3A en el miometrio del útero humano, así como en la placenta y en el cordón umbilical en la gestación a término (Marzoni y col., 2004). Estos autores demostraron también que los niveles de semaforina 3A varían durante el curso de la gestación.

Tomados en su conjunto, los antecedentes presentados posicionan a las semaforinas como candidatos interesantes con relación a la inhibición de los nervios uterinos en respuesta al estrógeno. En este marco en el presente trabajo de tesis evaluamos: (i) si las semaforinas son expresadas por el útero de la rata; (ii) cuál o cuáles miembros están representados; (iii) si la expresión de estas semaforinas es regulada por el estrógeno; y (iv) si los nervios uterinos expresan receptores para semaforinas y si su expresión es regulada por el estrógeno.

Antes de describir los métodos utilizados y los resultados obtenidos presentaremos los datos más relevantes de la familia de las semaforinas, incluyendo sus acciones durante el desarrollo y la vida

adultas; las características de sus receptores neuronales y los mecanismos que transforman la interacción entre las semaforinas y sus receptores en cambios en el comportamiento de los axones.

SEMAFORINAS: señales negativas que se expresan en las vías de crecimiento de los axones

Etimológicamente la palabra semáforo significa "portador de señal" (del griego *sema*= señal y *phoros*= "que lleva").

Estas proteínas se expresan en los microambientes axonales. En general, los axones que poseen receptores específicos para sensar semaforinas son excluidos de los territorios donde éstas se expresan. Por esta razón, las semaforinas son consideradas como señales negativas (**RECUADRO 1**) que contribuyen a la selección y correcta inervación de los efectores. En términos generales, la exclusión mencionada puede ser el resultado de procesos de inhibición/retracción; "poda" (*pruning*) o repulsión de los axones de regiones inapropiadas.

Ha sido demostrado que los axones evitan activamente ciertas células/tejidos, realizando desvíos tortuosos en sus alrededores (**Figuras 5A y B**) (**Ebendal, 1982; Peterson y Craig, 1982**). Además, estas respuestas de los axones dependen de la viabilidad de las células que evitan, dado que las mismas son abolidas por calor (**Figura 5C**). Se destaca el hecho de que los axones crecen sobre ciertos sustratos no debido a la "atracción" que éstos generan, sino porque evitan otros (**Walter y col., 1987**).

Las semaforinas ejercen efectos negativos sobre los nervios por repulsión. Las que están asociadas a membranas celulares (ver más adelante, p.25) inducen un efecto que depende del contacto (repulsión por contacto), mientras que las secretadas generan quimiorrepulsión (**Tessier-Lavigne y Goodman, 1996; Hung y Terman, 2011**).

Con el fin de caracterizar los mecanismos que subyacían a los efectos inhibitorios/repulsivos, Raper y otros autores (1990s) registraron neuronas que crecían en cultivo sobre un sustrato uniforme, utilizando video-microscopía. En estas condiciones, advirtieron que las neuronas extienden neuritas cuyos conos de crecimiento navegan a una velocidad relativamente constante, experimentando en muy pocas ocasiones retracciones espontáneas. Pero observaron que cuando distintos tipos de neuronas entraban en contacto, sus conos reducían rápidamente su tamaño y perdían el contacto (**Figura 5D**). Raper y cols., denominaron a este fenómeno "colapso del cono de crecimiento" y evidenciaron además, que en el transcurso de una hora el cono colapsado era

RECUADRO 2. Señales positivas y negativas.

Originalmente las señales extracelulares fueron clasificadas en función de la respuesta que generan en la motilidad celular en dos grupos. Son señales positivas, aquellas que atraen a las células o constituyen señales permisivas/de adhesión que promueven la motilidad celular. Mientras que las señales negativas inhiben la migración celular o bien repelen a las células de regiones inapropiadas (revisado en [Hung y Terman, 2011](#)).

Estos dos grandes conceptos de señales positivas y negativas, engloban los conceptos de señales atractivas y repulsivas que fueron introducidos en el siglo XIX por Theodor Engelmann y Wilhelm Pfeffer, quienes junto con otros autores observaron que las sustancias químicas provocan distintos efectos sobre la motilidad de los procesos celulares de fuente diversa, tales como bacterias, flagelados, y leucocitos. Así fueron denominadas como atractivas, aquellas sustancias que desencadenan movimientos hacia las mismas, y por el contrario, se le adjudicó el término repulsivas a las sustancias químicas que provocan movimientos en la dirección opuesta. Dentro del repertorio de respuestas atractivas se introdujo, a su vez, el término quimiotaxis, refiriéndose a cuando el químico promueve un movimiento direccionado de un determinado organismo o célula, y quimiotropismo, cuando solamente una parte del organismo o célula es la que se re-orienta en respuesta al estímulo. Basado en esto, Santiago Ramón y Cajal propuso la Hipótesis quimiotáctica (Neurotrópica) para explicar el modo en que una célula nerviosa se desarrolla, desplaza su cuerpo celular y sus prolongaciones (dendritas y axón) y establece contactos (Cajal, 1893, 1899 revisado en [Hung y Terman, 2011](#)).

El direccionamiento de los axones está dictado por el microambiente que los rodea. Este microambiente que atraviesan los conos de crecimiento axónicos en su rumbo hacia los efectores va a estar definido por señales positivas y negativas. Los conos de crecimiento están capacitados para detectarlas, poseen receptores específicos que les permiten la formación de contactos transitorios con las señales del ambiente. Si entra en contacto con una superficie poco favorable, el axón se retrae, mientras que si entra en contacto con una superficie más favorable se mantiene estirado, orientando la extensión de todo el cono en esa dirección. De esta forma el cono de crecimiento puede ser guiado mediante sutiles variaciones de las propiedades del entorno por el que se desplaza.

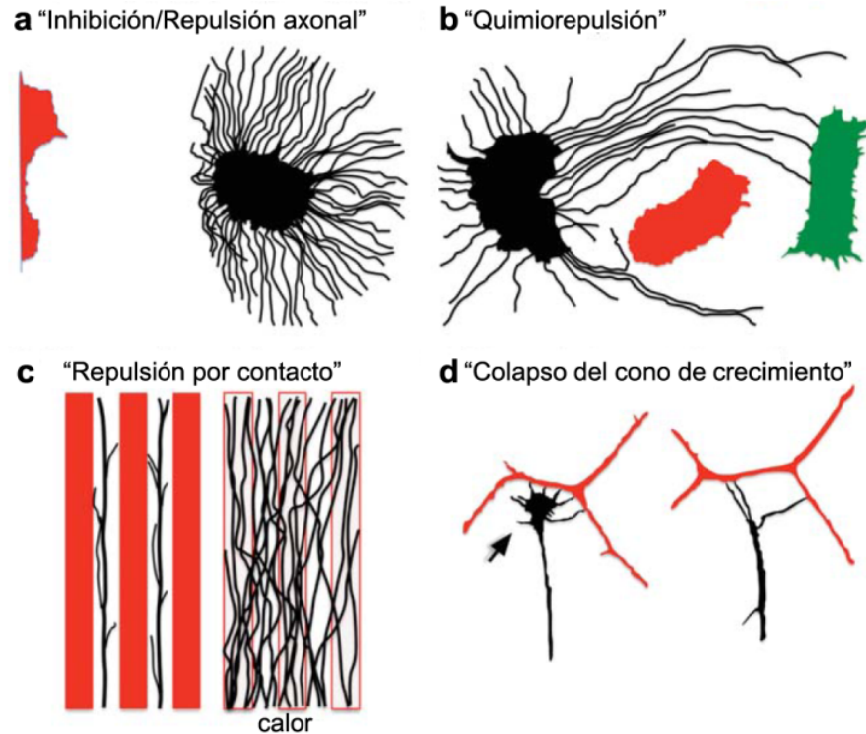


Figura 5: Esquema que ilustra ejemplos del impacto neuronal que generan las señales negativas del ambiente y los términos utilizados para describirlos (a) Inhibición/repulsión del crecimiento neurítico (negro) que experimentan las neuronas al ser co-cultivadas en presencia (pero no en contacto) de un explanto tisular (rojo); (b) crecimiento tortuoso de axones (negro) lejos de (rojo) o hacia (verde) diferentes explantos de tejidos; (c) axones (negro) que evitan sustratos (rojo), un fenómeno que es abolido por calor y revela que los axones crecen sobre ciertos sustratos no debido a la “atracción” que estos generan, sino porque evitan otros; y (d) un cono de crecimiento (negro) colapsa/se retrae al contactar un axón de otra subpoblación neuronal (roja). Tomado de Hung y Terman, 2011.

capaz de recuperar su morfología y motilidad originales. Sin embargo, notaron también que si los conos continuaban avanzando dentro de esta región de fibras “no pares” el mismo repetía múltiples veces el ciclo colapso/retracción/recuperación/extensión. Estos hallazgos llevaron a postular que existen señales químicas que afectan negativamente la elongación de los axones incluso cuando éstos se encuentran en microambientes que son permisivos para el crecimiento neurítico (ej. [Kapfhammer y Raper, 1987](#) revisado en [Hung y Terman, 2011](#)).

Los estudios tendientes a caracterizar la naturaleza molecular de estas señales químicas llevaron a Raper y cols., al descubrimiento de dos hechos fundamentales. En primer lugar, revelaron que el colapso del cono de crecimiento podía ser causado tanto por moléculas asociadas a la membrana celular como por fracciones solubles. En segundo lugar, determinaron que el colapso era causado por proteínas, y lograron identificar a una proteína extracelular específica que bautizaron con el

nombre de COLAPSINA. Esta afectaba negativamente a la motilidad y morfología celular siendo capaz de provocar de manera rápida y transitoria el colapso de conos de crecimiento de axones sensoriales (Fan y col., 1993; Luo y col., 1993).

Sorprendentemente, la Colapsina mostró una alta similitud de secuencia con una proteína transmembrana que había sido identificada un año antes, por Alex Kolodkin, Corey Goodman y otros autores en la extremidad del saltamontes donde ejercía efectos sobre el guiado axonal y había sido denominada Fasciculina IV, debido a que promovía la fasciculación de ciertas subpoblaciones axonales en la extremidad del ortóptero (Kolodkin y col., 1992).

Actualmente, se postula que ambas proteínas la Fasciculina IV (Sema-1a) y colapsina (Sema3A) fueron los miembros fundadores de la familia de las semaforinas, la cual representa una de las principales familias de proteínas inhibitorias/repulsivas para los nervios conocidas hasta la fecha (Kolodkin y col., 1993; Kolodkin, 1998; Luo y col., 1995; Yazdani y Terman, 2006).

Familia de las semaforinas

Actualmente, las semaforinas constituyen una familia extensa de proteínas que poseen una estructura primaria muy conservada y se expresan en diversas clases de animales vertebrados e invertebrados, como en los insectos, las aves, los roedores y los humanos. Todos los miembros de la familia de las semaforinas presentan un dominio extracelular de aproximadamente 500 aminoácidos, que se denomina dominio SEMA. Este dominio es necesario y suficiente, cuando está dimerizado, para promover los efectos biológicos de las semaforinas (Koppel y col. 1997).

A la fecha se conocen veintisiete semaforinas distintas (Pasterkamp, 2012), las cuales han sido clasificadas basándose en sus características estructurales y filogenéticas en 8 clases (Figura 6). Las clases 1 y 2 incluyen a semaforinas descritas solamente en invertebrados (Sema-1 y Sema-2). Los miembros de las clases 3 a la 7 pertenecen a los vertebrados. Las de la clase 8 codifican semaforinas virales (Semaphorin Nomenclature Committee, 1999).

Dentro de la familia de las semaforinas, hay miembros que son proteínas secretadas (clases 2 y 3), otros que se encuentran anclados a la membrana por glicosilfosfatidilinositol (*GPI*; del inglés, Glycosylphosphatidylinositol), (clase 7) y otros que son proteínas transmembrana (clases 1, 4, 5 y 6).

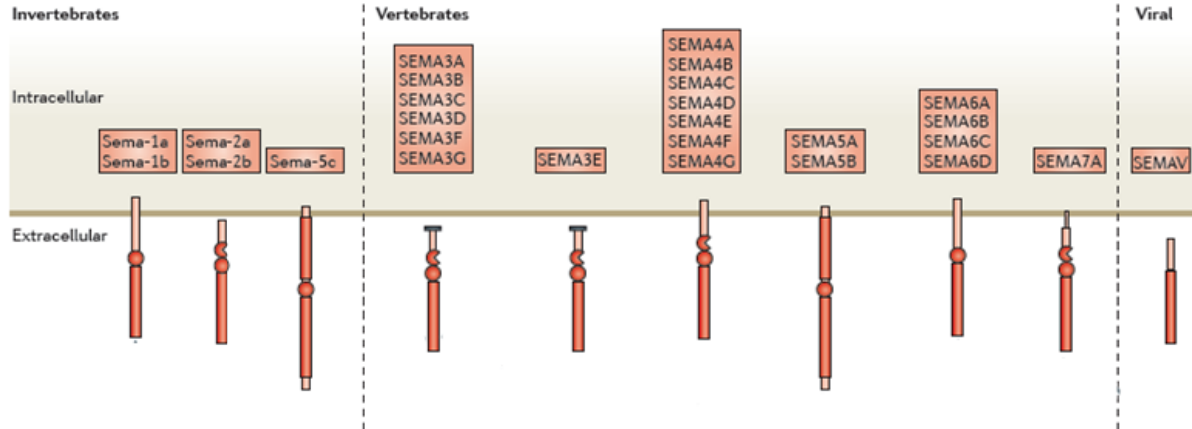


Figura 6. Familia de las semaforinas. Veintisiete semaforinas han sido identificadas hasta la fecha. Cada una de estas proteínas ha sido categorizada en una de las ocho clases, según sus propiedades estructurales y filogénicas. Existen semaforinas secretadas (SEMA2s, SEMA3s Y SEMAV), transmembranosas (SEMA1s, SEMA4s, SEMA5s Y SEMA6s) o ancladas a la membrana por un grupo GPI (SEMA7A). Las semaforinas de los invertebrados, son las SEMA-1as y Sema-2as, junto con Sema-5c. Mientras que SEMAV se encuentra en los genomas de ciertos virus ADN no neurotróficos. Las otras clases restantes pertenecen a los vertebrados. Al menos 15 miembros distintos de esta familia de genes han sido identificados en roedores. Tomado de Pasterkamp, 2012.

La funcionalidad de las semaforinas ha sido mayormente caracterizada en el sistema nervioso debido a que fue allí donde se descubrieron, aunque estudios posteriores demostraron que estas proteínas están involucradas en diversos procesos fuera del sistema nervioso, incluyendo la angiogénesis y la inmunidad (revisado en Yazdani y Turman, 2006).

Papel de las semaforinas en el sistema nervioso

1. En el desarrollo

Tras su descubrimiento, las semaforinas fueron esencialmente caracterizadas durante el desarrollo del sistema nervioso debido a que se expresan, como ya mencionamos, en las vías de crecimiento de los axones de diversas poblaciones neuronales (revisado en Hung y Terman, 2011).

Las evidencias acerca de los efectos negativos en los que participan las semaforinas, provienen de estudios *in vitro* que fueron realizados durante el siglo XX. Cabe destacar, que estas observaciones fueron posteriormente confirmadas por estudios más contemporáneos con animales transgénicos. Los mutantes para las semaforinas o sus receptores neuronales presentan

defectos de fasciculación y proyecciones neurales hacia zonas inapropiadas (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996; Kolodkin y Ginty 1997; Mark y col., 1997; Fujisawa y Kitsukawa, 1998; Mueller, 1999; Cloutier y col., 2002; Goshima y col., 2002; Grunwald y Klein, 2002; Steinbach y col., 2002; Pasterkamp y Kolodkin, 2003; Tang, 2003; Cariboni y col., 2007; Degano y col., 2009).

Hoy se sabe que las semaforinas están implicadas en la determinación de la polaridad neuronal, el guiado axónico, la fasciculación y ramificación de los axones, así como también en la migración neuronal, la formación de las sinapsis y el *pruning* o “poda” de fibras nerviosas (RECUADRO 2) (Fujisawa, 2004). Así, estas señales modulan el desarrollo del sistema nervioso participando en la formación de la corteza cerebral, el hipocampo, el bulbo olfatorio, el sistema visual, el cerebelo y la médula espinal; asegurando también el establecimiento del sistema nervioso periférico (Pasterkamp y Kolodkin, 2003; Roth y col., 2009).

A modo de ejemplo, cabe mencionar, que los axones de las neuronas sensoriales de los GRD son repelidos por varias semaforinas. Durante el desarrollo, se define una región repulsiva para estos axones incipientes por la expresión de semaforinas en los alrededores de las neuronas sensoriales. La expresión de Sema3A en el asta ventral de la médula es la responsable de prevenir la entrada de las fibras propioceptivas a esta región (Messersmith y col., 1995).

Los tejidos no-neurales, como las extremidades de los embriones, también expresan semaforinas con el fin de guiar a los axones de las motoneuronas hacia sus efectores finales y contribuir a su segregación dorso-ventral. Sema3A posee un papel esencial en este proceso, controlando la fasciculación y la migración celular (Raper y Mason, 2010).

Las neuronas simpáticas derivadas de la cresta neural migran durante el desarrollo, hacia *loci* específicos donde se acumulan formando estructuras denominadas ganglios. En los animales *knock out* para Sema3A o neuropilina-1 (NRP1, uno de los receptores de Sema3A), las neuronas simpáticas aparecen desplazadas lo que sugiere que Sema3A actúa como una señal de detención que asegura la compactación celular/gangliogénesis (Kawasaki y col., 2002).

2. En la vida adulta

Se ha demostrado que las semaforinas afectan la estructura y el funcionamiento del sistema nervioso durante toda la vida, jugando un papel clave en la plasticidad y la regeneración (Reza y col., 1999; Owesson y col., 2000; Gavazzi, 2001; Giordano y col., 2001; Goshima y col.,

2002; Niclou y col., 2006; Pasterkamp y Verhaagen, 2006; Mann y col., 2007; Pasterkamp y Giger, 2009; Pasterkamp, 2012; Vo y col., 2013).

Sema3A y Sema3F han sido implicadas en el guiado de los axones olfatorios primarios que surgen de las neuronas neo-formadas en el neuroepitelio olfatorio durante toda la vida del individuo (Pasterkamp y col., 1998b; Degano y col., 2009). De manera similar, existen evidencias de que las semaforinas estarían involucradas en limitar la regeneración de las neuronas del sistema nervioso central y periférico (Gavazzi, 2001; Kaneko y col., 2006; Pasterkamp y Verhaagen, 2006; Wanigasekara y Keast, 2006; Nangle y Keast, 2011). Asimismo, existen evidencias de que las semaforinas regularían la fisiología sináptica y la excitabilidad de las neuronas del hipocampo maduro y que también estarían implicadas en ciertas patologías del humano, tales como la esquizofrenia, la enfermedad de Alzheimer y la degeneración de las motoneuronas (revisado en Mann y col., 2007; Pasterkamp y Giger, 2009). Por esta razón en la última década las semaforinas han sido foco de atención de numerosas investigaciones como blancos terapéuticos.

En suma, la visión actual indica que las semaforinas que participan en el desarrollo son re-utilizadas en la vida adulta (Pasterkamp, 2012). Durante el transcurso del presente trabajo de doctorado hemos revisado un creciente número de evidencias que indican que esto aplica también para el sistema nervioso autónomo (revisado en Brauer y Richeri, 2013; adjunto).

RECUADRO 2. *PRUNING*: un mecanismo celular que subyace al guiado de los axones hacia sus blancos de inervación.

En el sistema nervioso de los mamíferos, las neuronas establecen contactos con múltiples efectores celulares. Cada neurona contacta en promedio más de 100 efectores potenciales de establecer sinapsis. El patrón de conexiones se reproduce de un animal a otro y se establece durante el desarrollo embrionario, siguiendo una serie de 5 etapas que implican eventos progresivos y regresivos (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996). Inicialmente cada neurona emite un único axón incipiente, cuyo cono de crecimiento es guiado a un efector preliminar. Para poder conectarse con múltiples efectores, es necesario que ese axón incipiente se ramifique y sea guiado hacia los otros efectores. Varias de estas proyecciones son transitorias y son posteriormente “podadas” (*pruning*) de un modo estereotipado con el fin de dejar a cada neurona conectada sólo a una fracción del efector que había inervado inicialmente. A su vez, dentro de cada región efectora, se da una subsecuente ramificación (arborización terminal) y retracción que culmina remodelando el patrón final de contactos sinápticos. La muerte celular programada que experimentan al mismo tiempo, entresaca varias de estas neuronas colaborando en el establecimiento del número final de neuronas en cada población neuronal.

Los mecanismos que median 4 de estos 5 eventos se conocen con bastante detalle. Los dos primeros, guiado del cono de crecimiento y ramificación, están controlados por señales - positivas y negativas. Los otros dos mecanismos, la arborización terminal y la muerte celular, son moduladas por moléculas específicas, incluyendo a las neurotrofinas. En contraste, poco se sabe de los mecanismos que median el quinto evento, el *pruning* de proyecciones en efectores temporarios. Cabe destacar un aspecto mecanístico crítico, y es la distinción de que las respuestas de *pruning* axonal no se deben a una falta de adhesión del cono de crecimiento –fenómeno que ocurriría cuando los axones encuentran un sustrato que es simplemente no-permisivo para elongación (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996).

A pesar de lo común que es este tipo de evento, el *pruning* de las ramificaciones es difícil de detectar experimentalmente lo que explicaría en parte el desconocimiento que existe. Existen dos posibilidades acerca del control del *pruning*: las neuronas que lo experimentan podrían estar totalmente pre-programadas para hacerlo, o alternativamente el *pruning* de sus proyecciones podría estar desencadenando por señales extrínsecas que actúan sobre estas. En este sentido, resultados de estudios más contemporáneos indican que los procesos de *pruning*, están mediados, en algunos casos, por eventos de retracción y de hecho, ha sido demostrado que las semaforinas están implicadas y serían las señales inductoras de la retracción (Bagri y col., 2003; Liu y col., 2005).

En lo que respecta al sistema nervioso autónomo adulto, se ha visto que Sema3F puede ser inducida en ciertos tejidos periféricos bajo condiciones patológicas, por ejemplo, en el tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoidea, provocando la pérdida de su inervación simpática (Fassold y col. 2009). Dado que el sistema nervioso simpático posee a largo plazo un rol anti-inflamatorio, ha sido postulado que la ausencia de fibras simpáticas de regiones inflamadas representaría un mecanismo conservado en la evolución que permite el curso de una respuesta inmune/inflamatoria adecuada, la cual sería prevenida si los nervios simpáticos estuvieran presentes (Straub y Besedovsky, 2003). Si bien esta estrategia del organismo de eliminar el input simpático de las áreas inflamadas ha sido descrita hace tiempo, los responsables moleculares de la eliminación de las fibras en enfermedades inflamatorias crónicas han sido recientemente comenzados a ser explorados. Cabe destacar en este sentido, el hallazgo del grupo de Straub como un ejemplo de re-utilización de las semaforinas en el organismo adulto, para lograr una repulsión intencional de las fibras nerviosas simpáticas (Fassold y col., 2009).

Otro caso que vincula a las semaforinas con la densidad de inervación, en este caso sensorial, es la hiperinervación que se observa en la epidermis en relación con el prurito (Kamo y col., 2013). Las evidencias indican que esta hiperinervación es controlada por moléculas de guiado axonal, tales como el NGF y la Sema3A que son producidas por los queratinocitos. La neurotropina (NTP) es una sustancia usada en la clínica para aliviar el prurito y también el dolor. El trabajo de Kamo demostró una inducción de Sema3A en respuesta al tratamiento con NTP. Estos autores habían demostrado en un trabajo previo que, *in vitro* la NTP inhibía el crecimiento neurítico de explantos de GRD. En este estudio evaluaron *in vivo*, en un modelo de roedores, si la NTP afecta la densidad de fibras nerviosas intraepidérmicas, y demostraron que en efecto la disminuye al mismo tiempo que aumenta los niveles de ARNm de Sema3A sin cambiar los de NGF. En suma, estos autores demostraron que la NTP, utilizada para tratar el prurito en humanos, provoca un aumento de Sema3A y una concomitante disminución de la densidad de inervación sensorial.

Receptores para semaforinas

En las neuronas, las señales desencadenadas por las semaforinas son mayormente mediadas por 2 tipos de receptores: las plexinas y las neuropilinas (Fujisawa y col., 1997; He y Tessier-Lavigne, 1997; Takahashi y col., 1998; 1999; Tamagnone y col., 1999; Fujisawa, 2004; Pasterkamp, 2012).

Neuropilinas (NRPs)

Las NRPs son receptores de las semaforinas secretadas del grupo 3 (Sema3s). Son glicoproteínas integrales de membrana unipaso; poseen un dominio extracelular grande (840 aminoácidos, (Aa) aprox.) que contiene a los subdominios A, B y C; un dominio transmembrana corto (25 Aa aprox.) y una región citoplasmática de aproximadamente 40 Aa (revisado en Fujisawa y col., 1997). Existen dos tipos de neuropilinas, la NRP1 y la NRP2.

NRP1. Este receptor fue identificado en embriones de *Xenopus* (Takagi y col., 1987), como una proteína de superficie que se expresaba en subpoblaciones específicas de axones del sistema nervioso de la larva (Takagi y col., 1991). Este receptor fue posteriormente bautizado con el nombre de neuropilina, haciendo referencia a que su expresión estaba confinada a los neuropilos de regiones particulares del sistema nervioso (Fujisawa y col., 1995). El subsecuente aislamiento de secuencias codificantes homólogas en el pollo (Takagi y col., 1995) y el ratón (Kawakami y col., 1996), demostró que la estructura primaria de la neuropilina está muy conservada entre los vertebrados. NRP1 es el receptor de unión específico de Sema3A (Chen y col., 1997; Feiner y col., 1997). De hecho, ha sido evidenciado que la NRP1 se expresa en todas las neuronas sensibles a Sema3A y que los anticuerpos dirigidos contra el dominio extracelular de NRP1 bloquean los efectos que esta señal desencadena *in vitro*, como el colapso del cono y la quimiorrepulsión (Takagi y col., 1995; He y Tessier-Lavigne, 1997; Kolodkin y col., 1997). Cabe destacar además que NRP1 no interactúa con ningún otro tipo de semaforinas.

Los sitios de expresión de NRP1 fueron estudiados en detalle mediante abordajes inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ* en *Xenopus* (Takagi y col., 1987; 1991; Fujisawa y col., 1989), en pollo (Takagi y col., 1995) y en ratón (Kitsukawa y col., 1995; Kawakami y col., 1996). En todas las especies examinadas, la NRP1 se restringe a poblaciones particulares de neuronas y se expresa durante la etapa activa del crecimiento axónico. Así, fue postulado que la NRP1 estaría participando en el crecimiento o guiado de los axones. Esta posibilidad fue confirmada por estudios con ratones mutantes, en los que se observó que la falta de expresión del gen de NRP1 provocaba defectos en la fasciculación axonal así como en las ramificaciones (Kitsukawa y col., 1995; Fujisawa y col., 1997). Cabe destacar que si bien NRP1 se expresa principalmente en las neuronas, también se observó expresión en células no-neurales, tales como células endoteliales y algunas células mesenquimales (Kitsukawa y col., 1995).

Respecto al patrón temporal, la expresión de NRP1 en el sistema nervioso está estrictamente regulada. En el ratón, su expresión está confinada a las etapas del desarrollo embrionario y el período neonatal; comienza junto con la diferenciación neuronal, persiste durante la etapa de crecimiento axonal y luego disminuye en concordancia con la culminación del establecimiento de los conexiones del sistema nervioso. Sin embargo, existen excepciones a la regla. Por ejemplo, en los murinos los nervios olfatorios expresan NRP1 durante toda la vida (Kawakami y col., 1996). Finalmente, quizás la evidencia más clara que apoya el rol de NRP1 en el crecimiento axonal sea la respuesta a la lesión que experimenta el nervio óptico de *Xenopus*. Altos niveles de NRP1 se observan en el nervio óptico del embrión, pero la expresión se vuelve casi nula en el renacuajo, luego del estadio 50. Sin embargo, la lesión de los nervios ópticos en esta etapa y la consiguiente promoción del estado regenerativo provoca que la expresión de la NRP1 re-aparezca en el nervio regenerante (Kujisawa y col., 1997).

NRP2. Un par de años más tarde del descubrimiento de NRP1, un gen relacionado fue identificado en el genoma humano. Por esta razón, se le asignó el número 1, a la neuropilina encontrada originalmente, y el producto del gen relacionado fue denominado, neuropilina-2. Esta nueva proteína, NRP2 fue identificada independientemente por dos grupos de investigadores, el grupo de Tessier-Lavigne (Chen y col., 1997) y el de Ginty (Kolodkin y col., 1997). Sus dominios estructurales son muy similares a los de la NRP1, de hecho es una proteína con alta homología (44% de secuencia idéntica).

NRP2 se expresa en el sistema nervioso durante el desarrollo pero con un patrón distinto al de la NRP1 (Kawakami y col., 1995; Chen y col., 1997; Kolodkin y col., 1997). Por ejemplo, las neuronas del GRD de embriones de rata (E14), que expresan altos niveles de NRP1, no expresan NRP2.

NRP2 no une a Sema3A; pero se une con alta afinidad a Sema3F ($k_d = 0,1nM$) (Chen y col., 1997; Feiner y col., 1997) y existe consenso de que NRP2 es el receptor de unión de esta semaforina. La vía Sema3F/NRP2 media selectivamente los efectos repulsivos y retracción en poblaciones neuronales específicas (Fujisawa y col., 1997; Kolodkin y col., 1997; 1998; Takahashi y col., 1998; 1999; Giger y col., 1998; 2000; Bagri y Tessier-Lavigne, 2002; Fujisawa, 2004; Taniguchi y col., 2005).

Los patrones de expresión de NRP2 y Sema3F son llamativamente complementarios durante el desarrollo del sistema nervioso simpático y de hecho, ha sido postulado un modelo que involucra a la vía Sema3F/NRP2 en el control del crecimiento de los axones de las neuronas simpáticas postganglionares así como también de otras poblaciones neuronales que expresan NRP2 en el sistema nervioso central (Chen y col., 1998; 2000; Atwal y col., 2003; Bagri y col., 2003; Taniguchi y cols., 2005).

En la vida adulta ha sido reportado que la vía inhibitoria de Sema3F/NRP2 es re-utilizada en condiciones patológicas; por ejemplo, provocando la pérdida de fibras simpáticas de lesiones inflamatorias. En los pacientes con artritis las terminales simpáticas del tejido sinovial que expresan NRP2 desaparecen por acción de Sema3F apenas comienza la inflamación (Fassold y cols., 2009).

De acuerdo con la literatura, la interacción de las semaforinas con las NRPs no es capaz de transducir señalización. Las NRPs son las encargadas de la unión específica del ligando dentro del complejo de señalización donde interactúan con proteínas adicionales activando las vías de transducción de las Sema3s a nivel intracelular. Las NRPs forman complejos con las plexinas (Figura 7; RECUADRO 3) que son proteínas transmembrana que actúan como sustratos de quinasas, y así transducen la señal tras la unión de la semaforina (Nakamura y col., 2000; Tamagnone y col., 2000). Entre ellas se encuentran las plexinas del grupo A (RECUADRO 3) (Takahashi y col. 1999; Tamagnone y col. 1999; Rohm y col. 2000; Fujisawa, 2004).

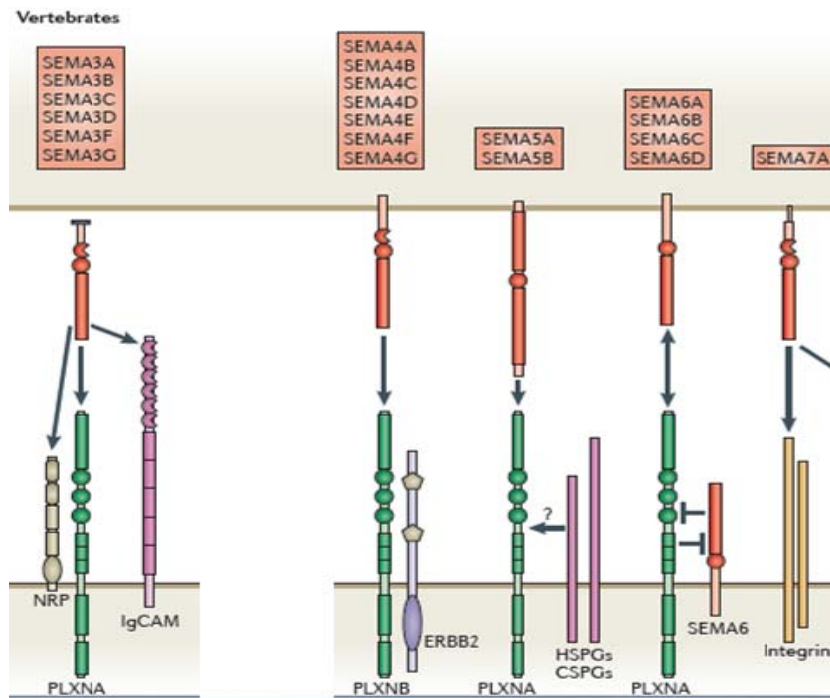


Figura 7. Receptores de las semaforinas. En las neuronas, la mayoría de las semaforinas señalizan a través de las **plexinas** (PLXN). En los vertebrados, las SEMA3s, SEMA5s y SEMA6s lo hacen a través del tipo A (PLXNA). Sin embargo, las semaforinas secretadas (SEMA3s) necesitan un receptor adicional que media su unión, que es la **neuropilina** (NRP). Ha sido sugerido que algunas Sema3s podrían señalizar, independientemente de las plexinas, a través de moléculas de adhesión celular de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgCAMs). Por otra parte las SEMA4s se unen y señalizan a través de plexinas del tipo B (PLXN B). Los proteoglicanos modulan la señalización de las SEMA5s a través de un receptor de señalización aún no identificado. Más aún, se ha visto que algunas semaforinas transmembrana de la clase 6, SEMA6s funcionan a la vez como ligando y como receptor. SEMA7A, anclada a la membrana por GPI, une a integrinas neuronales como receptor para promover el crecimiento axónico y a la PLXC1 para afectar el sistema inmune. Las SEMA6s y las PLXAs pueden interferir negativamente entre ellas a través de interacciones inhibitorias en *cis*. *HSPGs*, Proteoglicanos a heparan sulfato. *CSPGs*, Proteoglicanos a condroitin sulfato. Tomado de Pasterkamp, 2012.

Actualmente se sabe que los receptores de las semaforinas forman diferentes tipos de complejos de señalización en la membrana plasmática. La identificación de nuevos componentes que integran estos complejos ha tenido un avance notorio en los últimos años. Numerosos componentes han sido caracterizados en distintos modelos como los receptores del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF, del inglés Vascular Endothelial Growth Factor) (VEGFR1 y VEGFR2) (Bagnard y col., 2001; Soker y col., 2002); las moléculas de adhesión L1 (Castellani y col., 2000) así como otros receptores como *Ron*, *Met* y *OTK* (Winberg y col., 2001; Giordano y col., 2002; Castellani y Rougon, 2002).

La continua caracterización de nuevos componentes y la implicancia de diversas clases de efectores intracelulares, reflejan la gran complejidad de los procesos de señalización de las semaforinas, lo cual explicaría la diversidad de funciones que hoy se conocen de estas moléculas. Además, estudios recientes apenas han comenzado a aportar a la comprensión de cómo se regula la expresión y función de los componentes conocidos (Pasterkamp, 2012). La regulación de la expresión de los receptores y mediadores intracelulares es donde radica el control no sólo de la diversidad de respuestas que generan las semaforinas sino también el control espacio-temporal de su acción.

RECUADRO 3. PLEXINAS

La mayoría de las semaforinas señalizan a través de las **plexinas** (PLXN, en vertebrados o Plex en invertebrados). La familia de las PLXNs es muy conservada, se conocen nueve tipos, los cuales han sido clasificados de acuerdo con sus características estructurales en cuatro grupos (A-D) (Tamagnone y col., 1999; Puschel, 2002).

Las SEMA3s, SEMA5s Y SEMA6s señalizan a través de PLXN del tipo A (PLXN As). Sin embargo, las semaforinas secretadas (SEMA3s), a excepción de Sema3E, necesitan un receptor adicional que media su unión, que es la **neuropilina** (Figura 7).

Por ejemplo, las acciones de Sema3A y Sema3F son mediadas por complejos de señalización que incluyen a NRPs y PLXNs del grupo A (Takahashi y col., 1999). Estudios con ratones mutantes deficientes en NRP1 y Sema3A, han mostrado que éstos presentan fenotipos similares mostrando deficiencias en el sistema nervioso periférico (Kitsukawa y col., 1997; Taniguchi y col. 1997). De manera similar, los ratones K.O. para NRP2 poseen proyecciones sensoriales defectuosas (Giger y col., 2000). Yaron y col. (2005) mostraron que las neuronas simpáticas y sensoriales provenientes de animales dobles transgénicos para PLXNs A3 y A4, son insensibles a Sema3A y Sema3F y en consecuencia, estos animales presentan proyecciones axónicas periféricas defectuosas similares a las observadas en los mutantes de NRP1 y NRP2. Estos autores mostraron además, que la señalización vía NRP1 es mediada principalmente por la PLXN A4, mientras que la señalización vía NRP2 es mediada principalmente por la PLXN A3.

Las PLXNs no sólo transducen las señales de las semaforinas sino también son capaces de unir directamente a ciertas semaforinas. Así, las semaforinas transmembranas, sólo utilizan plexinas como receptores (Rohm y col., 2000; Gavazzi, 2001; Goshima y col., 2002) (Figura 7).

Resulta imposible abarcar en detalle este tema, por lo cual a continuación se hará mención al esquema general de las vías intracelulares que median los efectos de las semaforinas secretadas.

Del receptor al citoesqueleto

El efecto último de las cascadas de señalización de las semaforinas es regular la dinámica del citoesqueleto neuronal. Esto implica un desafío para los receptores que median las acciones de las semaforinas y se encuentran en los conos de crecimiento axónicos, así como en otras estructuras celulares, ya que deben transducir una señal altamente localizada desde el entorno extracelular hasta el citoesqueleto de actina con el fin último de provocar cambios en la forma o trayectoria de los axones en un espacio restringido (Figura 8).

La unión de la semaforina al complejo de señalización NRP/PLXN induce cambios conformacionales que provocan la activación de un dominio en la PLXN, denominado GAP (del inglés, *GTPase-Activating Protein*). Este dominio citoplasmático de las PLXNs es capaz de unir directamente a las GTPasas de la familia Rho, lo que representa un vínculo directo entre las semaforinas/plexinas y las pequeñas proteínas de unión al GTP (Castellani y Rougon, 2002; Pasterkamp 2005; Puschel, 2007; Hung y Terman, 2011). Las GTPasas mencionadas, son reguladores clave de la dinámica del citoesqueleto y la adhesión celular (Hall, 1998; Hall y Lalli, 2010). Se ha postulado que la fosforilación de la PLXN desencadenaría el inicio de las cascadas de señalización, a través de su asociación con los miembros de la familia de las Rho GTPasas, que incluyen Rho, Rac1 y Cdc42 (revisado en Castellani y Rougon, 2002; Jin y Strittmatter, 1997) (Figura 8). La activación de Rac y Cdc42, desencadena la formación de lamelipodios y filopodios, respectivamente. Mientras que la activación de Rho está asociada con la formación de fibras de estrés y el colapso. Se postula que los efectos de retracción de los axones provocados por las semaforinas implicarían la activación de Rho y/o la inactivación de Rac/Cdc42 (; Jin y Strittmatter, 1997; Castellani y Rougon, 2002).

Los efectores de las Rho GTPasas incluyen diversas quinasas y fosfatasa capaces de regular la activación de proteínas y de esta manera controlar la polimerización y despolimerización de actina (Figura 8). Aizawa y colaboradores (2001) demostraron que Sema3A induce la fosforilación y desfosforilación secuencial de la cofilina, en los conos de crecimiento. La cofilina se inactiva cuando está fosforilada y de esta manera se reduce el *turnover* de actina. La quinasa responsable

de inactivar la cofilina es la LIM quinasa. Estos autores postulan que la LIM quinasa es necesaria pero no suficiente para provocar la retracción de los axones y sugieren que otras proteínas estarían involucradas.

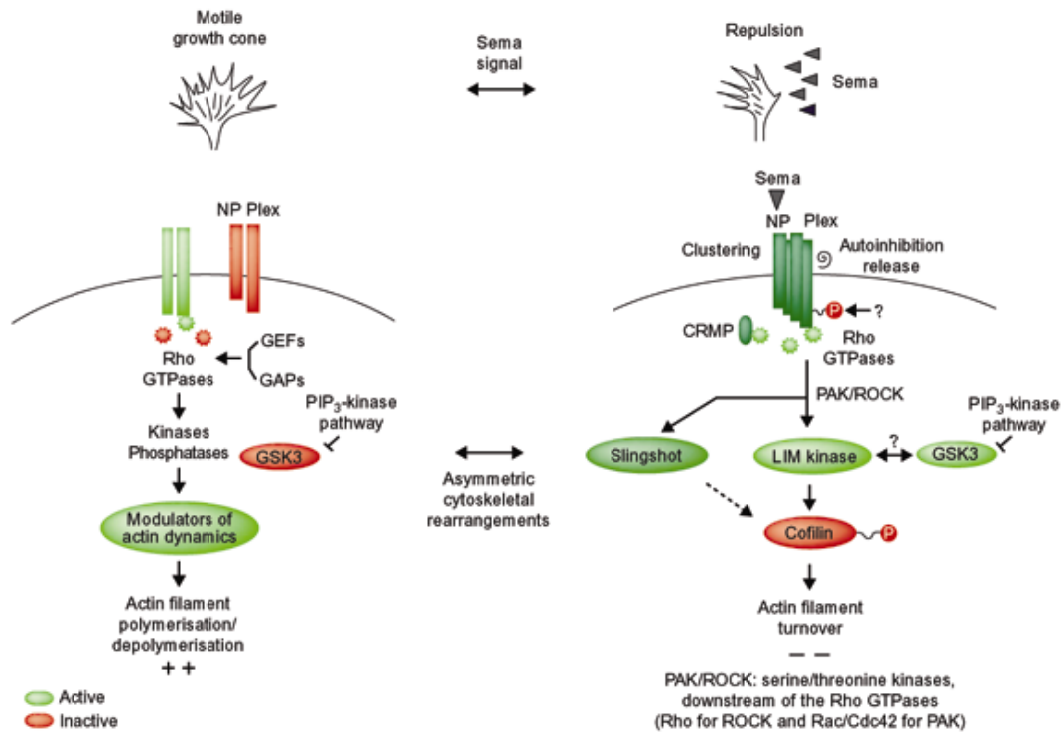


Figura 8. Esquema general que muestra cascadas de señales desencadenadas por las semaforinas secretadas. Tomado de Castellani y Rougon, 2002.

Los efectos de las semaforinas sobre el citoesqueleto neuronal, no sólo afectan la dinámica de polimerización de la actina sino también de otros componentes del citoesqueleto como los microtúbulos (Gu y Ihara, 2000; Dent y col., 2004). Los cambios en la morfología celular, como consecuencia de la alteración del citoesqueleto en combinación con la adhesión al sustrato, estarían contribuyendo con la célula y sus procesos celulares al facilitar la localización de sustratos más permisivos para el crecimiento. Esto sucede por ejemplo, cuando los conos de crecimiento alcanzan efectores temporarios in vivo que es donde toman decisiones respecto a qué direcciones tomar. En conjunto, estas vías serían la base de los cambios direccionales que inducen las señales repulsivas del microambiente. Como se mencionó anteriormente, aún se desconoce cómo los co-receptores influyen en la transducción que desencadena la plexina tras la unión de la semaforina.

Si bien casi todos los miembros de la familia de las semaforinas han mostrado ser repulsivos, existen evidencias de que ciertas semaforinas pueden tener efectos atractivos, dependiendo del estado funcional de la neurona. En el 2000, Castellani y colaboradores demostraron que L1 puede cambiar la repulsión provocada por Sema3A en atracción, y postulan que dicho cambio estaría relacionado con los niveles de GMP cíclico en la punta del cono de crecimiento.

Finalmente, cabe destacar que las evidencias presentadas provienen de estudios moleculares y celulares realizados principalmente en el sistema nervioso durante el desarrollo embrionario. Comparativamente, poco se sabe acerca de los mecanismos de acción de las semaforinas que controlan los fenómenos plásticos del sistema nervioso adulto o bien en respuesta a lesiones o enfermedades del sistema nervioso (Pasterkamp y Verhaagen, 2006; Pasterkamp y Giger, 2009; Pasterkamp, 2012).

HIPÓTESIS

Las semaforinas y sus receptores neuronales contribuyen a la denervación uterina que induce el estrógeno.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar la contribución de las semaforinas y sus receptores neuronales a la denervación del útero inducida por el estrógeno.

Objetivos Específicos

- (1) Determinar si el útero de la rata produce semaforinas e identificar los miembros de la familia que son expresados.
- (2) Evaluar si la expresión de esas semaforinas es regulada por el estrógeno.
- (3) Determinar los tejidos y tipos celulares responsables de la síntesis de estas moléculas.
- (4) Examinar si las neuronas que inervan al útero expresan receptores para las semaforinas detectadas y analizar si sus niveles de expresión son afectados por el estrógeno.

1. Elección del modelo animal y tratamiento con estrógeno. Los estudios desarrollados en este trabajo fueron realizados en ratas prepúberes sometidas a un tratamiento crónico con 17β -estradiol (E2). Este modelo fue elegido por varias razones. En primer lugar, la rata es un modelo apropiado y económico para realizar estudios que implican manejo del entorno hormonal, pues alcanza la pubertad a temprana edad (4 semanas). La elección de hembras prepúberes se basó en el hecho de que las mismas no requieren castración para evitar interferencias con hormonas endógenas y responden al estrógeno de la misma forma que las hembras adultas castradas (Rhen y col., 2003).

El tratamiento crónico con E2 se realizó en el período infantil/prepuberal (10-25 días de edad). Se utilizaron dosis relativamente elevadas de la hormona con el fin de inhibir la ovulación y la producción ovárica de progesterona. Este protocolo de administración de E2 genera un ambiente fuertemente negativo para las fibras nerviosas simpáticas uterinas y provoca una completa denervación que se asemeja a la observada en el embarazo (Brauer y col., 1995; 2002; Chávez-Genaro y col., 2002, Richeri y col., 2002; Chalar y col., 2003).

2. Elección de los métodos de análisis. Para alcanzar los objetivos específicos se utilizaron combinaciones de métodos bioquímicos, moleculares y morfológicos, todos los cuales fueron diseñados para analizar la expresión de semaforinas, sus receptores específicos y su regulación por el E2.

2.1 Búsqueda y caracterización de la expresión de semaforinas en el útero de la rata.

2.1.1 Expresión proteica de semaforinas. Uno de los mayores problemas enfrentados fue la ausencia de anticuerpos específicos contra las distintas variedades de semaforinas. Por esta razón inicialmente, se utilizó un anticuerpo que reconoce de manera general un dominio extracelular de 500 aminoácidos denominado SEMA, que está presente en todas la semaforinas (H-300, Santa Cruz Biotechnology Inc., EEUU). Utilizando este anticuerpo se buscó la presencia del dominio SEMA en el pool de proteínas totales del útero y se evaluó su regulación por el estrógeno, empleando inmunofluorescencia y *Western blot* (WB). La posterior identificación de las

variedades involucradas y su sitio de síntesis, fueron abordadas mediante estudios de expresión a nivel transcripcional.

2.1.2 Identificación de semaforinas específicas en el útero y regulación por el estrógeno. Este objetivo fue abordado exclusivamente a nivel del ARNm uterino. Se realizaron ensayos de Retrotranscripción y Amplificación en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) con distintas estrategias:

- i) Se utilizaron oligonucleótidos degenerados para amplificar el dominio SEMA. Este abordaje experimental resultó muy ventajoso ya que el análisis de alineación de las secuencias obtenidas además de confirmar que el útero de la rata sintetiza semaforinas, permitió avanzar en la identificación de semaforinas específicas. Esto fue posible debido a que el dominio SEMA además de su alta conservación y de sus aminoácidos invariables presenta particularidades aminoacídicas propias de cada grupo ([Koppel y col., 1997](#)).
- ii) Una vez identificadas las secuencias expresadas, se diseñaron oligonucleótidos específicos que fueron utilizados en los ensayos de RT-PCR cuantitativos del objetivo específico 2.
- iii) Adicionalmente, realizamos ensayos en los que se emplearon oligonucleótidos específicos para semaforinas con acciones demostradas sobre los nervios simpáticos que pudieran no ser reveladas por los estudios con oligonucleótidos degenerados.

En todos los casos, los estudios de expresión diferencial incluyeron ensayos de RT-PCR semicuantitativos y en tiempo real.

2.2 Localización tisular y celular de las semaforinas uterinas. Correlación espacio-temporal con la remodelación de la inervación por el estrógeno. Los ensayos de inmunodetección *in situ* nos dieron una visión general de la distribución de todas las semaforinas presentes en el útero. Sin embargo, las limitaciones del anticuerpo utilizado nos impidieron evaluar la localización de las semaforinas específicas. Para lograr este objetivo realizamos ensayos de hibridación *in situ*. Complementariamente, se demostró la inervación uterina utilizando inmunofluorescencia.

2.3 Receptores para semaforinas en las neuronas que inervan al útero. El siguiente paso natural para evaluar una posible participación de las semaforinas en la remodelación de la inervación uterina consistió en buscar la presencia de sus receptores neuronales específicos. También se evaluó si la expresión de estos receptores estaba regulada por el E2.

Las fibras intrauterinas se revelaron por inmunofluorescencia. Con esta misma técnica se evaluó además la presencia y niveles de estos receptores en los somas neuronales simpáticos de proyección uterina, reconocidos mediante el empleo de un trazador retrógrado. Los niveles neuronales de los receptores fueron valorados por densitometría microscópica (Chalar y col., 2003; Richeri y col., 2005). Si bien el eje de nuestros estudios estaba enfocado en la inervación simpática, se evaluaron también la presencia de receptores en las neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal de proyección uterina que también son sensibles a las semaforinas.

Se optó por la densitometría microscópica y no el *WB*, debido a que este método no permite discriminar cambios selectivos en poblaciones discretas de neuronas, ya que los mismos se basan en el empleo de homogenatos de tejido. Se desestimó la posibilidad de separar por citometría de flujo las neuronas marcadas con el trazador fluorescente y emplearlas posteriormente en ensayos de *WB*, porque se ha observado que la recuperación de neuronas trazadas es muy baja luego de la disociación de los ganglios (Cowen, comunicación personal).

1. Animales y tratamientos con E2

Se utilizaron ratas hembras Wistar provenientes de la colonia del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Los animales fueron sexados al nacer y se dejaron con la madre 6-8 hembras y un macho por camada hasta los 21 días de edad. Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de luz y temperatura, con acceso libre a agua y comida en cajas de policarbonato de dimensiones apropiadas. Las cirugías, tratamientos y eutanasia de los animales (sobredosis de pentobarbital sódico) fueron realizados de acuerdo con los protocolos aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del IIBCE y de acuerdo con la Ley Nacional de Experimentación Animal N° 18611.

En todos los casos las hembras fueron inyectadas por vía subcutánea (s.c.) con cipionato-17 β -estradiol (E2; Laboratorios König, Argentina) diluido en aceite de maní (Sigma, EEUU) en un volúmen final de 0,1mL por dosis. Los grupos controles fueron inyectados sólo con el vehículo.

- (A) Para los estudios de detección de SEMAS en útero (Capítulo 1), identificación de semaforinas específicas y localización de sus sitios de síntesis (Capítulos 2 y 3) los animales fueron inyectados con 4 dosis de 10 μ g de E2 en los días 10, 15, 20 y 25 de vida y sacrificados a los 28 días de edad (Brauer y col., 1995). En el caso de los controles, se verificó su condición prepuberal por la ausencia de apertura vaginal, la cual es inducida por el primer pico estrogénico que acompaña la pubertad
- (B) En los estudios de receptores para semaforinas en las neuronas vinculadas al útero (marcadas con trazador retrógrado) se utilizó una modificación del tratamiento crónico con E2 antes descrito. Este tratamiento consistió en la administración de 3 dosis s.c. de 20 μ g de E2 en los días 25, 27 y 29 de edad y la eutanasia se realizó a los 30 días. El inicio de un tratamiento más tardío (25 vs. 10 días de edad) garantizó que las terminales nerviosas intrauterinas permanecieran intactas durante los días en que se produce la captura del trazador y su transporte retrógrado, y antes de que comience la degeneración de los nervios. Esta aproximación fue exitosamente utilizada en nuestros estudios previos (Chalar y col., 2003; Richeri y col., 2005).

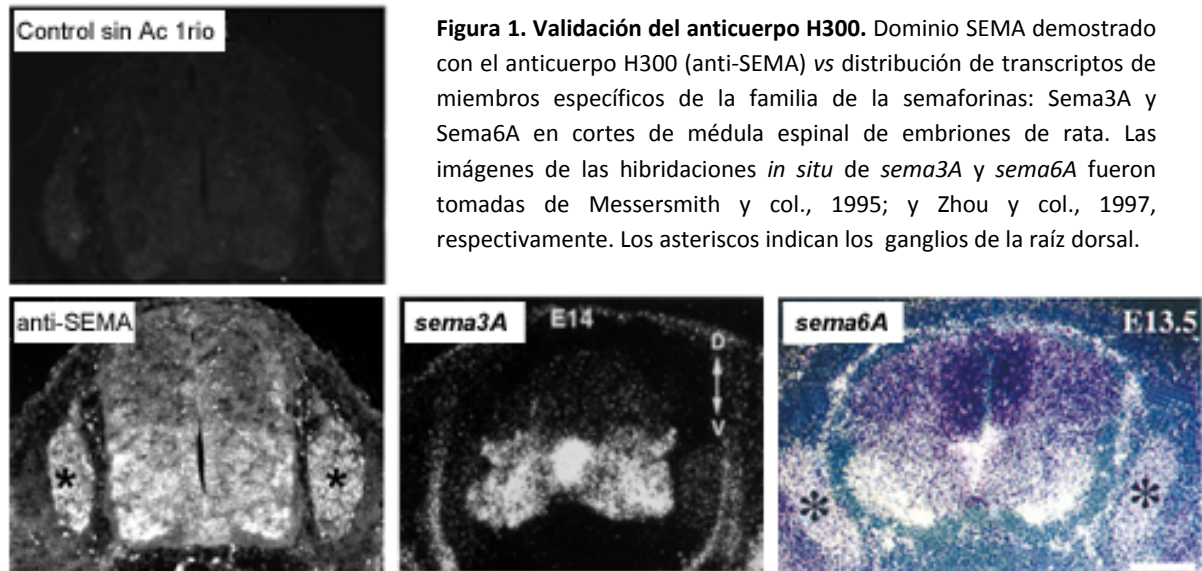
2. Métodos de análisis

2.1 Estudios proteicos sobre expresión de semaforinas en el útero

Inmunodetección *in situ*

Se empleó un anticuerpo policlonal generado en conejos contra el dominio SEMA (anti-SEMA) (H-300, Santa Cruz Biotechnology Inc., EEUU). Para la correlación con el comportamiento de la innervación uterina, las fibras nerviosas simpáticas fueron demostradas utilizando un anticuerpo contra la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante de la síntesis de noradrenalina (Affiniti Bioreagents, EEUU) y las sensoriales fueron visualizadas con un anticuerpo dirigido contra el péptido *calcitonin gene-related peptide* (CGRP; Affinity Research Products, Reino Unido).

Validación del anticuerpo anti-SEMA: Cuando se desarrollaron estos estudios, no existían reportes de la utilización de este anticuerpo en ensayos de inmunodetección *in situ*. Por este motivo se validó previamente el anticuerpo, evaluando la localización de la inmunorreactividad para SEMA en la médula espinal de embriones de rata (E14). En esta etapa del desarrollo, es conocido que la médula espinal concentra transcritos que codifican para semaforinas (Figura 1) (Messersmith y col., 1995; Zhou y col., 1997).



Nuestros estudios de inmunofluorescencia mostraron que el anticuerpo marcaba selectivamente la región ventral de la médula espinal y los ganglios de la raíz dorsal (panel izquierdo en Figura 1). La especificidad de dicha marcación en estos sectores coincide con resultados de otros autores que han mostrado la expresión de ARNm para Sema3A (secretada) y Sema6A (transmembrana) (Messersmith y col., 1995; Zhou y col., 1997). Además, fue confirmada en cortes adyacentes en los que se omitió la incubación con el anticuerpo primario (Figura 1).

Una vez validado el anticuerpo H-300, se realizaron ensayos de inmunodetección sobre cortes de útero de hembras de distintas edades y condiciones hormonales: ratas prepúberes (tratadas con E2 o vehículo) y ratas adultas (vírgenes en diestro y gestantes a término) y se cuantificó la intensidad de inmunomarcación mediante densitometría microscópica.

Procesamiento de los tejidos: Para la demostración del dominio SEMA en el útero los animales fueron perfundidos transcardíacamente primero con 25 mL de una solución salina (NaCl 0.9%) seguido de 25 mL de paraformaldehído (Sigma, EEUU) (PFA 4% en solución salina fosfato, PBS). Los volúmenes de perfusión que se indican (25 mL) fueron los utilizados para perfundir ratas prepuberales. En el caso de los animales adultos, se utilizaron volúmenes mayores (75 mL). Finalizada la perfusión, se procedió a la disección de los tejidos y se post-fijaron por inmersión durante 1,5 hs. Luego de lavados en PBS (3x15 min) y crioprotectados en solución de sacarosa (12 % en PBS) toda la noche a 4°C, los tejidos fueron agrupados, incluidos en Cryomatrix (10 % alcohol polivinílico, 4 % polietilenglicol, Shandon, EEUU) y posteriormente congelados a -20 °C. Los cortes de 12 µm de espesor fueron obtenidos en un crióstato (Leica, Alemania) a -22 °C montados sobre portaobjetos gelatinizados.

Inmunomarcación: En todos los casos se emplearon métodos de inmunomarcación indirecta. Dado que se trabajó siempre con microscopía de fluorescencia, se emplearon anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos (se detallan más adelante). La incubación con el anticuerpo primario fue realizada durante toda la noche, a temperatura ambiente (Tamb) en una cámara húmeda. Para evitar uniones inespecíficas, el diluyente de los anticuerpos primarios contenía suero normal de cabra (5 %) y DL-lisina (0.05 %; Sigma) como bloqueantes, y Tritón X-100 (0.2 %; Sigma) como surfactante, incluidos en una solución salina amortiguadora (PBS: KCl, NaCl, KHPO₄; KH₂PO₄). La especificidad de la inmunomarcación se valoró omitiendo la incubación con el anticuerpo primario. En algunos casos se realizaron incubaciones con sueros pre-inmunes provenientes de la misma especie en la que fue generado el anticuerpo primario. Al final del período de incubación los cortes fueron lavados con PBS (3x15 min) y las preparaciones incubadas con sus respectivos anticuerpos secundarios, anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón, ambos producidos en cabra y conjugados a los fluorocromos: Alexa-Fluor 488; Alexa-Fluor 568 (*Life Technologies-Molecular Probes*, USA) o FITC (del inglés, *Fluorescein Iso-thiocyanate*; Sigma) durante 1.5 hora a temperatura ambiente. Al cabo de ese tiempo los cortes fueron lavados en PBS (3x15 min), montados en buffer/glicerol (Citifluor, Londres, UK). Las diluciones de los anticuerpos empleadas en cada caso, se detallan en los capítulos de resultados correspondientes.

Los preparados fueron visualizados por microscopía de epifluorescencia utilizando un microscopio Nikon Eclipse 800 (dicróicos: G-2B, Nikon) o por microscopía de barrido láser confocal utilizando un microscopio Olympus FLUOVIEW FV300 (con los láseres y filtros: *Argon Ion Laser System Series IMA 100-488nm*; *Helium Neon 05-LHP991-633nm*; BA660IF; apertura confocal 2-3). Se obtuvieron imágenes digitales de las preparaciones utilizando cámaras CCD acopladas a los microscopios y equipados con sus correspondientes programas de adquisición de imágenes, CoolSNAP-Pro Monochrome Digital Kit e *Image Pro Plus*, Media Cybernetics en el microscopio Nikon y FLUOVIEW FV300 en el microscopio Olympus.

Ensayos de Western blot

Los ensayos de WB realizados por colaboración con la Dra. Isabella Gavazzi (King's College Londres, Inglaterra). Brevemente, las muestras fueron homogenizadas (*Ultraturrax homogeniser*) en 800uL de solución RIPA modificada (0,1 % SDS, Tris-HCl 50 mM, pH8, NP-40 1 %, Na-deoxycholate 0,5 %, NaCl 150mM, EDTA 1 mM plus *Complete Roche25x*, PMSF 1 mM). Las extracciones fueron centrifugadas por 20 min (10200 g; 4 °C) y los sobrenadantes recuperados para ser analizados por electroforesis SDS-PAGE 8%. Las proteínas fueron transferidas a membranas (*Amersham*) que fueron posteriormente bloqueadas por 1 hr en 4% BSA en solución TBS-T e incubadas durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario H-300 (anti-SEMA). Luego de ser lavadas fueron incubadas con un segundo anticuerpo (a-rb HRP) durante 1 hr a Tamb, para ser posteriormente reveladas. Se utilizó un anticuerpo anti-tubulina como control de carga y las intensidades de las bandas fueron analizadas utilizando el *GeneGnome system* (*Syngene*).

2.2 Análisis de ARNms que codifican para semaforinas en homogenatos de útero

Inicialmente el análisis de expresión transcripcional consistió en la búsqueda de ARNms codificantes para semaforinas en homogenatos de cuernos uterinos enteros que incluían miometrio y endometrio.

- **Extracción de ARN total.** Los cuernos uterinos de las ratas prepúberes control (n=8) y tratadas con E2 (n=6) fueron disecados en condiciones estériles, liberándolos de los ovarios, oviductos, cuello uterino y tejido adiposo anexo. La extracción del ARN total se realizó con Trizol (*Life Technologies, Gibco BRL*), (1

mL/100 mg de muestra), siguiendo protocolos ya empleados en nuestros estudios previos (Chalar y col., 2003). El Trizol es un reactivo comercial consistente en una solución de fenol y tiocianato de guanidina que permite aislar el ARN total mediante un sólo paso de extracción. La disgregación mecánica de los tejidos por homogenización junto con la acción química del Trizol permite lisar las células y disolver sus componentes manteniendo la integridad del ARN, ya que el Trizol inactiva las RNAsas. Las muestras fueron seguidamente centrifugadas (12.000 g, 10 min. a 4 °C) para remover el material insoluble. El *pellet* resultante contiene membranas extracelulares, polisacáridos y ADN de alto peso molecular, mientras que el sobrenadante contiene el ARN. Se agregó al sobrenadante aislado cloroformo (0,2 mL/ mL Trizol utilizado en la homogenización) y posteriormente se centrifugó (7150 g, 25 min. a 4 °C). En este paso se separa la solución en una fase orgánica (fenol-cloroformo), una interfase donde quedan las proteínas y el ADN, y una fase acuosa en donde se encuentra exclusivamente el ARN. El ARN de la fase acuosa se precipitó con isopropanol (0.5 mL/mL Trizol) y se centrifugó (12000 g, 10 min. a 4 °C). El pellet de ARN fue lavado con etanol (75 % en agua DEPC) (1 mL EtOH 75 % / mL Trizol), agitado con *vortex* y centrifugado (7500 g, 6 min. a 4 °C). Luego de remover el etanol, las muestras se dejaron secar al aire y se resuspendió el ARN con agua bidestilada libre de RNAsas (50 µL muestras control; 150 µL muestras de animales tratados con E2).

Las muestras de ARN fueron valoradas espectrofotométricamente. Es sabido que los ácidos nucleicos presentan una absorción máxima a 260nm y se estima que una muestra de ARN de 40 µg/mL absorbe una unidad de densidad óptica (D.O.). Se leyeron las D.O. a 260 nm de diluciones de cada muestra, corregidas contra un blanco apropiado (agua bidestilada) y se estimaron las concentraciones de ARN de cada muestra: $D.O. * 40 \mu\text{g/mL} * \text{factor de dilución} = \mu\text{g/mL ARN muestra}$. También se realizaron lecturas de D.O. a 280nm, longitud de onda a la que las proteínas presentan su máxima absorción y se calculó el cociente A_{260}/A_{280} . Este cociente es un indicador de pureza de cada muestra, considerándose que una buena preparación de ARN posee un cociente $A_{260}/A_{280} \leq 2$. La integridad del ARN de las muestras fue revisada bajo luz ultravioleta luego de una corrida electroforética. Las especies de ARN ribosómico eucarióticas 28S y 18S suelen estar presentes en una relación $28S/18S \geq 2$ en una muestra de ARN bien preservada.

- **RT-PCR** La selección y amplificación de las secuencias de interés por PCR se realizó utilizando como molde el ADN copia (ADNc) obtenido de la retrotranscripción de los ARNs extraídos en cada situación experimental.

Retrotranscripción (RT). El ARN total fue tratado con ADNasa (Promega, EEUU) para remover posibles contaminaciones de ADN genómico y se procedió a sintetizar hebras de ADNc a partir del ARN. Este proceso, denominado transcripción reversa (RT) o retrotranscripción, se llevó a cabo incubando 1 µg de la muestra de ARN total de útero (molde) con 1 µL de una ADN polimerasa-ARN dependiente, la transcriptasa reversa *SuperScript III* (Invitrogen, EEUU); 2 µL de una mezcla de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP, concentración final 1 mM cada uno); 0.5 µg de oligonucleótido cebador (primer) en nuestro caso se utilizó un oligo(dT)₁₅, en 20 µL de volumen final de una solución tampón (Tris-HCl 10 mM, pH 9,0 a 25 °C; MgCl₂ 5mM; KCl 50mM; Triton X-100 0,1%), (*Reverse Transcription System*, Promega) y en presencia de un inhibidor de ribonucleasas (RNAsin, 1 U/µL). Los oligo(dT) se asocian con la cola poli(A) del extremo 3' de los ARN mensajeros de los mamíferos y al tener un grupo hidroxilo libre en el carbono 3' actúan de cebadores para la retrotranscriptasa que sintetiza hebras complementarias a los ARNs. Luego de un período de incubación de una hora a 42 °C la enzima se inactivó elevando la temperatura de la mezcla de reacción a 99°C durante 5 minutos y bajándola luego a 4 °C por 5 min. para prevenir su unión a moléculas de ADNc.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para detectar ARNms que codifiquen semaforinas, el paso siguiente fue seleccionar y amplificar la hebra de ADNc complementaria a estos ARNms entre toda la población de moléculas sintetizadas como producto de la reacción de retrotranscripción. Se realizaron ensayos de PCR con distintas estrategias.

- (1) La presencia del dominio SEMA común a todos los miembros de la familia de las semaforinas fue rastreada utilizando un par de oligonucleótidos degenerados derivados de las secuencias aminoacídicas FFFRENA y DPYCAWD altamente conservados dentro de este dominio (Kolodkin y col., 1993; Zhou y col., 1997).
- (2) La búsqueda de expresión de semaforinas específicas se realizó empleando pares de oligonucleótidos específicos que corresponden al genoma de *Rattus norvegicus* para amplificar una región codificante de los genes señalados en la siguiente tabla.

Tabla 1. Pares de oligonucleótidos y temperaturas de hibridación utilizadas en los ensayos de PCR. Se emplearon dos cebadores (oligonucleótidos a=sentido y b=antisentido); cada uno complementario a hebras opuestas de la región de ADN que se desea amplificar; de manera que el cebador “a” dirija la síntesis de una hebra de ADN a la que luego se le pueda hibridar el cebador “b” y *viceversa*. Esto permite la síntesis exponencial *de novo* de la región de ADN flanqueada por los dos cebadores. Los pares de cebadores utilizados para seleccionar y amplificar los ADNc de interés en cada caso, fueron diseñados por nosotros basándonos en las secuencias publicadas para el dominio SEMA (Zhou y col., 1997), las semaforinas específicas (Lillesaar y Fried, 2004) y RpL7 (Deroo y col., 2004), el gen de referencia utilizado con propósitos comparativos para cuantificar si el tratamiento crónico con E2 inducía cambios en los niveles de expresión de las semaforinas de interés.

Gen	Oligonucleótido sentido 5' – 3'	Oligonucleótido antisentido 5' – 3'	Temp de hibridación	Amplicon (pb)
SEMA	TTC/TTTC/TTC/TA/CGNGAA/G AAC/TGC	TTCCANGCG/ACAG/ATANGGG /ATC	45°C	860
Semaforina 3A	AAACATTTGGTGGATTGACTC	CGAGCAAGGCAGCATTCC	54°C	442
Semaforina 3F	GATTTTATGGGCACTGATGCA	CAAACACGTCCTGGAGTTCA	57°C	358
Semaforina 4B	CTTCTTGATGGATGGGCAGGTC	CCAGGCGCAGTAAGGGTCT	57°C	358
RpL7	TCAATGGAGTGAGCCCAAAG	CAAGAGATCGAGCAACCAAG	57°C	246

Con el fin de determinar si la expresión de las semaforinas en el útero es regulada por el estrógeno, las expresiones individuales fueron normalizadas contra el producto de PCR para la proteína ribosomal L7 (RpL7), el cual se seleccionó como gen de referencia, por su expresión constitutiva y ubicua, (Deroo y col., 2004; Hong y col. 2004). Se utilizó dicho gen como control de expresión continua para los ensayos de RT-PCR semicuantitativa y en tiempo real, realizados a partir de los homogenatos uterinos y su expresión fue analizada en paralelo a la de los genes de interés.

- **RT-PCR semicuantitativa:** Las parejas de cebadores ([Tabla 1](#)) fueron empleadas en reacciones de PCR siguiendo protocolos estándares, como se indica a continuación. La amplificación del ADNc correspondiente a la región del gen de interés, se realizó mezclando 1 μ L de ADNc (dilución final 1:10) con 2 μ L de solución tampón de PCR 10X (Tris-Hcl 100 mM, pH 8,8; KCl 500 mM; Triton X-100 1%), 0.6 μ L MgCl₂ 50 mM, 0.4 μ L de solución de dNTPs 10 mM, la pareja de oligonucleótidos correspondiente (0.5 μ L de cada uno, 10 μ M), 0.1 μ L de Taq ADN polimerasa 5 U/ μ L (Life Technologies Inc., Gibco BRL) y se completó con agua destilada estéril hasta un volumen final de 20 μ L. El ADNc correspondiente a RpL7, fue seleccionado y amplificado con la pareja de oligonucleótidos específicos antes indicada, en las mismas condiciones. En cada ensayo se hizo un control sin ADNc. Las mezclas de reacción de PCR, fueron sometidas a 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 5 min. y 35 ciclos de 94 °C/45''; temperatura de hibridación (*annealing*) correspondiente*/45'' y 72 °C /1', con una extensión final de 72 °C durante 7 min. Las reacciones fueron llevadas a cabo en termocicladores Thermolyne Amplitron® I.
(* Se calculó la temperatura de hibridación óptima para cada par de cebadores ([Tabla 1](#)).

- **RT-PCR tiempo real:** Los ensayos de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) fueron realizados en la Unidad de Biología Molecular, del IP-Montevideo bajo la supervisión de Gonzalo Greif. La particularidad que posee esta técnica es justamente la de permitir el análisis de los productos durante el proceso de amplificación, de ahí su nombre: PCR en tiempo real. El nivel de expresión de las semaforinas se determinó por cuantificación relativa de los ADNc por qPCR con Sybr Green I (*QuantiMix SYG Kit, Biotools, España*), ([Figura 2](#)). Las expresiones individuales fueron normalizadas contra RpL7. Se realizaron curvas de calibración con diluciones seriadas del ADNc. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 94 °C/ 5' seguido de 40 ciclos de 94 °C/45'', 57 °C/45'', 72 °C/45'' (*Rotor-Gene 6000; Corbett Research, Australia*). En cada ensayo, las muestras fueron amplificadas por duplicado, y el ensayo replicado en otro experimento independiente. Se verificó la pureza de los productos amplificados en cada caso realizando la curva de fusión una vez finalizada la reacción de PCR y además se analizaron los productos mediante corridas electroforéticas, confirmándose que los productos amplificados eran únicos y del tamaño esperado.

Los resultados fueron procesados con el programa de análisis de datos *Relative Expression Software Tool (REST2005; Corbett Research Pty Ltd. & M. Pfaffl)*. Los datos fueron expresados como cantidad relativa del gen de semaforina de interés respecto a los niveles RpL7 en cada situación experimental. Esta relación fue calculada para cada molde de ADNc, con el fin de normalizar distintos parámetros: variaciones de cantidad y calidad del material de partida; y diferencias en las eficiencias de cada reacción.

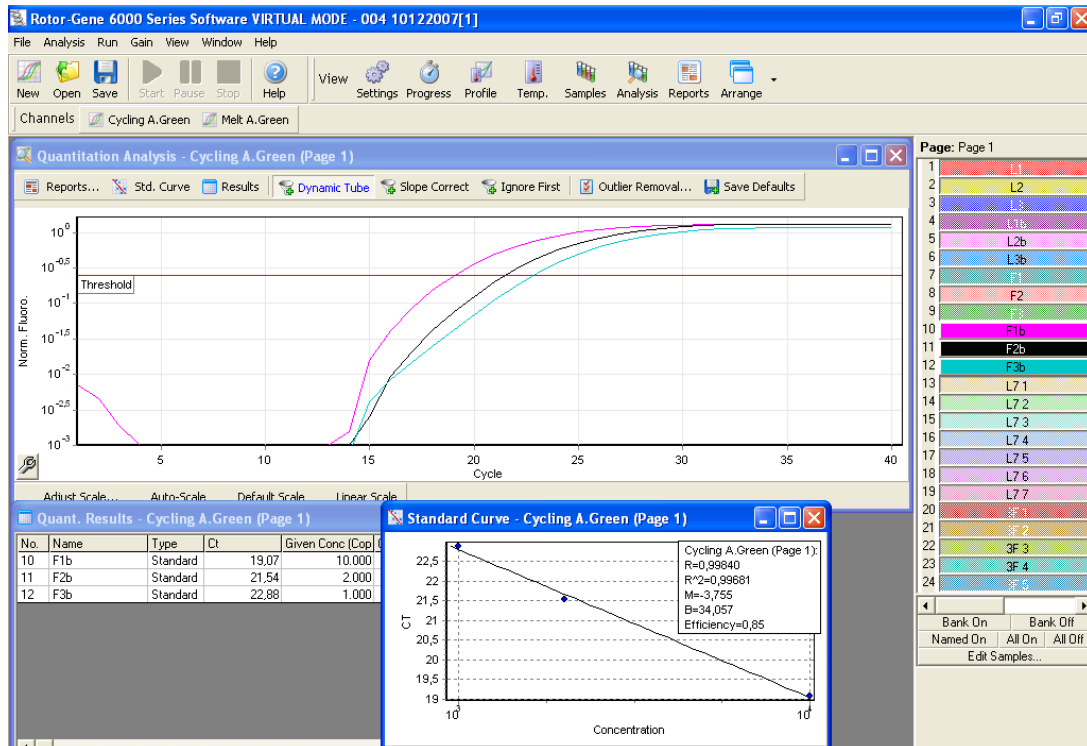


Figura 2. qPCR: cuantificación de semaforinas específicas normalizadas contra L7. Se realizó una cuantificación relativa de cada Sema, en la cual se determina el cambio en los niveles de expresión de ARNm uterino. Este tipo de cuantificación se sustenta en la comparación entre el nivel de expresión del gen a estudiar versus un gen de referencia (L7). Por tanto, es irrelevante en qué unidades se expresa la cuantificación, y sus resultados son comparables entre múltiples experimentos. Se muestran los valores de Ct (número de ciclos) (del inglés *cycle threshold*, cuya traducción es ciclo umbral) obtenidos en uno de los ensayos realizados. Estos valores son determinados durante la amplificación mediante la detección de la señal de fluorescencia que emite el SYBER Green y son inversamente proporcionales a la cantidad de ADN inicial. Para conocer la cantidad de ADN inicial, el programa de análisis del propio termociclador realiza transformaciones matemáticas que requieren conocer la eficiencia de PCR, la cual se determinó realizando curvas de calibración para cada gen en cada ensayo. A modo de ejemplo, esta figura muestra los valores de Ct y la curva de calibración obtenida al amplificar las muestras con los cebadores de Sema3F. Sema3F F1b, F2b y F3b, de concentración de ADN inicial decreciente (10.000, 2000 y 1000, n° de moléculas por tubo, respectivamente) fueron amplificadas mediante PCR en un mismo experimento. Cada cinética permite determinar un Ct para cada uno. Se realizaron réplicas independientes en la reacción. La curva de calibración, se obtuvo graficando los valores de Ct medios en función de la cantidad de ADN inicial de todas las réplicas. Así, se pudo definir la recta de calibración para estos valores medios gracias a una regresión lineal con un coeficiente de correlación (r2) satisfactorio. La curva de calibración, por tanto, representada en el gráfico da lugar a una recta definida por la fórmula $Y=aX+B$, donde: Y es el Ct medido por el termociclador y la pendiente a, deriva de la eficiencia de la PCR. Considerando las eficiencias de amplificación de 3F y L7, de cada ensayo, finalmente se calculó la cantidad relativa con el programa REST2005.

- **Análisis de los productos de PCR, acorde al tipo de PCR:**

- Clásica: i) corrida electroforética (en geles de agarosa o poliacrilamida)
- ii) purificación de los productos de PCR de bandas de agarosa
- iii) clonado de los productos de PCR y secuenciación

qPCR: i) curvas de fusión

- ii) corrida electroforética
- iii) cuantificación relativa de niveles de Semas

Electroforesis en gel de agarosa: Los productos de reacción fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1 % en la solución tampón TBE 1X (Tris-Borato 0.89 M, EDTA 2 mM, pH 8,0), conteniendo Bromuro de Etidio (BrEt 10 mg/mL) como agente intercalante. Los tamaños esperados de los productos amplificados ([Tabla 1](#)) fueron confirmados utilizando como marcador de tamaños, un ADN del fago Lambda digerido con Hind III que posee una banda de 500 pb (Promega). La visualización de las bandas se realizó con luz ultravioleta a través de un transiluminador, confirmándose la obtención de los productos de interés amplificados, por los tamaños de banda esperados.

Electroforesis en gel de poliacrilamida teñidos con plata: En algunos casos, los tamaños de los productos de PCR eran tan similares que se recurrió a hacer corridas electroforéticas de alícuotas de los productos de reacción de PCR en este tipo de geles ya que permiten una mejor discriminación en la migración de las macromoléculas. En estos casos las bandas correspondientes a los productos esperados fueron visualizadas por tinción con plata.

Purificación de los productos de PCR de bandas de agarosa, clonado y secuenciación: Las bandas de tamaños esperados fueron recortadas de geles de agarosa y purificadas utilizando un kit comercial de extracción de ADN de geles (*Concert Gel Extraction System, Life Technologies Inc., EEUU*). Las muestras fueron secuenciadas en los Servicios de Secuenciación de la Facultad de Ciencias-UdelaR e IPMont para verificar su identidad. En algunos casos, los productos de PCR fueron clonados; se transformaron bacterias, se seleccionaron los plásmidos recombinantes, se purificaron y fueron los plásmidos recombinantes los que se enviaron a secuenciar. Este fue el caso, para los productos obtenidos en los ensayos de RT-PCR con oligonucleótidos degenerados, así como los amplicones de Sema3A y Sema3F generados utilizando oligonucleótidos específicos. En todos estos casos, la clonación, transformación y selección de plásmidos recombinantes se realizó según se detalla más abajo ([Sección generación de sondas para hibridación *in situ*](#)).

2.3 Localización histológica de ARNms que codifican para semaforinas en el útero

Dado que el útero es un órgano que incluye miometrio y endometrio, se complementaron los análisis de expresión a nivel transcripcional en homogenatos con estudios de localización mediante hibridación *in situ* (HIS) sobre cortes histológicos. Se estudió la distribución espacial de los transcritos para dos de las semaforinas detectadas (Sema3F y Sema3A) en el cuerno uterino siguiendo protocolos utilizados en nuestros estudios previos ([Chalar y col., 2003](#)).

GENERACIÓN DE SONDAS PARA HIS:

(A) Clonación de los productos de PCR, transformación de bacterias y selección de plásmidos recombinantes rR3F y rR3A

Se purificaron los productos de PCR obtenidos con los pares de oligonucleótidos específicos para la Sema3F y Sema3A, utilizando el kit de extracción de ADN de geles (*Concert Gel Extraction System*) y ambas

muestras fueron clonadas en un vector procariótico, el plásmido *pGEM®-T-Easy Vector* (Promega) (Figura 3), para poder transformar bacterias y amplificar dichos fragmentos de ADN.

Plásmido utilizado para clonar a Sema3F y Sema3A: El plásmido pGEM posee el gen de resistencia a la ampicilina –que facilita la selección de las bacterias transformadas- y una región de clonación múltiple que contiene varios sitios de reconocimiento de enzimas de restricción flanqueado por dos promotores de ARN polimerasas, la polimerasa del Streptococo SP6 y del fagoT7 (Figura 3), que se encuentra interrumpiendo una unidad de codificación cuyo producto se determina con facilidad. Se trata del gen que codifica para el péptido α de la enzima β -galactosidasa (lacZ) perteneciente al operón lac. Esto permite una rápida selección de las bacterias que incorporaron los plásmidos recombinantes, dado que la inserción de un fragmento (clonación) en dicho sitio inactiva la enzima. Así, con una simple reacción con un sustrato de la enzima que desarrolle color se pueden identificar las colonias de bacterias transformadas que incorporaron los plásmidos recombinantes, que al no tener enzima funcional no van a desarrollar color (colonias blancas). Mientras que las colonias de bacterias que aparezcan coloreadas serán aquellas que sí expresan una β -galactosidasa funcional y por lo tanto no poseen el plásmido recombinante de interés.

Otra ventaja que posee este plásmido es que está diseñado especialmente para clonar productos de PCR. El *pGEM-T-Easy Vector* es previamente preparado por el proveedor: se lineariza con Eco RV y se le agregan desoxitimidinas (T) en los extremos 3'. De esta manera, al ser linearizado en el sitio de clonaje, la presencia de T en los extremos 3' aumenta la eficiencia de ligación de un producto de PCR en dicho sitio debido a que en la amplificación por PCR ciertas polimerasas termoestables suelen agregar (de forma independiente del molde) una adenina (A) en los extremos 3' de los fragmentos amplificados.

Clonación, transformación y selección de recombinantes: Los plásmidos linearizados con la enzima de restricción Eco RI fueron incubados con los productos de PCR en condiciones apropiadas para que ocurra la ligación. Para ello se mezcló 1 μ L de cada producto de PCR purificado con 50 ng de plásmido *pGEM®-T-Easy Vector*, 5 μ L de solución de ligación (Tris-HCl 60 mM, pH 7,8; MgCl₂ 20 mM; DTT 20 mM; ATP 2 mM; polietilenglicol 10 %), 1 μ L de T4 ADN ligasa 3 U/ μ L (Promega) y se completó con agua destilada estéril hasta un volumen de 10 μ L. Se incubó cada mezcla de ligación durante toda la noche a 4 °C, tras lo cual se procedió a la transformación de bacterias. Se trabajó con células *E. coli* competentes (*JM109 High Efficiency*, > 10⁸ cfu/ μ g, Promega) conservadas a -70 °C. Las mismas fueron descongeladas y rápidamente transferidas a tubos que habían sido previamente enfriados (100 μ L por tubo). Se mezclaron con la mitad del volumen de la reacción de ligación (5 μ L) e inmediatamente los tubos fueron colocados en hielo por 10 min. Las células fueron sometidas a un shock de temperatura, incubando los tubos durante 50 seg en un baño de agua a 42 °C y luego colocándolos inmediatamente en hielo por 2 min. Se agregó 900 μ L de medio frío (medio LB: Bacto®-triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g; pH 7,0) a cada reacción de transformación y se incubó por 1 hr. a 37 °C con agitación. Finalmente, distintas diluciones de las células transformadas fueron plaqueadas en condiciones asépticas, en placas de LB-agar (LB, agar 15 g/L) que contenían el antibiótico ampicilina (100 μ g/mL); un inductor de la transcripción de la β -galactosidasa, el IPTG (0.5 mM) y un análogo del sustrato de la β -galactosidasa que desarrolla una coloración azul, el 5-bromo-4 cloro-3 indol β -D galactósido, X-Gal (40 μ g/mL). Las placas fueron incubadas a 37 °C durante toda la noche y luego se procedió a la selección de las colonias de bacterias que incorporaron el plásmido recombinante. Una vez identificadas las colonias blancas, se picaron y se hicieron crecer en 3 mL de LB líquido que contenía 3 μ L de ampicilina durante toda la noche a 37 °C con agitación.

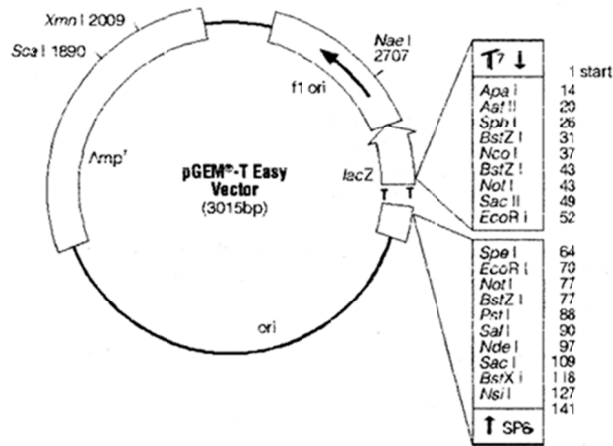


Figura 3. Mapa del plásmido *pGEM-T-Easy Vector* empleado para clonar las secuencias codificantes de Sema3F y Sema3A. El tamaño del plásmido es 3015 pares de bases (pb). En el mapa se indica la localización de secuencias específicas que posee el vector, que incluyen además del origen de replicación (*ori*) y el gen que confiere resistencia a la ampicilina (*Amp^r*); el sitio de iniciación de la transcripción de la ARN polimerasa del fago T7 (posición 1 en la secuencia del plásmido); el sitio de iniciación de la transcripción de la ARN polimerasa de SP6 (141); el promotor de la ARN polimerasa de T7 (2999); el promotor de la ARN polimerasa de SP6 (139-158); una

región de clonación múltiple (10-128, en la que se indican las posiciones de los sitios de reconocimiento específicos para distintas enzimas de restricción); el codón de iniciación de *lac Z* (180); secuencias del operón *lac* (2836-2996, 166-395); el operador *lac* (200-216); una región codificante de la β -lactamasa (1337-2197). Tomado de Promega.

Seguidamente se purificaron los plásmidos recombinantes para cual se empleó un método rápido de purificación de ADN plasmídico a pequeña escala (*CONCERT Rapid Plasmid Miniprep System*, Life Technologies Inc., Gibco BRL®). Brevemente, 1.5 mL de cultivo de bacterias transformadas fueron transferidos a un tubo de microcentrífuga; centrifugados (12.000 g, 2 min) y el *pellet* resultante fue resuspendido en 250 μ L de la solución (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM; ARNasa A 20 mg/mL). Luego, las células fueron lisadas en 250 μ L de una solución de hidróxido de sodio (NaOH 200 mM, SDS 1 %). Se mezcló por inversión hasta ver que la suspensión de células se aclaraba en el tubo y se incubó por 5 min a Tamb. Luego se agregó 350 μ L de solución de neutralización (acetato, clorhidrato de guanidina), se mezcló nuevamente por inversión y el lisado fue centrifugado (12.000 g, 10 min). Se transfirió el sobrenadante a una columna, que retiene los ácidos nucleicos, y luego se centrifugó (12.000 g, 1 min) y se descartó el volumen eluido. Posteriormente se lavó el ADN retenido en la columna agregando a la misma 700 μ L de solución de lavado (etanol 95°, NaCl, EDTA, Tris-HCl pH 8,0). Se centrifugó (12.000 g, 1 min), se descartó el volumen eluido y se realizó una segunda centrifugación en las mismas condiciones para remover la solución de lavado residual. Finalmente, la columna se transfirió a un tubo con el fin de recuperar el ADN plasmídico purificado. Para ello se agregó 75 μ L de una solución tampón caliente, TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0.1 mM; 65 °C) directamente en el centro de la columna, se incubó a Tamb por 1 min y luego se centrifugó (12.000 g, 2 min).

Análisis de los plásmidos recombinantes: El ADN plasmídico purificado fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 1X conteniendo BrEt (10 mg/mL). Las bandas fueron visualizadas con luz ultravioleta a través de un transiluminador, confirmándose la obtención de los plásmidos recombinantes (Figura 4). El gel fue fotografiado mediante una cámara digital KODAK DC290. Los plásmidos recombinantes obtenidos fueron nombrados de la siguiente manera: **rR3F** (el que contenía el inserto correspondiente al ADNc de Sema3F) y **rR3A** (el que contenía el ADNc de Sema3A). A continuación se procedió a verificar por secuenciación la identidad de los fragmentos clonados. La secuenciación se realizó en el secuenciador automático de la Facultad de Ciencias (ABI Prism 377), con el oligonucleótido SP6. Luego de identificar, en las secuencias obtenidas, las regiones correspondientes al vector y las secuencias

de los oligonucleótidos específicos, se procedió al análisis de secuencias que se realizó utilizando el programa *BLAST* 2.0 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) para buscar identidades en el *GenBank*TM. Al comparar la secuencia de los fragmentos clonados con la de los genes respectivos se verificó que ambos fragmentos amplificados poseían identidad con los genes de Sema3F y Sema3A de la rata.

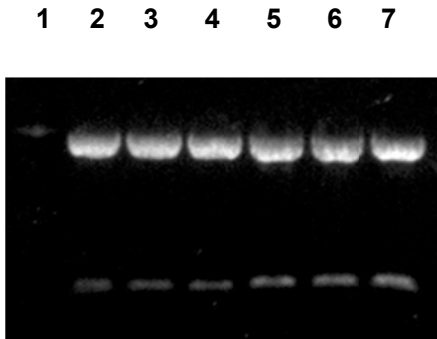


Figura 4. Foto digital del gel de agarosa teñido con BrEt en el que se visualizan carril 1: plásmido sin digerir; 2-4: producto de la digestión de rR3F con EcoR I; 5-7: producto de digestión de rR3A con EcoR I. Las bandas superiores corresponden al ADN plasmídico (vector) de 3015 pb y las inferiores a los insertos (alrededor de 480 pb). Nótese como la pequeña diferencia de los tamaños de los insertos, el de Sema3F 358 pb y Sema3A 442 pb, se puede apreciar en la migración diferencial de las bandas (carriles 2 al 4 vs 5 al 7).

(B) Síntesis de ribosondas marcadas con DIG-UTP

La segunda parte de los pasos a seguir para la generación de ribosondas para HIS, implica la linearización de los plásmidos rR3F y rR3A, que serán utilizados como molde para transcribirlas a ARN en presencia de DIG-UTP con el fin de sintetizar ribosondas marcadas y la posterior purificación y valoración de las mismas. Las ribosondas fueron sintetizadas *in vitro* utilizando como moldes los respectivos ADNc clonados en los plásmidos rR3F y rR3A. Por ser éstas complementarias a regiones de los ARNm que codifican para Sema3F y Sema3A, respectivamente, se les denomina sonda antisentido. A su vez, se generaron en cada caso sondas que poseían la misma secuencia del ARNm 5'-3' de interés, las cuales se suelen llamar secuencias sentido y se utilizó como control negativo para los experimentos.

Linearización de los plásmidos rR3F y rR3A: El hecho de haber clonado los fragmentos de ADNc de Sema3F y 3A en los plásmidos *pGEM-T Easy vector* facilitó la síntesis de las ribosondas (ARN simple hebra) debido a que dicho vector permite la transcripción *in vitro* de los ADNc clonados gracias a que posee los promotores de las ARN polimerasas del fago T7 y SP6 a los lados del lugar múltiple de clonaje.

Para transcribir el fragmento de ADN clonado, es necesario digerir con una enzima que deje el fragmento que queremos transcribir y sólo éste bajo el control del promotor elegido. La enzima de restricción utilizada ha de generar extremos 5' protuberantes o bien extremos romos ya que se producen transcritos aberrantes con moldes que presenten extremos 3' protuberantes. Se realizaron dos digestiones de cada plásmido recombinante. Por ejemplo, para rR3F una de ellas con la enzima Sac II (que tiene sitio único de restricción en el vector) que deja el ADNc bajo el promotor de SP6. Esto nos permitió usar la ARN polimerasa SP6 para transcribir la sonda antisentido. Se incubaron 2 µg del clon recombinante rR3F con 1 µL de la enzima Sac II (BioLab) en una solución tampón adecuada para la actividad de dicha enzima, en un volumen final de 50 µL durante 2 horas a 37 °C. Paralelamente, otros 2 µg de rR3F fueron digeridos con 1 µL de Pst I (BioLab) en un tampón adecuado para esta enzima (que también posee sitio único de restricción en el vector), en las mismas condiciones. La digestión con Pst I deja el ADNc bajo el promotor del fago T7, lo cual permitió usar la ARN polimerasa T7 para sintetizar la ribosonda sentido.

Se analizaron los productos de las digestiones por electroforesis. Se cargó 1/10 del volumen de cada mezcla de digestión (aprox. 200 ng de plásmido recombinante) y los mismos plásmidos sin digerir en un gel de agarosa con BrEt (agarosa 1%, en TBE 1X). La corrida se realizó en TBE 1X (Tris 89 mM, Acido bórico 89 mM, EDTA 2 mM) a potencia constante durante toda la corrida y se visualizó el gel bajo luz uv confirmando que había ocurrido una linearización completa.

Luego se purificaron los moldes de ADN mediante una extracción con fenol-cloroformo. Se llevó el producto de la digestión (45 μ L) a un volumen final de 200 μ L con agua bidestilada estéril, se agregó un volumen igual de fenol (equilibrado pH7-8) y se centrifugó (12.000 rpm, 20 min, 4 °C) para separar las fases. Se recuperó la fase acuosa que contenía el ADN solubilizado, descartándose la fase orgánica para eliminar las proteínas de la mezcla de digestión y se agregó un volumen de una mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se separaron las fases de igual forma y finalmente se precipitó el ADN de la fase recuperada agregando 0.1 volumen de acetato sódico (3 M, pH 5,5) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto durante toda la noche a -20 °C. Al cabo de este tiempo, se centrifugaron las muestras (13.300 rpm, 30 min, 4 °C), se lavaron con etanol (EtOH 75%). El sedimento obtenido se resuspendió en agua bidestilada estéril a una concentración aproximada de 1 μ g/ μ L y se visualizaron los moldes de ADN purificados mediante una electroforesis realizada en las mismas condiciones anteriores.

Transcripción *in vitro*: Una vez prontos los moldes apropiados se sintetizaron las ribosondas marcadas de acuerdo con el protocolo del *RNA labeling Kit* (Roche, Suiza) que permite la incorporación de DIG-UTP durante la transcripción *in vitro* del molde de ADN que se encuentre bajo el control de promotores específicos. La digoxigenina (DIG) es un esteroide derivado de la *dedalera* que se puede conjugar a un nucleótido e incorporar en los ácidos nucleicos. La detección de las moléculas que incorporaron DIG-UTP se realizó mediante una reacción inmunológica, utilizando anticuerpos específicos anti-DIG (ver más adelante). Debido a nuestro interés en generar hebras simples de ARN, una complementaria (sonda antisentido) y otra que tuviera la misma secuencia del ARNm (sonda sentido) de Sema3F y Sema3A, se realizaron cuatro reacciones de transcripción *in vitro* en paralelo utilizando en cada una los moldes linearizados en los sitios adecuados y purificados anteriormente, con las polimerasas respectivas (SP6 ó T7). Se estima que se incorpora un DIG-UTP cada 20-25 nt del transcripto. En condiciones óptimas se consiguen 10 μ g de ARN marcado a partir de 1 μ g de ADN molde. El ADN de partida ha de estar muy limpio y no ha de presentar '*nicks*' ya que las polimerasas podrían comenzar inespecíficamente la transcripción a partir de estos o bien generar abundancia de transcriptos abortivos. Por ejemplo, para sintetizar la sonda antisentido contra Sema3F se transcribió 1 μ g de plásmido rR3F linearizado con Sac II con la ARN polimerasa SP6 (40 unidades) y 2 μ L de una mezcla de NTPs (ATP 10 mM, CTP 10 mM, GTP 10 mM, UTP 6,5 mM, DIG-UTP 3,5 mM, en Tris-HCl, pH 7,5) en un volumen final 30 μ L de solución de transcripción que contenía DTT (100 mM) y el inhibidor de ARNasas *RNasin* (20 unidades) durante 2 hrs a 37 °C. La sonda sentido se sintetizó en las mismas condiciones, pero en este caso se utilizó como molde el plásmido rR3F linearizado con Pst I y la ARN polimerasa del fago T7 (40 unidades). Idem para rR3A.

Purificación de las ribosondas: Finalizada la incubación, se reservaron alícuotas (1 μ L) de cada mezcla de reacción para testear en gel de agarosa y se procedió a purificar las ribosondas marcadas. Dado que éstas, son moléculas de ARN simple hebra extremadamente lábiles y susceptibles de ser degradadas por ARNasas fue preciso trabajar en los pasos posteriores a la transcripción, en condiciones libres de ARNasas. Se agregó a la reacción de transcripción 1 μ L de ADNasa libre de ARNasas (20 U/ μ g ADN transcripto) para degradar el ADN molde y se incubó por 15 min a 37 °C. Al cabo de la incubación, se llevó el volumen a 80 μ L con agua tratada con DEPC y se agregó 8 μ L de EDTA (0,2 M). Se precipitó el ARN con un volumen de LiCl (4 M) y 3 volúmenes de etanol absoluto, durante toda la noche a -20 °C, después de lo cual se centrifugó (13.300 rpm, 30 min, 4 °C) y los *pellets* fueron lavados con 300 μ L de EtOH 70 %. Se tuvo

precaución de romper el *pellet* para que éste se limpie bien, tras lo cual se volvió a centrifugar (13.300 rpm, 30 min, 4 °C), se removió el EtOH y se lavó nuevamente con 50 µL de EtOH absoluto. Luego de centrifugar brevemente y remover el EtOH, se dejaron secar los *pellets* y una vez secos fueron resuspendidos en agua tratada con DEPC a una concentración aproximada de 1 µg/µL.

Visualización de las ribosondas y transferencia de las mismas para posterior control y cuantificación del

marcado: Se realizó una electroforesis en condiciones libres de ARNasas (agarosa 1 % en TBE 1X, con BrEt) de las siguientes muestras:(cada una preparadas con 2 µL de azul de carga libre de ARNasas): alícuotas de las ribosondas purificadas (3 µL) para visualizar la integridad y pureza de las mismas, 50ng de un marcador de tamaño de ARN y las alícuotas separadas previo al tratamiento con ADNasa. Luego de visualizar las muestras corridas bajo luz ultravioleta a través de un transiluminador y tomar una foto (Cámara Digital KODAK DC290), se cortó el gel para mantener la orientación y se realizó una transferencia en seco a membrana *Hybond N⁺* (Amersham), para luego revelar y confirmar si las ribosondas transcritas *in vitro* incorporaron DIG-UTP. Paralelamente, se hizo un *dot blot* para cuantificar los transcriptos obtenidos valorándolos contra un ARN marcado de concentración conocida. Para ello se sembró 1 µL de diluciones seriadas (1:10 a 1:10000) de cada ribosonda y también de una muestra de ARN marcado, ya valorado (10 ng/µL - 0,001 ng/µL) sobre una membrana *Hybond N⁺* (Amersham). Luego de fijar tanto los transcriptos que habían sido transferidos en seco del gel a una membrana como los *dots*, con calor (80 °C, 2 hrs), se incubaron las membranas con un anticuerpo anti-DIG conjugado a la fosfatasa alcalina (dilución final 1:3000 en solución de bloqueo) y se reveló con los sustratos correspondientes (más adelante más detallado). La visualización de los transcriptos confirmó la incorporación de DIG-UTP a los mismos y la calibración de las ribosondas, mediante el *dot blot*, indicó que las sondas antisentido tenían una concentración de 1 µg/µL mientras que las sondas sentido estaban dos órdenes de magnitud menos concentradas, 0,01 µg/µL.

(C) Obtención de cortes uterinos para HIS

Luego de su disección, los cuernos uterinos fueron congelados rápidamente a -20 °C en el montante *Cryomatrix* (10 % alcohol polivinílico; 4 % polietilenglicol, *Shandon*, EEUU). generando bloques que contenían fragmentos de cuernos uterinos provenientes de animales de ambos grupos experimentales (controles prepúberes, n=4; tratados con E2, n=4). Se realizaron cortes a congelación (12 µm) transversales al eje mayor del cuerno uterino los que fueron montados en portaobjetos estériles (*Silane-PrepTM slides*, Sigma).

Para hacer accesible el ARNm del tejido a la sonda, los cortes fueron lavados (2 x 10 min) por goteo en PBST (PBS 1X, Tween-20 0,1 %) libre de ARNasas y posteriormente incubados por 15 min a Tamb con proteinasa K (concentración final = 1 µg/mL en PBST). Al cabo de esta digestión, los cortes fueron lavados 3 veces (3 x 5 min) en PBST y luego se inactivó la proteinasa K incubando en PBST frío 5 min. Posteriormente, se fijaron los cortes en paraformaldehído (4 %) y glutaraldehído (0,1 %) en PBST durante 20 min. Luego de remover la solución de fijación, los cortes fueron lavados dos veces en PBST e incubados durante 10 min a 65 °C para inactivar las fosfatasas alcalinas endógenas.

(D) PRE-HIBRIDACIÓN E HIBRIDACIÓN

Los cortes fueron deshidratados e incubados con una solución de pre-hibridación (formamida desionizada 50 %; SSC 1,3X ,pH 5,3; EDTA 5 mM; ARNt de levadura 50 µg/mL; Tween-20 0,2 %; CHAPS 0,5 % (Sigma); heparina 100 µg/mL) durante 2 hrs a 50 °C. Posteriormente se separaron los portaobjetos en 4

grupos, generándose para cada semaforina en estudio un grupo control para hibridizar con la sonda sentido y el otro para hibridizar con la sonda antisentido. Las sondas fueron desnaturalizadas (95 °C, 3 min.) y llevadas inmediatamente a hielo por 5 min. Luego se centrifugaron brevemente, fueron diluidas en solución de hibridización (solución de pre-hibridación + sulfato de dextrano 5%) a una concentración final de 2 ng/μL y conservadas en hielo. Se retiró la solución de pre-hibridación de los portaobjetos y se colocó la solución de hibridización con la sonda respectiva sobre cada grupo de cortes. Éstos fueron luego cubiertos con cubreobjetos libres de ARNasas e incubados a 50 °C con PBS y formamida toda la noche en cámara húmeda. Una vez transcurrido el tiempo de hibridización, los portas fueron sumergidos en SSC 2X precalentado e incubados a 50 °C hasta que se desprendieran los cubreobjetos. Posteriormente se lavó 2 veces con SSC 2X-50 % formamida a 50 °C durante 20 min cada vez en *coplin* y luego se realizó un lavado por goteo en las mismas condiciones de rigurosidad. Luego se lavó dos veces con SSC 1X-50 % formamida por 20 min cada vez, a 50 °C y por último se realizaron dos lavados en SSC 1X a Tamb de 15 min cada uno. Una vez removido el exceso de ribosonda marcada que no hibridizó de forma específica, se procedió al bloqueo y la incubación de los cortes con el anticuerpo anti-DIG, para la posterior detección de los híbridos.

Se prebloqué lavando los cortes dos veces con MAB-Tween (MAB-T= Acido maleico 100 mM (Sigma), pH 7,5, NaCl 150 mM; Tween-20 0,1%) durante 10 min cada vez e incubando posteriormente por 30 min en MAB-B (MAB 1X, BSA 1%) a Tamb. Luego se incubó con una solución de bloqueo que contenía suero de oveja (inactivado a 55 °C por 30 min) al 5 % en MAB-B durante 2 hrs, a Tamb y en cámara húmeda. Luego de remover la solución de bloqueo, los cortes fueron incubados toda la noche, en cámara húmeda a 4 °C, con una dilución (1:2000 en solución de bloqueo) del anticuerpo anti-DIG conjugado a la fosfatasa alcalina (Boehringer Ingelheim). Finalmente, se removió la solución del anticuerpo y los cortes fueron lavados brevemente con MAB-T (3x10 min) y luego tres veces con la misma solución durante 30 min cada vez.

REVELADO Y SEGUIMIENTO AL MICROSCOPIO: Se procedió al revelado por el agregado de sustratos de la enzima – una sal y un compuesto fosfato- (4.5 μL NBT , del inglés *Nitro Blue Tetrazolium*, y 3.5 μL de 5-bromo-1-cloro-3-indol fosfato, BCIP, por cada 1mL de solución de revelado). El producto de la reacción produce un precipitado azul insoluble permitiendo visualizar al microscopio de luz transmitida los híbridos (sonda-ARNm específico) en los cortes. De esta forma, los preparados fueron incubados en cámara húmeda, protegidos de la luz y se siguió la reacción de desarrollo de color por observación al microscopio, verificando cada 20 min. El tiempo de revelado puede ser prolongado; en nuestro caso hubo que dejar los cortes hasta el otro día por lo que se hicieron cambios de la solución de revelado. La reacción de color se detuvo con PBST y luego los preparados fueron fijados con PFA (4% en PBS 1X) durante 20 min, lavados y montados en una solución acuosa de glicerol (70%). Tras la observación de los preparados, la adquisición de imágenes digitales se realizó con una cámara digital (*CoolSNAP-Pro Monochrome*) bajo idénticas condiciones.

Histología e Histoquímica de los preparados de HIS: Luego de registrar los resultados de la HIS para Sema3A y 3F, los preparados fueron desmontados, lavados en PBS y fijados en PFA 4%. Un grupo de preparados fue teñido con hematoxilina y eosina y el resto con hematoxilina y Sirius Red (Direct Red 80, Aldrich Chemical Company, EEUU), un marcador específico de eosinófilos (Bogomoletz, 1980).

Análisis ultraestructural (Microscopía Electrónica de Transmisión). Con el fin de avanzar en la caracterización de los tipos celulares que contenían transcriptos para Sema3A y 3F, se examinó el tejido conectivo uterino (ver RESULTADOS Capítulo 2) a nivel ultraestructural, mediante microscopía electrónica de transmisión. Brevemente, se disecaron fragmentos de cuernos uterinos provenientes de ratas tratadas con E2. La administración de estrógeno a los animales y la eutanasia de los mismos fueron realizados siguiendo los protocolos antes mencionados (ver 1. Animales y tratamientos). Los fragmentos de cuernos uterinos fueron fijados, en una primera instancia por inmersión con gluteraldeído (2,5 % en solución tampón fosfato) y posteriormente con tetróxido de osmio (1 % en solución tampón fosfato), luego de lo cual fueron deshidratados e incluidos en araldita *Durcupam ACM* (Fluka, EEUU). Los cuernos uterinos fueron cortados con un ultramicrotomo (Power Tome XL) y los cortes semifinos (250nm) obtenidos fueron teñidos con azul de toluidina (1 %) y visualizados por luz transmitida, con el fin de seleccionar las zonas de interés (que contenían transcriptos de Sema3F). Posteriormente, se realizaron cortes ultrafinos (65-70 nm) de las áreas seleccionadas, que fueron contrastados con acetato de uranilo (2 %) y citrato de plomo (1 %) para su visualización en el microscopio electrónico Jeol 100 CXI operado a 60kV. Estos estudios fueron realizados en la Plataforma de Microscopía Electrónica del IIBCE por una estudiante del laboratorio, Lic. GF Martínez.

2.4. Estudios de expresión de Neuropilinas

2.4.1 Trazado retrógrado de las neuronas que inervan el útero

Para la identificación de las neuronas que inervan al útero se utilizó el trazador retrógrado *Fluorogold* (FG, *Fluorochrome. Inc.* USA) también conocido como hidroxistilbamidina ($C_{18}H_{24}N_4O_7S_2$). Es un trazador hidrofílico fluorescente cuyas propiedades espectrales varían con el pH. El FG diluido al 2 % en solución acuosa posee un pH=4,5 y presenta los siguientes máximos de excitación y emisión, $\lambda_{ex}/\lambda_{emisión}=323/408$ nm. Mientras que el rango de longitudes de onda necesario para excitar al FG unido a membranas, a un pH fisiológico de 7.4, varía entre $\lambda_{ex} = 350-395$ y el de emisión se ve corrido hacia longitudes de onda más largas, $\lambda_{emisión}=530-600$ nm (www.fluorochrome.com), dando un color amarillo-dorado cuando el tejido es procesado en una solución tampón a pH neutro.

El FG es captado por endocitosis y transportado por los axones hacia el soma neuronal, mediante un transporte axonal rápido que oscila entre velocidades de 100-200 mm/día y es mediado por pequeñas vesículas de membrana (Ochs, 1972; Oztas, 2003). Además de ser intensamente fluorescente y estable, este marcador presenta numerosas ventajas: a) no difunde fuera de la neurona que ha sido marcada retrógradamente; b) posee vida media larga (hasta más de 1 mes); y c) ha sido extensamente usado como marcador retrógrado de neuronas en combinación con técnicas de inmunohistoquímica (Ju y col., 1989). Esta última propiedad permite identificar las neuronas trazadas bajo el microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de excitación ultravioleta de banda ancha (Excitación 323nm, Emisión 620nm a pH neutro), y visualizar en el mismo campo la emisión roja de un fluorocromo como el Alexa 568.

Inyección del trazador en el útero: Para la inyección del FG en el útero los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (45 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) y el cuerno uterino izquierdo expuesto a través de una pequeña incisión dorsal. Utilizando una microjeringa tipo Hamilton de 10 μ L se inyectaron en el tercio superior del cuerno uterino, 1 o 2 puntos de 2 a 4 μ L de FG al 4 % en suero fisiológico. Se tuvo especial cuidado en que los puntos de inyección quedaran comprendidos dentro de la pared del útero, evitando que el líquido cayera dentro de la luz del órgano. Los puntos de inyección fueron secados y lavados con abundante suero fisiológico para eliminar el exceso de marcador que pudiera haber fluido desde el punto de inyección y evitar así que el mismo fuera captado por terminales nerviosos de órganos adyacentes. Se suturaron las capas musculares y la piel, y se dejó que los animales se recuperaran completamente antes de devolverlos al Bioterio. Los animales fueron sacrificados luego de 10-12 días de realizada la inyección del trazador. Este tiempo es suficiente para permitir que el mismo sea transportado hasta el soma neuronal y que se acumule en cantidades que permitan su fácil reconocimiento.

Disección de ganglios simpáticos y ganglios de la raíz dorsal: Se disecó la región tóraco-lumbar de la cadena simpática paravertebral ipsilateral al sitio de inyección con FG. Se recolectaron los ganglios incluidos en los niveles T10 a L3 porque los mismos contienen la mayoría de las neuronas simpáticas que proyectan a la región cefálica del útero (Houdeau y col., 1997; Richeri y col., 2005). Posteriormente se disecaron los ganglios de la raíz dorsal ipsilaterales al sitio de inyección de FG. Se seleccionaron los ganglios comprendidos entre la región T13 a L2 por ser los que contienen las neuronas que proyectan a la región cefálica del útero (Papka y Traurig, 1992; Chalar y col., 2003). En ambos casos, los ganglios obtenidos de cada grupo experimental, fueron agrupados en un mismo bloque de Cryomatrix.

2.4.1 Inmunodetección *in situ* de Neuropilinas

Procesamiento de los tejidos: Se utilizaron dos protocolos diferentes de fijación y procesamiento de los tejidos con el fin de optimizar la calidad y especificidad de la inmunomarcación de cada anticuerpo utilizado.

- (A) Para la demostración de neuropilina-1 en el útero y los somas ganglionares los animales fueron perfundidos transcardíacamente primero con solución salina seguido de fijador siguiendo el protocolo ya descrito al comienzo de esta sección (ítem 2.1.; pág.43). Los cortes de 12 μ m de espesor fueron obtenidos en un crióstato (Leica, Alemania) a -22 °C montados sobre portaobjetos gelatinizados.
- (B) Para la demostración de neuropilina-2 en el útero y los somas ganglionares los animales fueron perfundidos transcardíacamente con 25 mL de solución salina. Se evitó fijar por perfusión, debido a que la misma interfería con el desempeño del anticuerpo utilizado. Completada la perfusión los tejidos disecados de cada grupo experimental, fueron agrupados e incluidos en Cryomatrix previo a ser congelados a -20 °C. Los bloques de tejido fueron cortados a 12 μ m en el crióstato, recogidos sobre portaobjetos gelatinizados y posteriormente fijados por inmersión en PFA 1 % durante 1 minuto.

Los cortes se realizaron en un solo día y se obtuvieron entre 12-20 portaobjetos por bloque, cada uno de los cuales contenía entre 6 y 8 cortes.

Inmunomarcación y microscopía: Idem pag. 44.

Anticuerpos contra NRP1. Se probaron dos distintos, uno comercial anti-NRP1 (Calbiochem) y un antisuero de conejo inmunizado para neuropilina-1 (JH2528_7.21.97 donación del Dr. Ginty, EEUU). Se realizó la puesta a punto de la inmunotinción de los anticuerpos en muestras de animales control y tratados crónicamente con E2. En el caso del anti-NRP1 de *Calbiochem* ninguno de los protocolos probados, que fueron diseñados según las evidencias disponibles a la fecha acerca de detección inmunohistoquímica de NRP1 en cerebro (Hou et al 2008), generó resultados confiables ni siquiera luego de recuperación antigénica. Sin embargo, el antisuero de conejo contra NRP1 sí mostró un buen desempeño, eligiéndose para realizar todos los ensayos de inmunohistoquímica (1:1600 dilución final), en combinación con un secundario GAR Alexa 568 (1:1000 dilución final).

Anticuerpo contra NRP2. Se recibió una donación del Dr. A. Bagri (Genetech; EEUU) previamente contactado en el EMBO Workshop “*Semaphorin Function and Mechanisms of Action*” Francia (2008), de un anticuerpo dirigido contra el receptor de Sema3F, neuropilina-2 (Caunt y cols., 2008). Dicho investigador formó parte del grupo de Tessier-Lavigne (Howard Hughes Medical Institute, UCLA, EEUU) quien demostró mediante una serie de publicaciones que las neuronas simpáticas mantenidas en cultivo respondían a Sema3F mediante neuropilina-2 (Chen y col., 1998; 2000). Los protocolos probados fueron diseñados según las evidencias disponibles a la fecha acerca de la expresión de NRP2 en neuronas simpáticas del Ganglio cervical superior, *in vitro* (Chen y col., 1998) y los escasos estudios inmunohistoquímicos realizados con el mismo anticuerpo anti-NRP2 en otros sistemas (Caunt y col., 2008). El doble marcaje de los cortes uterinos se realizó utilizando anti-NRP2 y otro marcador de las fibras simpáticas, como lo es la tirosina hidroxilasa (TH). Para visualizar ambas inmunotinciones fue preciso seleccionar dos anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos que cumplieran los siguientes requisitos: (1) dirigidos contra inmunoglobulinas de distintas especies; y (2) conjugados a fluorocromos cuyos espectros de emisión no se solaparan.

Diluciones de los anticuerpos: anti-NRP2 (1:150); anti-TH (1:400; Affinity); anticuerpos secundarios, anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón, ambos producidos en cabra y conjugados a los fluorocromos: Alexa-Fluor 568 (*Life Technologies-Molecular Probes*, USA) o FITC (1:250; Sigma-Aldrich, USA).

Identificación de neuronas FG+, visualización de inmunoreactividad y captura de las imágenes digitales:

Los preparados fueron visualizados bajo el microscopio (Nikon E800) equipado con epifluorescencia y los espejos dicroicos apropiados. Se procedió a identificar las neuronas marcadas con Fluorogold (FG+) iluminando la preparación con luz ultravioleta. Utilizando un objetivo 40x, se capturaron imágenes digitales de todas aquellas neuronas que fuesen FG+ y presentasen perfil nuclear, utilizando una cámara monocroma CoolSNAP-Pro asociada al programa Image ProExpress de Media Cybernetics, USA. Se tomaron imágenes cada 4 cortes (dejando un espacio de 36µm entre cada imagen), para evitar que una misma neurona fuera registrada dos veces en cortes adyacentes.

Se utilizó una cámara digital monocroma porque es clave para realización de estudios densitométricos. Las cámaras ‘color’ capturan la imagen a través de tres canales independientes y el resultado final puede verse alterado por la eficiencia parcial de adquisición en cada canal. Esta limitación no se resuelve transformando las imágenes color en imágenes monocromas, porque el problema de adquisición persiste luego de esta maniobra. Se tuvo especial precaución en que las lámparas de fluorescencia usadas estuvieran dentro del rango de vida útil (200 horas) para evitar alteraciones de longitud de onda.

Una vez identificadas, las neuronas fueron visualizadas bajo la luz verde (G-2B, Nikon) para evaluar la inmunofluorescencia generada por la emisión correspondiente al anticuerpo secundario conjugado a Alexa 568 en el mismo campo visual. Dado que las neuronas expresan niveles variables de fluorescencia,

determinó el tiempo adecuado para las neuronas que expresaban los niveles más altos de fluorescencia. En ensayos previos se detectó que la estrategia inversa (utilizar como tiempo de adquisición el que permite obtener una imagen más intensa de las neuronas que expresan los niveles más bajos de fluorescencia) provoca fenómenos de saturación indeseables y poco confiables cuantitativamente en las neuronas que presentan niveles de marcación mayores. Una vez establecidos estos parámetros todas las imágenes fueron capturadas bajo idénticas condiciones para luego proceder al análisis densitométrico, no realizándose ninguna corrección de brillo o contraste.

Basados en estudios previos sobre la dinámica de decaimiento de la fluorescencia en las preparaciones inmunomarcadas (Cowen y Thrasivoulou, 1992), la captura de las imágenes digitales se realizó dentro de las primeras 48 horas de completada la inmunomarcación. En todos los casos los preparados fueron mantenidos a -20°C hasta su utilización y se evitó que los mismos fueran sometidos a ciclos de congelado y descongelados que pudieran afectar la intensidad de la fluorescencia. De manera similar, la captura de imágenes pertenecientes a cada grupo experimental (control y tratado) se realizó en el mismo día, y de no ser posible, se identificaron las imágenes obtenidas cada día, para verificar potenciales cambios en los niveles de fluorescencia debidos a variaciones en las condiciones microscópicas. Todas las imágenes digitales fueron almacenadas en formato TIFF, escala de grises de 8 bits.

Densitometría microscópica: Sobre las imágenes digitales de las neuronas FG+ inmunomarcadas se delinearon con la ayuda del mouse los perfiles citoplasmáticos y nucleares generando una máscara citoplasmática sobre la cual se cuantificó la intensidad de inmunofluorescencia específica como densidad óptica por unidad de área (D.O.; Figura A). Se utilizó una escala de 256, en donde 0 es el negro puro y 255 representa el blanco puro. Se consideró como señal positiva de inmunotinción toda aquella que superase tres veces a la señal no-específica de fondo.

Se cuantificó también el área citoplasmática. Con este dato y considerando que alteraciones del tamaño de las neuronas, podrían provocar una 'dilución' o 'concentración' de la marca, la intensidad de inmunofluorescencia se midió además como la densidad óptica integrada (D.O.I) que resulta de multiplicar la D.O. x area citoplasmática.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las mediciones morfométricas y densitométricas fueron analizados mediante la prueba *Kolmogorov-Smirnov* utilizando el programa *Graph Pad Prism 4*, con el fin de evaluar el modo de distribución de los mismos. En función de los resultados de este análisis, los datos obtenidos fueron comparados mediante pruebas estadísticas apropiadas. En todos los casos, los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Las medidas del área neuronal presentaron una distribución normal, fueron expresadas como media + EEM (error estándar de la media) y comparadas por un ANOVA de una vía seguida de la prueba de *Tukey Kramer* para comparaciones múltiples.

Capítulo 1. Semaforinas en el útero: una visión desde la proteína

Detección del dominio SEMA en el útero y modulación por el estrógeno

Con el fin de evaluar si el útero de la rata expresa semaforinas, se utilizó el anticuerpo H-300 que reconoce al dominio SEMA (anti-SEMA). Los ensayos de inmunodetección *in situ* mostraron en la rata prepúber, la presencia de marcación en el epitelio y las glándulas del endometrio, siendo esta señal muy débil a nivel del miometrio (Figura 1A). Luego del tratamiento con E2, se observó un aumento en la marcación para SEMA tanto en el miometrio como en el endometrio (Figura 1B).

Los estudios densitométricos de medición de intensidad de fluorescencia (densidad óptica, D.O.) mostraron que en el epitelio endometrial y sus glándulas asociadas, este aumento era del 30%, mientras que en el miometrio era de un 55%. La D.O. de la señal para SEMA aumentó de manera similar en ambas capas miometriales (Figura 1C).

Complementariamente, los ensayos de WB realizados en colaboración de la Dra. Isabella Gavazzi (*King's College* Londres, UK), confirmaron que los niveles proteicos de SEMA aumentan en el útero en respuesta al estrógeno (78% de aumento respecto al control) (Figura 1D).

En respuesta al tratamiento con E2, se observó inmunorreactividad para SEMA en los granulocitos eosinófilos que migran desde la circulación sanguínea y se localizan principalmente alrededor de los vasos y en el estroma endometrial (flechas en Figura 1B). Cabe mencionar, que estos tipos celulares autofluorescen a distintas longitudes de onda (Figura 2) lo cual dificulta la interpretación de la señal en este caso particular. Como veremos en capítulos posteriores, al menos parte de la fluorescencia observada en estas células corresponde a la presencia de semaforinas.

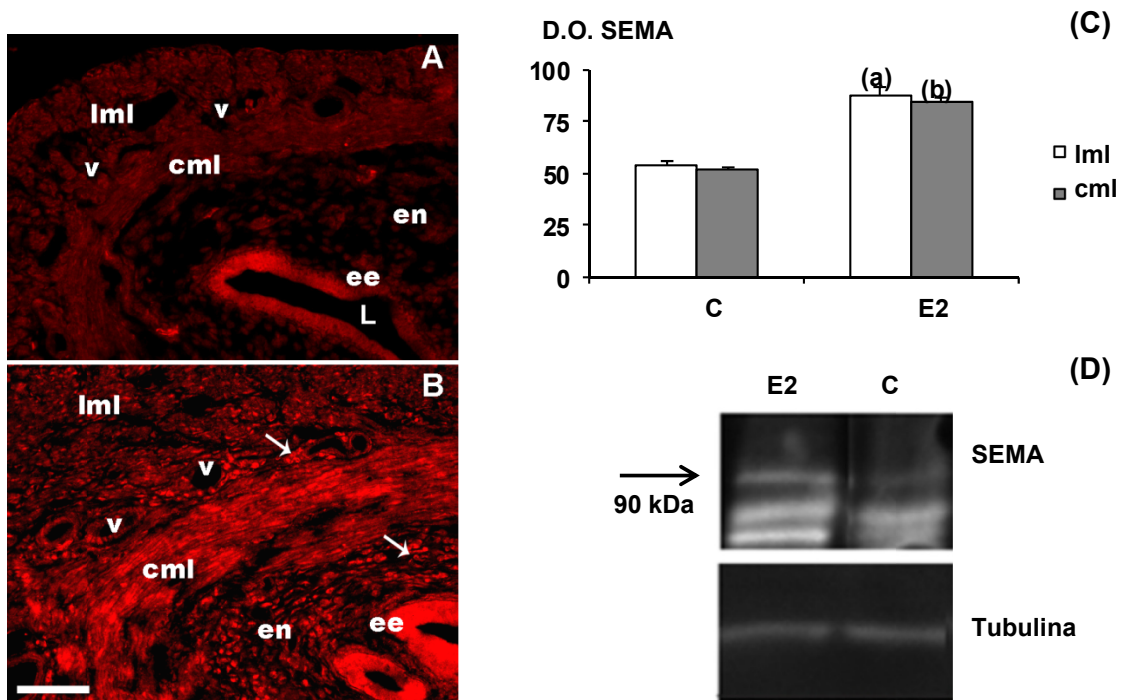


Figura 1. Dominio SEMA en el útero y su inducción por el estrógeno. (A y B) Cortes a congelación de cuernos uterinos de ratas prepúberes control (A) y tratadas crónicamente con estrógeno (B) inmunomarcados con anti-SEMA (falso color). Las flechas en B señalan grupos de granulocitos eosinófilos. (C) Análisis densitométrico de la inmunorreactividad detectada en el miometrio. La densidad óptica (D.O.) de la señal aumenta en ambas capas miometriales luego del tratamiento con E2. (a) Diferencia con la lml del control (C) ($p < 0.0001$). (b) Diferencia con la cml del control (C) ($p < 0.0001$). (D) Análisis por *Western blot* de cantidades equivalentes de proteína extraída de cuernos uterinos de ratas tratadas con estradiol (E2) y animales control (C) utilizando los siguientes anticuerpos, anti-SEMA y anti-tubulina. *lml*, capa miometrial longitudinal; *cml*, capa miometrial circular; *ee*, epitelio endometrial; *en*, endometrio; *L*, luz; *v*, vaso sanguíneo. Barra de calibración: 20 μm .

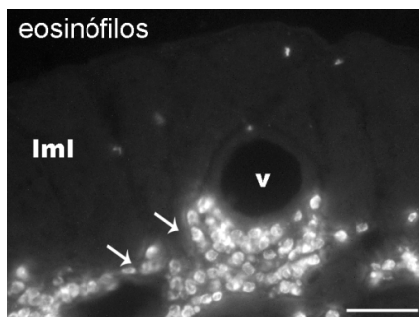


Figura 2. Fluorescencia inespecífica de los granulocitos eosinófilos que infiltran el útero en respuesta al estrógeno. Criocorte de cuerno uterino de una hembra tratada con E2. Las flechas indican grupos de eosinófilos que emiten fluorescencia al ser estimulados con luz ultravioleta. Barra de calibración: 10 μm .

Correlación de la inmunorreactividad para SEMA y la innervación uterina

Dado que las semaforinas, además de su clásica función neural, participan en otros procesos, se correlacionaron los niveles de inmunorreactividad para SEMA en el útero con el comportamiento de la innervación simpática y sensorial valorada por inmunofluorescencia.

En el miometrio de las ratas control, los bajos niveles de SEMA coincidieron con la presencia de la densa innervación simpática y sensorial característica de la etapa prepuberal (Figuras 3A, B, C). De manera similar, el plexo vascular miometrial que posee una rica innervación, no fue inmunomarcado con SEMA (Figuras 3A, B). Luego del tratamiento con E2, el aumento de SEMA en el miometrio coincidió con la casi completa desaparición de las fibras nerviosas simpáticas (Figuras 3D, E), así como con una marcada reducción de la densidad de fibras sensoriales (Figura 3F). En el endometrio, la escasa innervación que se observa en los controles desapareció por completo tras el tratamiento con E2 (Figuras 3E, F), coincidiendo con el aumento de la inmunorreactividad para SEMA en los epitelios luminal y glandular (Figura 3D).

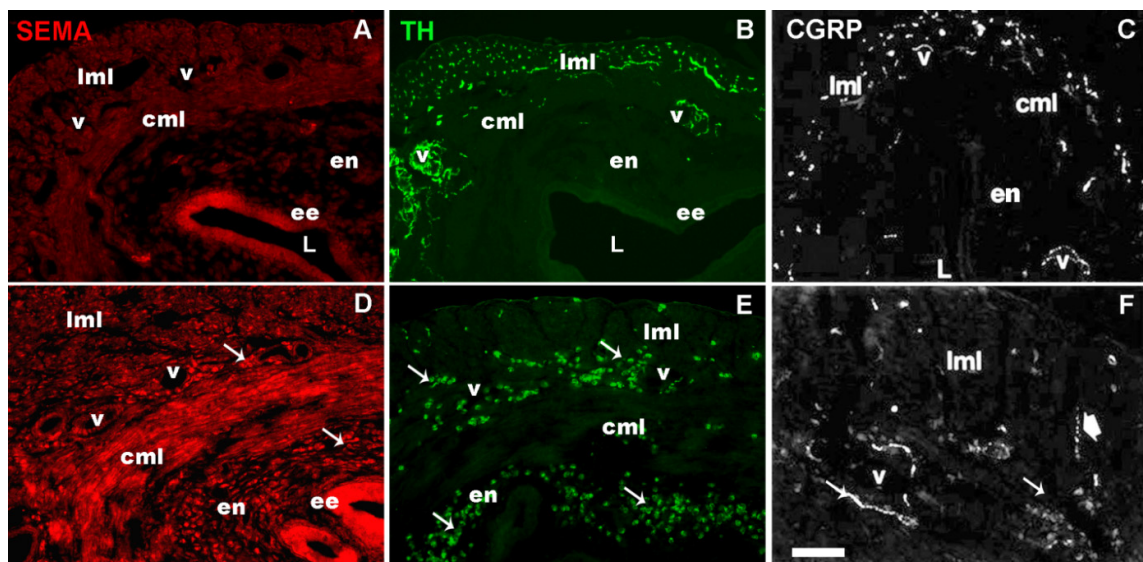


Figura 3. Correlación espacio-temporal entre la señal para SEMA y la distribución de los nervios intrauterinos. Cortes a congelación de cuernos uterinos de ratas prepúberes control (A-C) y tratadas con E2 (D-F). Se muestran los efectos del tratamiento sobre la inmunomarcación para SEMA (A y D) y sobre la innervación simpática (anti-TH; en B, E) y sensorial (anti-CGRP; en C, F). Se detectó una correlación negativa entre la intensidad de inmunomarcación para SEMA y la presencia de nervios simpáticos y sensoriales en el órgano. Nótese que cuando los niveles de estrógeno son bajos, hay baja inmunorreactividad para SEMA en las regiones más densamente innervadas, tales como la capa miometrial longitudinal (lml) y los vasos sanguíneos (v). Cuando los niveles de estrógeno son altos, el miometrio intensamente marcado con anti-SEMA está desprovisto de nervios simpáticos y pobremente innervado por fibras sensoriales (punta de flecha en F). Flechas delgadas en D, E y F, granulocitos eosinófilos. cml, capa miometrial circular; ee, epitelio endometrial; en, endometrio; L, luz. Barra de calibración: 20 μ m (A-D); 30 μ m (E); 15 μ m (F).

Semaforinas y gestación

Si bien el eje de esta tesis está enfocado a los efectos del estrógeno, nos pareció relevante analizar la inmunorreactividad de SEMA durante la gestación. Este interés surge de los antecedentes publicados por Marzioni y col. (2004) que evidenciaron la presencia de Sema3A en el miometrio del útero de mujeres durante el embarazo.

En las hembras adultas control (vírgenes en diestro) se detectó una tenue señal para SEMA en todo el útero (Figura 4A). Los estudios densitométricos mostraron que a nivel miometrial, la intensidad de marcación era significativamente mayor (20%) en la capa muscular circular (CMC) que en la longitudinal (CML). En las hembras no-gestantes, el plexo vascular miometrial es la región del útero más densamente inervada (Figura 4B) y no se detectó inmunorreactividad para SEMA en esta región (Figura 4A).

Al término de la gestación, se visualizó una intensa inmunorreactividad tanto en el miometrio como en el epitelio endometrial (Figura 4C). Los estudios densitométricos mostraron que el aumento de SEMA a nivel miometrial fue generalizado (18% en la CMC y 21% en la CML). El intenso aumento en la señal para SEMA se correlacionó con una completa denervación simpática del útero (Figura 4D). La posible correlación con el comportamiento de la inervación sensorial no fue analizada. Sin embargo, hay antecedentes de que la gestación afecta a todos los tipos de nervios intrauterinos, incluyendo a las aferentes sensoriales (Sternquist y col., 1985; Lundberg y col., 1989; Traurig y Papka, 1993; Hasee y col., 1997).

A 6 días luego del parto y coincidiendo con el re-crecimiento de las fibras nerviosas simpáticas en el útero (Figura 4F), la inmunorreactividad para SEMA se redujo a niveles similares a los observados en las hembras no-gestantes (Figura 4E).

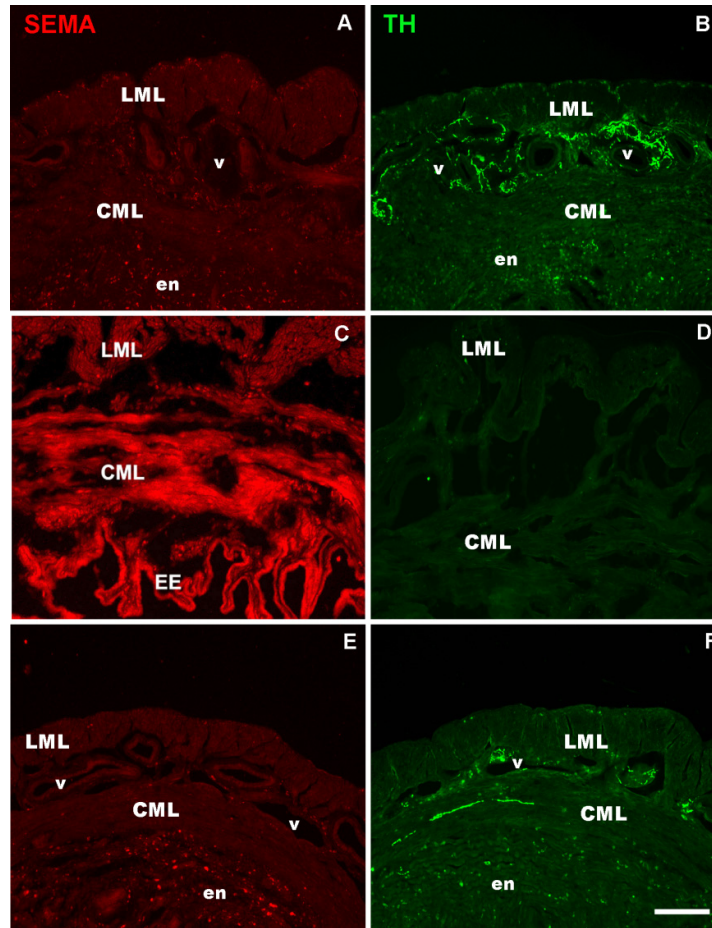


Figura 4. Correlación espacio-temporal entre la señal para SEMA y la distribución de los nervios simpáticos intrauterinos en la rata adulta. Cortes a congelación de cuernos uterinos de ratas adultas vírgenes en diestro (A, B); gestantes a término (19 días post coito), (C, D); y a los 6 días luego del parto (E, F). Se muestran los efectos de la gestación sobre la inmunomarcación para SEMA (A, C, E) y su correlación con el comportamiento de los nervios simpáticos (B, D, F). Nótese que los niveles de SEMA aumentan al término, coincidiendo con la degeneración de los nervios y disminuye en el postparto cuando estos regeneran. LML: capa miometrial longitudinal. CML: capa miometrial circular EE, epitelio endometrial; en, endometrio; v, vaso sanguíneo. Barra de calibración= 30 µm.

El análisis cuantitativo por *Western blot*, confirmó la presencia de mayores niveles de SEMA en los extractos de úteros de hembras gestantes (aumento del 63% al término del embarazo, respecto al control) (Figura 5). Un hallazgo llamativo e interesante de destacar, fue la visualización del mismo perfil de bandas detectado luego del tratamiento con estrógeno. En estos ensayos no se valoraron los niveles de SEMA en el postparto.

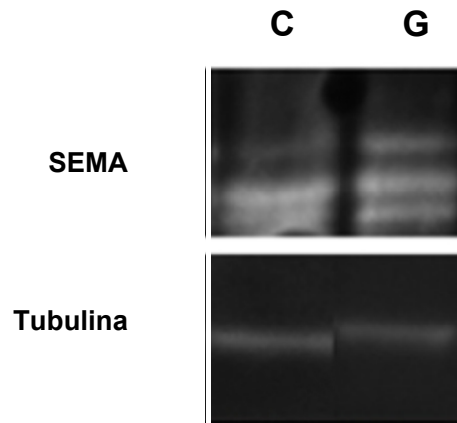


Figura 5. Dominio SEMA en extractos uterinos y su inducción al término de la gestación. Análisis por Western blot de cantidades equivalentes de proteína extraída del cuerno uterino de ratas adultas control (C) y gestantes a término (G) utilizando los anticuerpos, anti-SEMA y anti-tubulina.

Conclusiones parciales

Tomados en su conjunto los resultados mostrados en este capítulo señalan que el útero de la rata expresa SEMA en la etapa prepuberal y adulta, y que sus niveles se incrementan en respuesta al estrógeno y al término de la gestación. Se demostró la existencia de una correlación espacio-temporal entre los incrementos de SEMA y la disminución de la inervación simpática y sensorial intrauterina que ocurre en respuesta al estrógeno y el embarazo. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis. Sin embargo, cabe recordar que el dominio SEMA está presente en todas las proteínas de la familia de las semaforinas, por lo cual para avanzar en el significado de la correlación detectada fue preciso continuar con la identificación de los miembros específicos involucrados.

Capítulo 2. Identificación de semaforinas específicas

Sema3A

Los ensayos proteicos presentados en el capítulo anterior, demostraron la presencia de semaforinas en el útero. Para avanzar en la identificación de los miembros involucrados, comenzamos buscando semaforinas con acciones demostradas sobre la inervación simpática y sensorial. Los miembros secretados del grupo 3 (Sema3s) constituyen las señales que han sido mejor caracterizadas como reguladores negativos de los nervios periféricos. En particular, Sema3A y Sema3F aparecen como principales moduladoras de fibras nerviosas sensoriales y simpáticas, tanto en humanos como en roedores.

Sema3A - Aspectos generales

Sema3A es un potente inhibidor del crecimiento de los nervios sensoriales y genera su repulsión actuando a distancia (Püschel y col., 1995; Gavazzi, 2001; Marzioni y col., 2004). También repele a las fibras simpáticas in vitro (Püschel y col., 1995; Chen y col., 1998; Damon, 2006), provocando además el colapso de los conos de crecimiento de fibras sensoriales (Messersmith y col., 1995; Song y col., 1998; Dontchev y Letourneau, 2002) y simpáticas (Renzi y col., 1999). El receptor de unión universal y necesario para mediar los efectos biológicos de Sema3A, es la neuropilina-1 (NRP1) (He y Tessier-Lavigne, 1997; Kitsukawa y col., 1997; Kolodkin y col., 1997; Sheperd y col., 1997).

El papel de la vía Sema3A/NRP1 en el direccionamiento de las fibras nerviosas in vivo, quedó demostrado en estudios con ratones K.O. en los cuales la inactivación del gen que codifica para Sema3A o NRP1 altera el patrón de distribución de la fibras nerviosas periféricas (Taniguchi y col., 1997; Kitsukawa y col., 1997). El fenotipo más destacado de estos animales es la des-fasciculación de los tractos nerviosos y la invasión de los axones que viajan por ellos hacia territorios normalmente no inervados. Esto es debido a que durante el desarrollo, Sema3A restringe el crecimiento de los axones a dominios específicos del embrión (Messersmith y col., 1995; Behar y col., 1996; Schwarting y col., 2000; Taniguchi y col., 1997; 2003). Sema3A es sintetizada por numerosos efectores periféricos. Por ejemplo, los cardiomiocitos de los roedores la expresan Sema3A, y las evidencias obtenidas de ratones mutantes indican que la misma contribuye al establecimiento del patrón de inervación simpática en los tejidos cardíacos (Ieda y col., 2007; Ieda y Fukuda, 2009).

Sema3A también afecta el establecimiento del patrón de distribución de las proyecciones centrales de neuronas de los GRD, estando la sensibilidad de estas neuronas estrictamente regulada (Messersmith y col., 1995; Puschel y col., 1996; Taniguchi y col., 1997). En etapas embrionarias muy tempranas de los roedores, todas las neuronas de los GRD son repelidas por Sema3A. Sin embargo, en embriones de 14 días estos efectos están restringidos a la subpoblación de fibras aferentes de diámetro pequeño sensibles a NGF (A-delta y C). Así la Sema3A expresada por el asta ventral de médula espinal previene específicamente la entrada de estas fibras a la región (Messersmith y col., 1995; Pasterkamp y col., 2000). Asimismo, ha sido observado que en mutantes que no expresan NRP1, las proyecciones periféricas de las neuronas sensoriales rebasan los efectores que deben inervar (Kitsukawa y col., 1997).

En la vida adulta, numerosas evidencias indican que la vía Sema3A/NRP1 es re-utilizada en diversos sistemas neuronales, tanto centrales como periféricos (Tanelian y col., 1997; Nangle y Keast, 2009; Gavazzi 2001; Pasterkamp, 2012; Kamo y col., 2013; Vo y col., 2013). Sema3A se expresa en distintos efectores del adulto (Luo y col., 1993; Shepherd y col., 1996; Giger y col., 1998; Marzioni y col., 2004) a la vez que NRP-1 se en neuronas sensoriales de los GRD de roedores maduros (Pasterkamp y col., 1998a; Reza y col., 1999; Gavazzi y col., 2000). Los efectos repulsivos iniciados por esta semaforina son utilizados por el sistema olfatorio adulto, el cual está sujeto a remodelación durante toda la vida (Pasterkamp y col., 1999b; Degano y col., 2009).

Por otra parte, Sema3A es inducida de forma transitoria en ciertos tipos celulares luego de lesiones del sistema nervioso central, evitando la regeneración de distintas subpoblaciones axonales a través de la cicatriz (Pasterkamp y col., 1998a; Harel y Strittmatter, 2006; Kaneko y col., 2006). Algunas subpoblaciones de neuronas del cerebro de roedores adultos se rodean de un tipo de matriz extracelular densa y especializada, denominada *cesta perineuronal* (PNNs, del inglés perineuronal nets) (Bruckner y col., 1996; 2006; Hendry y col., 1988; Steindler y Cooper, 1986). Recientemente se ha demostrado que Sema3A se localiza en las PNNs, aunque su papel no ha sido completamente esclarecido (Vo y col., 2013). Dado que la aparición de las PNNs se asocia con la pérdida de plasticidad neuronal (Carulli y col., 2010), se postula que la neutralización de 3A en estas estructuras podría representar un abordaje capaz de estimular la neuroplasticidad “regenerativa” en situaciones en las que los circuitos neuronales se ven obligados a adaptarse a lesiones (Vo y col., 2013). Sema3A también es capaz de repeler de su campo de inervación a

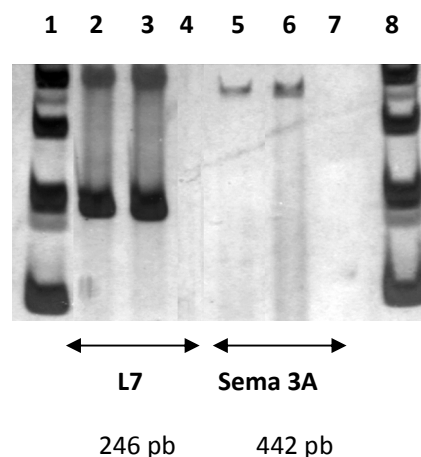
axones sensoriales maduros y completamente establecidos del nervio trigémino e inhibir su reingreso al efector denervado (Tanelian y col., 1997).

De manera interesante, estudios realizados por Marzioni y col. en 2004 mostraron que Sema3A es expresada por el útero humano en las fases finales de la gestación, coincidiendo con la degeneración de los nervios simpáticos y sensoriales intrauterinos. En este marco, en el presente capítulo presentaremos los resultados de los estudios que apuntaron a responder: (1) si el útero de rata expresa Sema3A; (2) si su expresión es regulada por el estrógeno; y (3) cuáles son los tejidos y células responsables de su síntesis.

Identificación de *sema3A* y regulación por el estrógeno

Utilizando oligonucleótidos específicos demostramos que *sema3A* se expresa en el útero de la rata prepúber. Los productos de PCR analizados mediante electroforesis permitieron detectar la presencia de bandas del tamaño esperado en ambos grupos experimentales (Figura 1). El análisis de las secuencias de los fragmentos amplificados confirmó la identidad de Sema3A. La evaluación semicuantitativa respecto al estándar (L7) mostró que el estrógeno induce la expresión de Sema3A en el útero (Figura 1).

Figura 1. Niveles de ARNm de Sema3A en el útero y su regulación por el E2. Productos de RT-PCR semicuantitativa analizados en gel de poliacrilamida al 6% y teñidos con plata. **1 y 8:** Marcador de tamaño (*123 bp DNA Ladder*); **2 y 5:** Ratas prepúberes control; **3 y 6:** Ratas tratadas con E2; **4 y 7:** Control negativo (sin molde). La ausencia de bandas en estos pocillos descarta posibles contaminaciones con ADN genómico.



Localización tisular de los transcritos de Sema3A: efectos del E2

La síntesis de una ribosonda específica nos permitió detectar los transcritos de Sema3A mediante hibridación *in situ*. En los cuernos uterinos provenientes de animales control, se visualizaron transcritos de Sema3A tanto en el miometrio como en el endometrio (Figura 2A). La ausencia de marcación en los cortes incubados con la sonda sentido (Figura 2C) confirmó la especificidad de la reacción.

En el miometrio, los transcritos aparecieron concentrados en el tejido conjuntivo que separa los haces de músculo liso, no detectándose señal en las células miometriales ni alrededor de los vasos sanguíneos (Figura 2A).

En los animales tratados, los transcritos también fueron visualizados en el tejido conjuntivo que separa los haces musculares, manteniéndose las células musculares sin señal (Figura 2B, aste-

riscos). Adicionalmente, se observó la aparición de una intensa señal a nivel del tejido conjuntivo que rodea los principales vasos intramiometriales, la cual no había sido visualizada en los animales control (puntas de flecha, Figuras 2B y D). No se observó marcación en el músculo liso ni en el endotelio vascular.

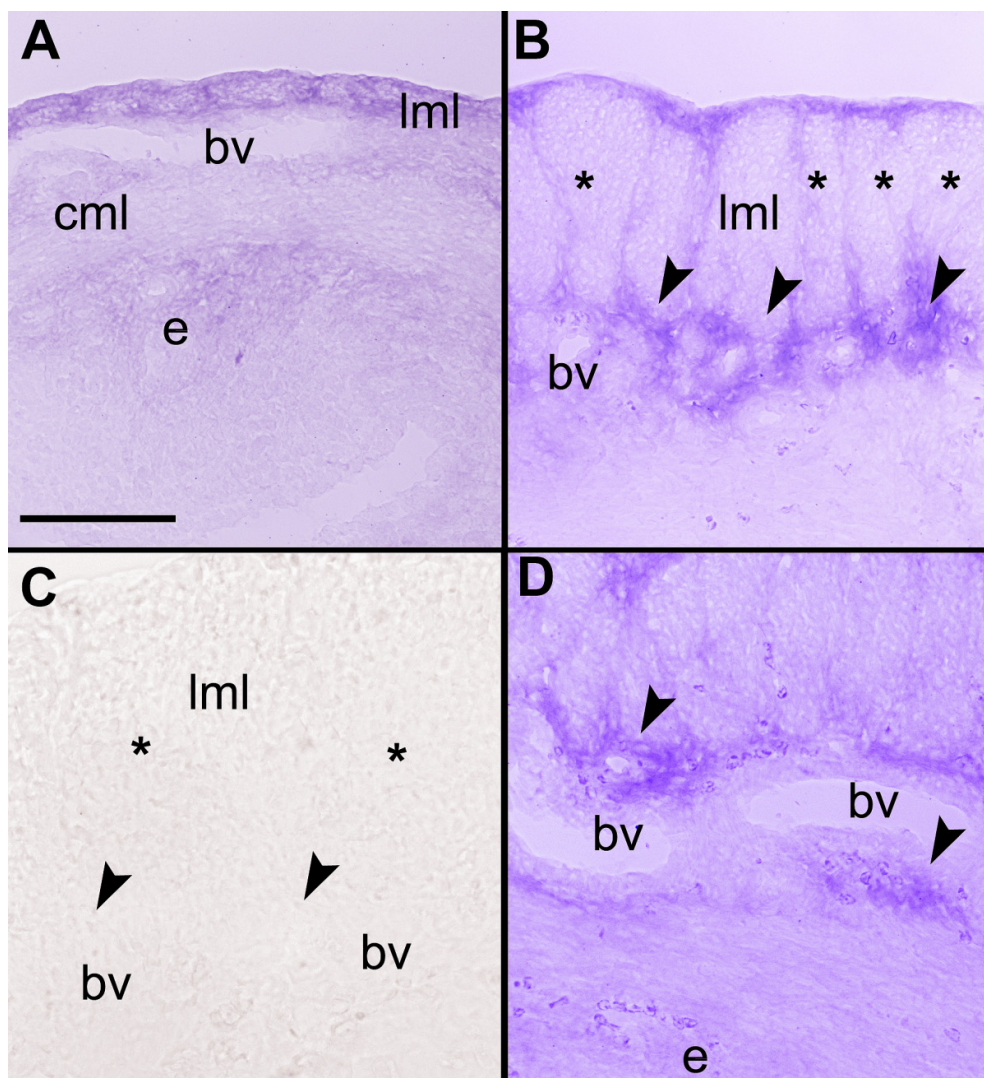


Figura 2. Localización tisular del ARNm de Sema3A en el útero de la rata. La figura muestra la detección de los transcritos de Sema3A hibridados con la ribsonda antisentido (marcada con digoxigenina) en criocortes transversales del cuerno uterino de una rata prepúber control (A) y una tratada con E2 (B y D). La figura C, muestra un corte de útero de una rata tratada con E2 que fue incubado con la sonda sentido. En el útero control, se visualizan transcritos de Sema3A en el compartimiento miometrial y en el endometrio (A). En los cortes de úteros estrogenizados se aprecia la marca intensa y bien localizada (puntas de flecha) alrededor de los vasos sanguíneos (B y D). En estos cortes también se visualizaron transcritos en el tejido conjuntivo que rodea a los haces miometriales hipertróficos (asteriscos) (B). *bv*, vasos sanguíneos; *cml*, capa miometrial circular; *lml*, capa miometrial longitudinal *e*, endometrio;. Barra de calibración: 40 μm (A, C, D); 50 μm (B).

Caracterización de los tipos celulares productores de Sema3A

La caracterización de los tipos celulares que contenían transcritos de Sema3A en el tejido conectivo del compartimiento miometrial y perivascular reveló que esta señal se localizaba en el citoplasma de células con aspecto de fibroblastos y en células mesoteliales que cubren la superficie del órgano (Figura 3A, A'-A''). La identidad de estos tipos celulares fue examinada por microscopía electrónica de transmisión (MET), (Figura 4). La señal para Sema3A se observó también en granulocitos eosinófilos que infiltran el útero en respuesta al estrógeno y que en el compartimiento miometrial, se localizan particularmente alrededor de los vasos sanguíneos (flechas Figuras 3B y C; 4D y E). La identidad de estas células fue confirmada mediante la co-tinción con *Sirius Red* (Figuras 3C, C'-C'').

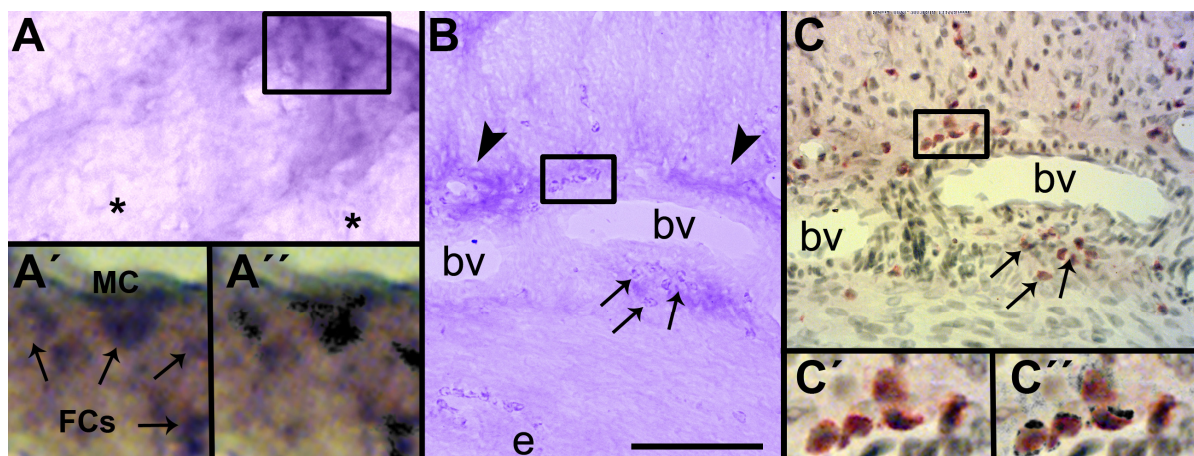


Figura 3. Localización celular de los transcritos de Sema3A en el compartimiento miometrial de ratas tratadas con E2. La figura A muestra un criocorte de cuerno uterino de una rata tratada con E2 hibridado con una ribosonda contra Sema3A. Se detectaron transcritos en el tejido conectivo que rodea a los haces miometriales (asteriscos). En estas áreas se visualizan células cuyos citoplasmas muestran una señal intensa (recuadro en A). Para poder caracterizar los tipos celulares, el mismo corte se tiñó con hematoxilina y eosina (A') y se superpuso la imagen obtenida por hibridación *in situ* (HIS) procesada digitalmente sobre la imagen adquirida luego de la tinción histológica (A'' precipitado oscuro= señal de HIS saturada). Este análisis reveló que la señal estaba confinada en el citoplasma de células con aspecto de fibroblastos (FCs) y células mesoteliales (MC). La figura B, muestra la detección de transcritos de Sema3A en el tejido conectivo que rodea los vasos sanguíneos (puntas de flecha). También se observa señal en el citoplasma de granulocitos eosinófilos (flechas y recuadro en B y C), identificados por la tinción con *Sirius red* (C). Las figuras C' y C'' muestran a mayor magnificación este tipo celular y la presencia de transcritos de Sema3A (precipitado oscuro= señal de HIS saturada) en su citoplasma técnica (C''). *bv*, vasos sanguíneos; *e*, endometrio. Barra de calibración: 12 μ m (A); 8 μ m (A', A''); 40 μ m (B, C); 20 μ m (C', C'').

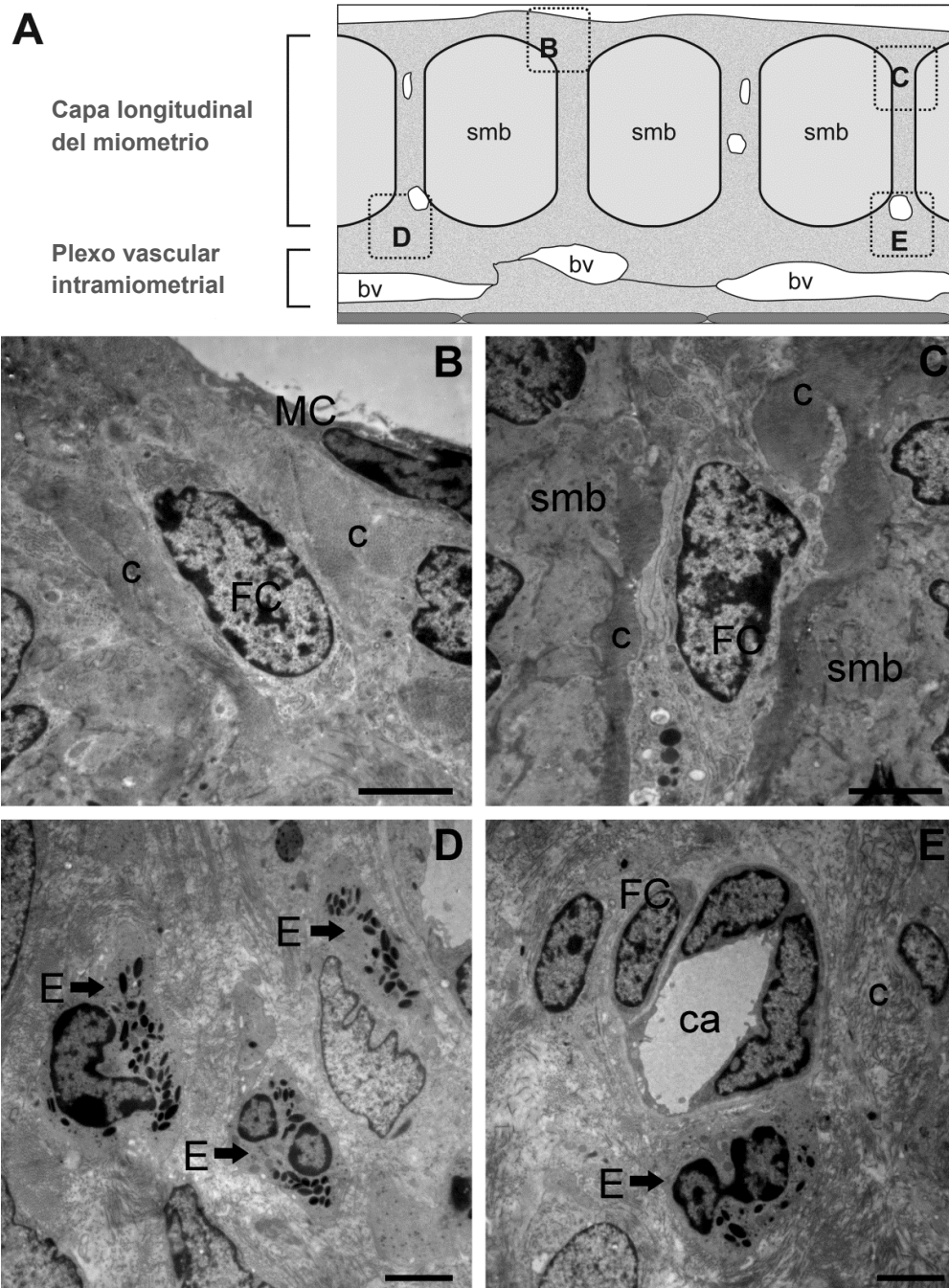


Figura 4. Análisis por MET de los tipos celulares presentes en el tejido conjuntivo hipertrófico de los úteros estrogenizados. El esquema en **A**, ilustra las cuatro regiones uterinas seleccionadas (recuadros punteados) para el análisis ultraestructural de las zonas donde se confinaban los transcritos de Sema3A. La figura **B** muestra una célula con aspecto de fibroblasto (FC) y una célula mesotelial (MC). La figura **C**, muestra un presunto fibroblasto en el tejido conjuntivo que separa los haces musculares (smb). Las figuras **D** y **E**, muestran la presencia de abundantes granulocitos eosinófilos (E, reconocidos por sus típicos citoplasmas granulosos) en el tejido conjuntivo y alrededor de los capilares (ca). *Bv*, vaso sanguíneo; *c*, colágeno. Barra de calibración: 10 μ m (B, C); 5 μ m (D, E).

En el endometrio, la marcación para *sema3A* se visualizó dispersa en el estroma (Figura 5A). No se detectó señal en el epitelio o en las glándulas. El tratamiento con E2 provocó que la señal de los transcritos de Sema3A fuera más intensa y concentrada en el citoplasma de los granulocitos eosinófilos infiltrados en el estroma endometrial (Figuras 5B y C). Ninguna inducción aparente en *sema3A* se registró ni en el epitelio luminal ni en las glándulas.

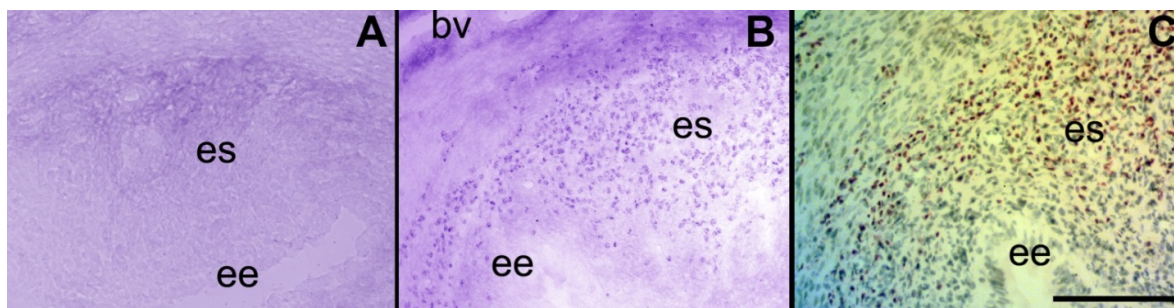


Figura 5. Localización celular de transcritos de Sema3A en el endometrio de la rata. La figura muestra la detección de los transcritos de Sema3A hibridados con la ribosonda antisentido (marcada con digoxigenina) en criocortes transversales del cuerno uterino de una rata prepúber control (A) y una tratada con E2 (B, C). La figura B, muestra como la marca de *sema3A* se concentra e intensifica en el estroma (es) endometrial estrogenizado. Notar la intensa señal que se observa en los eosinófilos infiltrantes del endometrio (B), los que fueron identificados por la tinción con Sirius red (C). ee, epitelio endometrial. Barra de calibración: 60 μm (A); 80 μm (B y C).

Conclusiones parciales

Los resultados obtenidos evidenciaron que el útero de la rata prepúber produce Sema3A y que los niveles de su ARNm aumentan en respuesta al tratamiento crónico con E2. Esta inducción es consistente con el aumento para Sema3A reportada en el miometrio humano al término del embarazo (Marzioni y col., 2004) y apoya además el concepto de que las hormonas sexuales son capaces de modular la expresión de Sema3A en el útero a lo largo de toda la vida reproductiva.

Nuestros estudios permitieron visualizar por primera vez la presencia y distribución espacial de transcritos de Sema3A en el útero. Los resultados obtenidos en la hibridación *in situ* confirmaron además el aumento en los niveles de ARNm de Sema3A detectado por RT-PCR, al revelar que la marcación específica de los transcritos se incrementa luego del tratamiento con E2.

En el miometrio, los transcritos de 3A aparecieron confinados al tejido conjuntivo que separa los haces de fibras de músculo liso y rodea los vasos sanguíneos. Esta localización tisular contrasta con la observada para las otras señales que regulan la inervación uterina (NGF, BDNF y neurotrimina), cuya síntesis está confinada a las células musculares lisas (Chalar y col., 2003; Krizsan-Agbas y col., 2003, 2008).

Los ensayos de hibridación *in situ* permitieron también avanzar en la identificación de los tipos celulares responsables de su síntesis, determinándose que Sema3A es sintetizada por granulocitos eosinófilos, células mesoteliales y presuntos fibroblastos presentes en el campo de proyección de las neuronas sensibles a dichas semaforinas. El significado de esta marcación celular se discutirá en el capítulo siguiente.

Sema3F

Sema3F - Aspectos generales

Sema3F fue inicialmente caracterizada como un gen supresor tumoral localizado en el cromosoma 3p21.3 humano (Roche y col., 1996; Xiang y col., 1996). Es una semaforina secretada del grupo 3, cuyo receptor de unión es la neuropilina-2 (NRP2). A nivel del sistema nervioso, NRP2 es esencial para mediar las respuestas a Sema3F tanto *in vitro* como *in vivo* (Chen y col., 1997, 1998, 2000; Kolodkin y col., 1997; Giger y col., 1998; Bannerman y col., 2008; Waimey y col., 2008).

Sema3F controla diversos procesos en el desarrollo del sistema nervioso, incluyendo: (a) el guiado mediante repulsión de ciertos tipos de axones y su restricción a dominios específicos del embrión (Chen y col., 2000; Giger y col., 2000; Marin y col., 2001; Cloutier y col., 2002); (b) la fasciculación mediante repulsión (*surround repulsion*), (Chen y col., 2000); (c) la migración celular (Gammill y col., 2006); (d) la formación de sinapsis; y (e) la “poda” axonal (*pruning*), (Bagri y col., 2003).

A nivel del sistema nervioso central, Sema3F repele ciertos tipos de axones, tales como proyecciones hipocampales y participa en el establecimiento del sistema límbico (Chedotal y col., 1998; Chen y col., 2000; Sahay y col., 2003). Esta molécula está implicada también en procesos de remodelación a nivel del bulbo olfatorio (Takeuchi y col., 2010). Sema3F actúa a través de complejos de señalización que contienen la NRP2 y la plexina A3 (PLXN A3), (Suto y col., 2005; Yaron y col., 2005). Los ratones K.O. de PLXN adultos A3 poseen el haz hipocampal infrapiramideal anormalmente largo (Cheng y col., 2001); y defectos similares han sido reportados en animales mutantes deficientes en NRP2 (Chen y col., 2000). Estos autores posteriormente demostraron que estos defectos reflejaban alteraciones del *pruning* y basándose en la distribución del ARNm de Sema3F, sugirieron que este proceso de “poda” sería desencadenado por esta señal. Estos estudios, por lo tanto, brindaron las primeras evidencias que involucran a las semaforinas secretadas en los eventos de *pruning* (Bagri y col., 2003; Sahay y col., 2003). Existen pocas evidencias acerca de la acción de Sema3F sobre las neuronas sensoriales, sin embargo, se ha reportado que los ratones K.O. para NRP2 poseen proyecciones sensoriales alteradas (Chen y col., 2000; Giger y col., 2000). Entre los blancos mejor caracterizados de Sema3F se encuentran las neuronas simpáticas (Chen y cols., 1998, 2000; Giger y col., 1998; Atwal y col., 2003). En la vida

adultas, Sema3F provoca la pérdida de fibras nerviosas simpáticas en los tejidos inflamados (Fassold y col., 2009; Straub y Besedovsky, 2003; Fassold y Straub, 2010). Más aún, estudios recientes muestran que el desbalance simpático-sensorial que ocurre en los focos endometrióticos peritoneales se vincula con un aumento de Sema3F que provoca la degeneración de los nervios simpáticos sin afectar a los nervios sensoriales (Meschner, 2014).

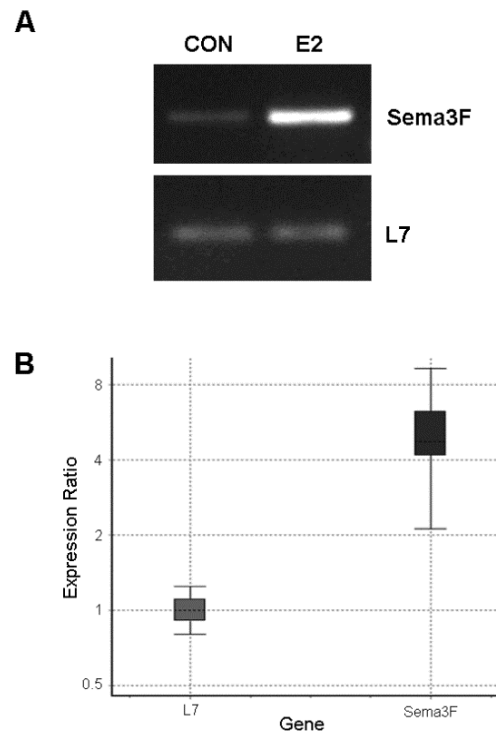
En los nervios simpáticos se ha demostrado que Sema3F puede antagonizar los efectos promotores de crecimiento neurítico inducido por el NGF a través de su receptor TrkA, brindando así evidencia de la existencia de un diálogo entre señales positivas y negativas. Más precisamente, Sema3F colapsa los conos de crecimiento de las neuronas simpáticas de ratas neonatales e inhibe el crecimiento de los axones aún en presencia de NGF (Atwal y col., 2003). El hecho de que las neuronas simpáticas neonatales mantenidas en cultivo expresen en sus conos de crecimiento TrkA y NRP2, refleja una acción muy localizada de Sema3F (Atwal y col., 2003). El diálogo que existe entre Sema3F y NGF podría ser sumamente relevante en nuestro modelo de neuroplasticidad uterina, dado que explicaría por qué los fenómenos neurodegenerativos iniciados por el estrógeno ocurren en presencia de niveles elevados de NGF y NT-3 (Chalar y col., 2003; Bjorling y col., 2003; Krizsan-Agbas y col., 2003).

En este marco, en el presente capítulo presentaremos los resultados de los estudios que apuntaron a responder: (1) si el útero de rata expresa Sema3F; (2) si su expresión es regulada por el estrógeno; y (3) cuáles son los tejidos y células responsables de su síntesis.

Identificación de *sema3F* y regulación por el estrógeno

Nuestros estudios de expresión génica, mostraron la presencia de ARNm para Sema3F en el útero de ambos grupos experimentales, ratas prepúberes control y tratadas con E2 (Figura1A). La cuantificación respecto al estándar (L7) mediante RT-PCR en tiempo real, mostró que el tratamiento con E2 induce un aumento de 5 veces en los niveles de *sema3F* uterino, ($p=0.016$), (Figura 1B).

Figura 1. Niveles uterinos de ARNm de Sema3F y su inducción por el estrógeno. (A) Productos de RT-PCR en tiempo real analizados en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (BrEt). Nótese el aumento en la expresión de *sema3F* provocado por el tratamiento crónico con E2. Los resultados de *sema3F* fueron normalizados contra los niveles de expresión del ARNm que codifica para la proteína ribosomal L7. **(B)** Gráfico que muestra las cantidades relativas de cada gen (L7, izquierda; *sema3F*, derecha) en el útero de ratas control y tratadas con E2. Los niveles de L7 presentes en el útero estrogenizado fueron idénticos a los detectados en el control (tasa de expresión =1). Sin embargo, el estrógeno aumentó 5 veces ($p=0.016$) la expresión de *sema3F* en el útero.



Localización de los transcritos de Sema3F: efectos del estrógeno

La síntesis de una ribosonda específica nos permitió detectar los transcritos de Sema3F mediante hibridación *in situ*. En los cuernos uterinos provenientes de animales control, se visualizaron escasos transcritos de Sema3F, los cuales se distribuían mayormente en el

compartimiento miometrial (Figura 2A). La ausencia de marcación en los cortes incubados con la sonda sentido (Figura 2C) confirmó la especificidad de la reacción.

El patrón de distribución de marcación específica no se vio afectado por el tratamiento crónico con E2 (Figura 2B). Sin embargo, los animales tratados presentaron una marca sensiblemente más intensa. La misma, se visualizó confinada en el tejido conjuntivo hipertrófico que separa los haces de músculo liso (Figura 2B) y que rodea los principales vasos sanguíneos intramiometriales (Figuras 2B y 3D). No se detectó la presencia de transcritos de Sema3F en las células miometriales (asteriscos, Figura 2B), ni en el músculo liso vascular o el endotelio (Figura 3D).

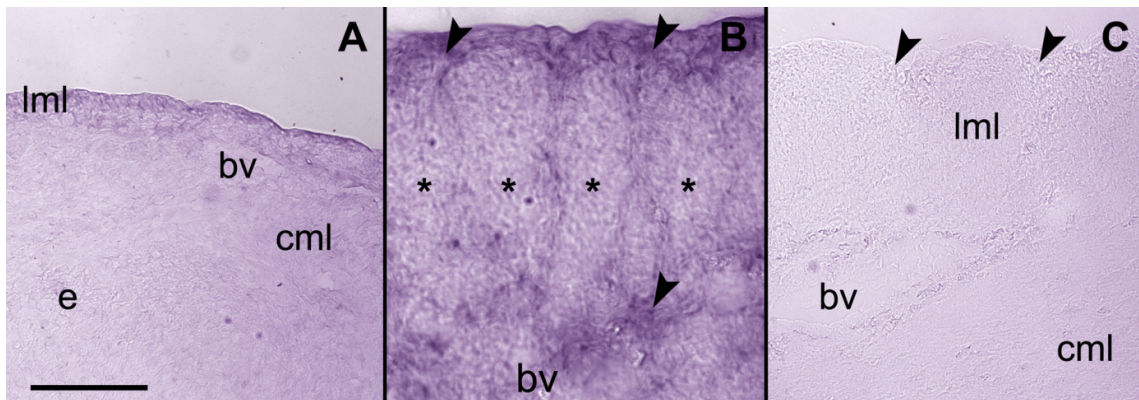


Figura 2. Localización tisular del ARNm de Sema3F en el miometrio de la rata. La figura muestra la detección de los transcritos de Sema3F hibridados con la ribsonda antisentido (marcada con digoxigenina) en criocortes transversales del cuerno uterino de una rata prepúber control (A) y una tratada crónicamente con E2 (B). La figura C, muestra un corte de una rata tratada, que fue incubado con la sonda sentido. Notar la marcación moderada de *sema3F* en el compartimiento miometrial del útero control (A) y la aparición luego del tratamiento de una marca intensa y bien localizada (puntas de flecha) alrededor de los haces miometriales hipertróficos (asteriscos) en el útero estrogenizado. *bv*, vasos sanguíneos; *cml*, capa miometrial circular; *e*, endometrio; *lml*, capa miometrial longitudinal. Barra de calibración: 40 μ m.

En el tejido conectivo del compartimiento miometrial, algunas células presentaron una intensa señal debida a la acumulación de transcritos. La tinción de estos cortes con hematoxilina y eosina reveló que esta señal se localizaba en el citoplasma de presuntos fibroblastos y células mesoteliales (Figuras 3A-C). Algunos preparados fueron teñidos con *Sirius Red*, y la precisa superposición de las imágenes digitales obtenidas con cada técnica (HIS vs SR) reveló que los

transcriptos de Sema3F se encontraban concentrados en el citoplasma de los granulocitos eosinófilos (Figuras 3D, E, F-F', G-G').

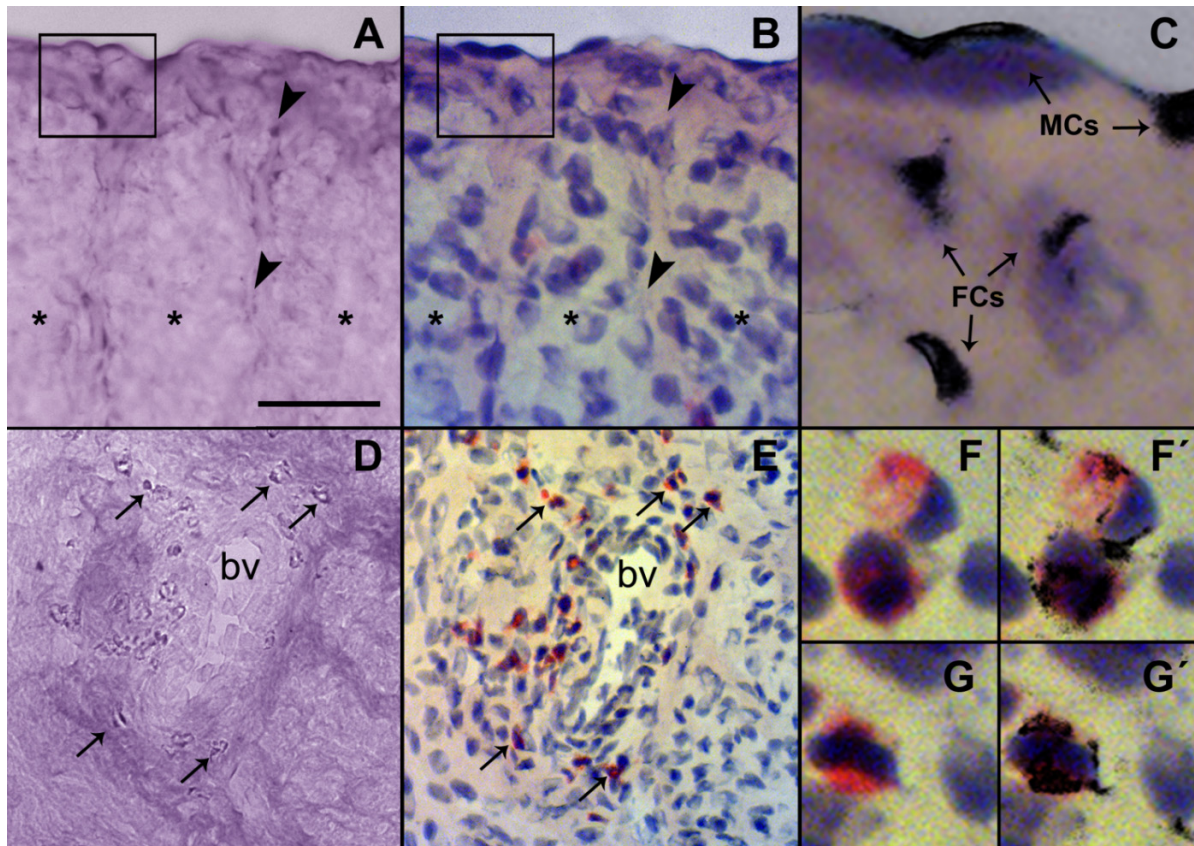


Figura 3. Localización celular de los transcritos de Sema3F en el miometrio estrogenizado. Las figuras A y D muestran la detección de los transcritos de sema3F en criocortes de ratas tratadas con E2. En A se aprecia una marca intensa y bien localizada (puntas de flecha) alrededor de los haces miometriales hipertróficos (asteriscos). La tinción de estos cortes con hematoxilina y eosina reveló que estas áreas corresponden al tejido conjuntivo (B, puntas de flecha). En el mismo, se visualizan células cuyos citoplasmas muestran una señal intensa (A y B, recuadros). La precisa superposición de las imágenes digitales obtenidas con cada técnica (C; precipitado oscuro= señal de HIS saturada) reveló que la señal estaba confinada en el citoplasma de células con aspecto de fibroblastos (FCs) y células mesoteliales (MCs). La figura D, muestra la detección de transcritos de Sema3F en el tejido conjuntivo que rodea los vasos sanguíneos (bv) así como también en el citoplasma de granulocitos eosinófilos (flechas) que fueron identificados por la tinción con *Sirius red* (E, flechas; F, G). Las figuras F-F' y G-G' muestran a mayor magnificación este tipo específico de células y la presencia de transcritos de Sema3F (precipitado oscuro) en su citoplasma Barra de calibración: 20 μ m (A, B); 4 μ m (C); 40 μ m (D, E); 10 μ m (F, G).

Luego del tratamiento crónico con E2, también se visualizaron transcritos de Sema3F en el endometrio (Figuras 4A y B), más precisamente en el citoplasma de los granulocitos eosinófilos localizados en el estroma (Figuras 4C-C'). Ninguna inducción aparente en *sema3F* se registró ni en el epitelio endometrial ni en las glándulas (Figura 4B).

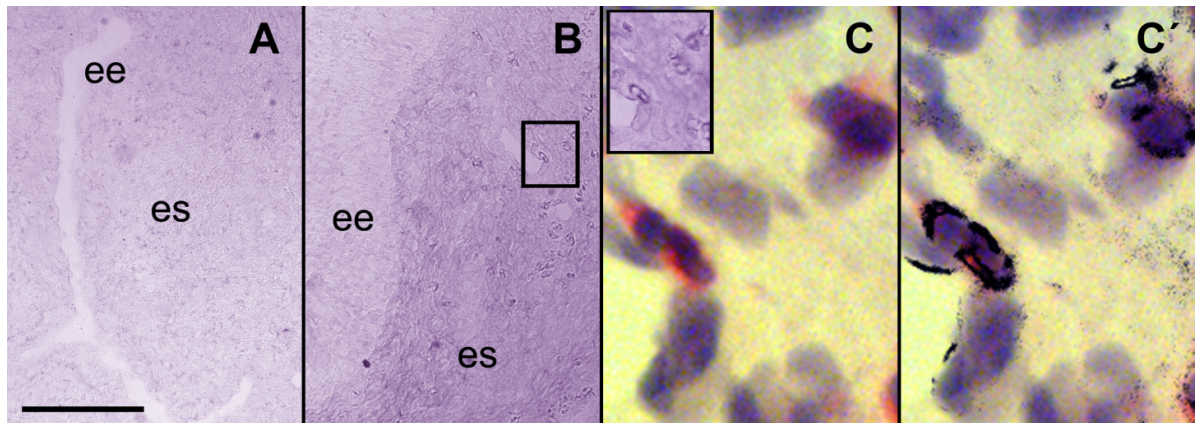


Figura 4. Localización celular de transcritos de Sema3F en el endometrio. La figura muestra criocortes transversales del cuerno uterino de una rata prepúber control (A) y una tratada crónicamente con E2 (B y C). Estos criocortes fueron hibridados con la ribosonda antisentido (marcada con digoxigenina) de *sema3F*. La figura B, muestra la aparición de marca de *sema3F* en el estroma (es) endometrial luego del tratamiento. Esta inducción no fue detectada en el epitelio endometrial (ee). Notar la intensa marcación que se observa en los granulocitos eosinófilos infiltrantes del endometrio (B, C recuadros). Las figuras C y C' muestran mayores magnificaciones de los granulocitos eosinófilos (*Sirius red*) y la presencia de transcritos de Sema3F (precipitado oscuro) en su citoplasma. Barra de calibración: 40 μm (A, B); 10 μm (C); 20 μm (recuadro en C).

Conclusiones parciales

Este estudio ha demostrado que *sema3F* se sintetiza en el útero de la rata y que su expresión es regulada por el estrógeno (Richeri y col., 2011, adjunto). Los niveles uterinos de ARNm de Sema3F en los animales tratados quintuplicaron los niveles de los animales control. Esta inducción es consistente con resultados previos de estudios con microarreglos que indican que el E2 y el tamoxifeno regulan la expresión de *sema3F* en el útero del ratón durante la vida infantil/prepuberal (Fong y col., 2007).

Nuestros estudios permitieron visualizar por primera vez la distribución tisular y celular de transcritos de Sema3F en el útero; y demostramos que ésta es sintetizada por los mismos tipos celulares que producen Sema3A, incluyendo células mesoteliales, presuntos fibroblastos y granulocitos eosinófilos. Cabe destacar que los transcritos de Sema3F se localizan principalmente en el miometrio, y al igual que Sema3A, se distribuyen en el campo de proyección de las neuronas. Los transcritos se hacen más abundantes luego del tratamiento con E2, y de especial interés para nuestra hipótesis, es el hecho de que este aumento coincide temporal y espacialmente con la degeneración de los nervios simpáticos del miometrio estrogenizado.

Los resultados presentados mostraron que el útero de la rata expresa semaforinas, lo cual fue inicialmente revelado por inmunodetección *in situ* y ensayos de WB en los que se utilizó un anticuerpo general que reconoce el dominio SEMA presente en todas las semaforinas. Usando estos abordajes, observamos que el E2 y la gestación aumentan la expresión de semaforinas uterinas. Más aún, la inmunodetección de SEMA *in situ* nos permitió evidenciar que este aumento ocurre en las áreas de distribución de los nervios simpáticos y sensoriales intrauterinos. Los estudios transcripcionales con oligonucleótidos específicos permitieron identificar dos semaforinas secretadas del grupo 3, Sema3A y Sema3F. En concordancia con los estudios proteicos, demostramos que el E2 induce la expresión de ambas semaforinas.

Los estudios de hibridación *in situ* permitieron demostrar que en el útero, la localización de los transcritos para Sema3A y Sema3F coincide, y que una parte sustancial de su síntesis está confinada al miometrio, si bien existe una expresión endometrial. En el miometrio, ambas semaforinas fueron detectadas en el tejido conjuntivo que rodea los haces de músculo liso y los vasos sanguíneos. Sin embargo, la señal de Sema3A perivascular del útero estrogenizado fue más intensa y abundante que la de Sema3F. Esta comparación es válida porque los ensayos de HIS para Sema3A y Sema3F se realizaron simultáneamente y utilizando la misma concentración de ribosondas. Si bien la HIS apoyó parcialmente los datos de la inmunodetección, se observaron algunas diferencias. Por ejemplo, en el miometrio, la inmunofluorescencia (IF) mostró una marcación generalizada que incluía también a las células musculares, mientras que la HIS sólo detectó marcación en territorios de tejido conjuntivo. A nivel del endometrio, la IF mostró una intensa marcación del epitelio luminal y glandular que no fue revelado por la HIS. En conjunto, estos resultados sugieren la posible existencia de otras semaforinas uterinas.

La síntesis de Sema3A y Sema3F está mayormente confinada a tres tipos celulares: presuntos fibroblastos, células mesoteliales y granulocitos eosinófilos. La síntesis de semaforinas de la clase 3 por fibroblastos y células inflamatorias ha sido bien documentada; y es sabido que su expresión puede ser inducida en estas células incluso durante la vida adulta (Miller y col., 2004; Ko y col., 2008; Fassold y col., 2009; Shim y col., 2013). Harel y Strittmatter (2006) publicaron una revisión exhaustiva de evidencias que involucran la re-utilización de factores de guiado axonal en respuestas plásticas durante la vida adulta, y muestran cómo cambia la distribución de estas señales en el sistema nervioso adulto en respuesta a una lesión. Un aspecto recurrente en esta

publicación y que vale la pena destacar, es que las semaforinas se suelen re-exresar en los fibroblastos y macrófagos que invaden las cicatrices de las lesiones del sistema nervioso central generando dominios de exclusión para los nervios.

De manera similar, se ha demostrado que los fibroblastos y los macrófagos son responsables del aumento de los niveles de Sema3F (y Sema3C) que ocurre en el tejido sinovial de pacientes que padecen artritis reumatoidea, y que este evento se relaciona con la pérdida de fibras nerviosas simpáticas de dicho tejido (Miller y col., 2004; Fassold y col., 2009). De manera similar, se ha postulado que la Sema3F detectada en los focos endometrióticos peritoneales sería aportada por los macrófagos (Meschner, 2014). Al igual que en la artritis reumatoidea, esta denervación selectiva, favorece la preponderancia de los nervios sensoriales, los cuales transmiten el dolor hacia el SNC y perpetúan la reacción inflamatoria.

La intensa concentración de transcritos de estas semaforinas en los granulocitos eosinófilos apunta a confirmar la inmunorreactividad para SEMA sugerida por inmunofluorescencia. De manera similar, se han detectado altos niveles de Sema3A por qPCR en secreciones de las vías respiratorias (esputo) de pacientes asmáticos, los cuales poseen una alta carga de granulocitos eosinófilos (Shim y col., 2013). En el útero, el estrógeno causa una respuesta inflamatoria caracterizada por edema, hiperemia y una masiva infiltración de granulocitos eosinófilos. Si bien el significado funcional de esta infiltración leucocitaria no es clara, en estudios previos hemos demostrado que los granulocitos eosinófilos frecuentemente se localizan en la proximidad de los nervios simpáticos del útero. Más aún, la reducción de la eosinofilia uterina por acción de la dexametasona, revierte parcialmente la pérdida de nervios simpáticos intrauterinos inducida por el E2 (Bianchimano y col., 2007).

Finalmente, en vista de las funciones pleiotrópicas presentadas por Sema3A y Sema3F, es necesario determinar si a nivel del útero, estas señales están vinculadas exclusivamente con la remodelación de su inervación, o si también intervienen en otros procesos inmunológicos/inflamatorios o eventualmente con fenómenos de remodelación vascular. En capítulos siguientes, describiremos resultados que apuntan a responder algunas de estas interrogantes.

Capítulo 3. Otras semaforinas presentes en el útero

Los resultados presentados hasta ahora, mostraron la presencia en el útero de dos semaforinas con efectos demostrados sobre los nervios simpáticos y sensoriales (Sema3A y Sema3F). Sin embargo, cabe recordar que en los mamíferos, existen 27 genes que codifican para distintos miembros de la familia de las semaforinas. Por esta razón, completamos nuestra búsqueda de semaforinas en el útero con una estrategia experimental complementaria que consistió en el uso de oligonucleótidos degenerados. Para realizar este objetivo, se aprovechó el hecho de que todos los miembros de las semaforinas comparten el dominio SEMA y en tal sentido se diseñó un par de oligonucleótidos degenerados derivados de los aminoácidos FFFRENA y DPYCAWD altamente conservados dentro de este dominio (Kolodkin y col., 1993; Zhou y col., 1997). Una vez identificadas las secuencias expresadas, se diseñaron oligonucleótidos específicos para confirmar su presencia en ensayos de RT-PCR.

Identificación de Sema4B en el útero de la rata

La búsqueda de ARN codificante para SEMA en el útero utilizando oligonucleótidos degenerados permitió detectar la presencia de una banda del tamaño esperado de 860pb solamente en el ADNc del útero estrogenizado (Figura 1).

Figura 1. RT-PCR con oligonucleótidos degenerados dirigidos contra SEMA. Cantidades equivalentes de ADNc generado a partir de úteros de ratas control y tratadas con E2, fueron utilizadas como molde para ensayos de PCR con el par de oligonucleótidos degenerados. Los productos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñidos con BrEt. Esta figura muestra la imagen digital del gel obtenida luego de la corrida electroforética. Las muestras fueron cargadas en el siguiente orden: ratas prepúberes control (C); ratas tratadas (E2); control negativo sin molde (N); marcador de tamaño (M) (123bp DNA ladder). Nótese que se detectaron amplicones solamente en el ADNc del útero estrogenizado (fecha).



La banda fue recortada del gel de agarosa, purificada y re-amplificada en las mismas condiciones anteriores. Los productos de la re-amplificación fueron purificados y clonados en el vector *pGEM-T-Easy* (Promega). Los plásmidos recombinantes fueron analizados electroforéticamente (Figura 2).

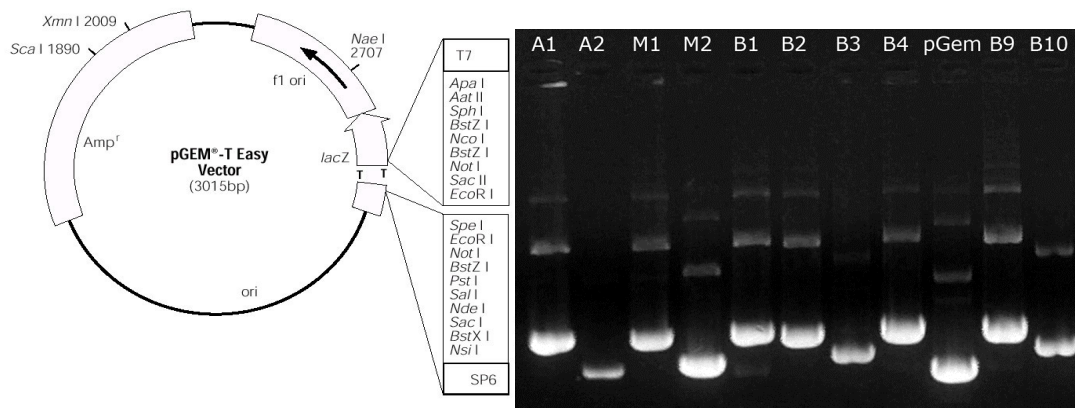


Figura 2. Clonación de productos de RT-PCR con oligonucleótidos degenerados y selección de plásmidos recombinantes. Foto digital del gel de agarosa teñido con BrEt y visualizado bajo luz ultravioleta, en el que se corrieron electroforéticamente los plásmidos purificados a partir de las colonias de bacterias -transformadas con los productos de PCR obtenidos de la banda recortada.

De los plásmidos recombinantes seleccionados, veinte fueron secuenciados con dos objetivos: a) verificar que la secuencia corresponda al dominio SEMA; y b) identificar las semaforinas expresadas en el útero. Esto es posible debido a que el dominio SEMA a pesar de su alta conservación, presenta particularidades aminoacídicas propias de cada grupo dentro de la familia de las semaforinas (Koppel y col., 1997).

El análisis de las secuencias obtenidas y la búsqueda de secuencias homólogas en la base de datos *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), mostraron que una de las secuencias analizadas (*plásmido recombinante B9*) resultó ser idéntica a la secuencia del ARNm de rata que codifica para una semaforinas transmembrana, la Sema4B (Figura 3).

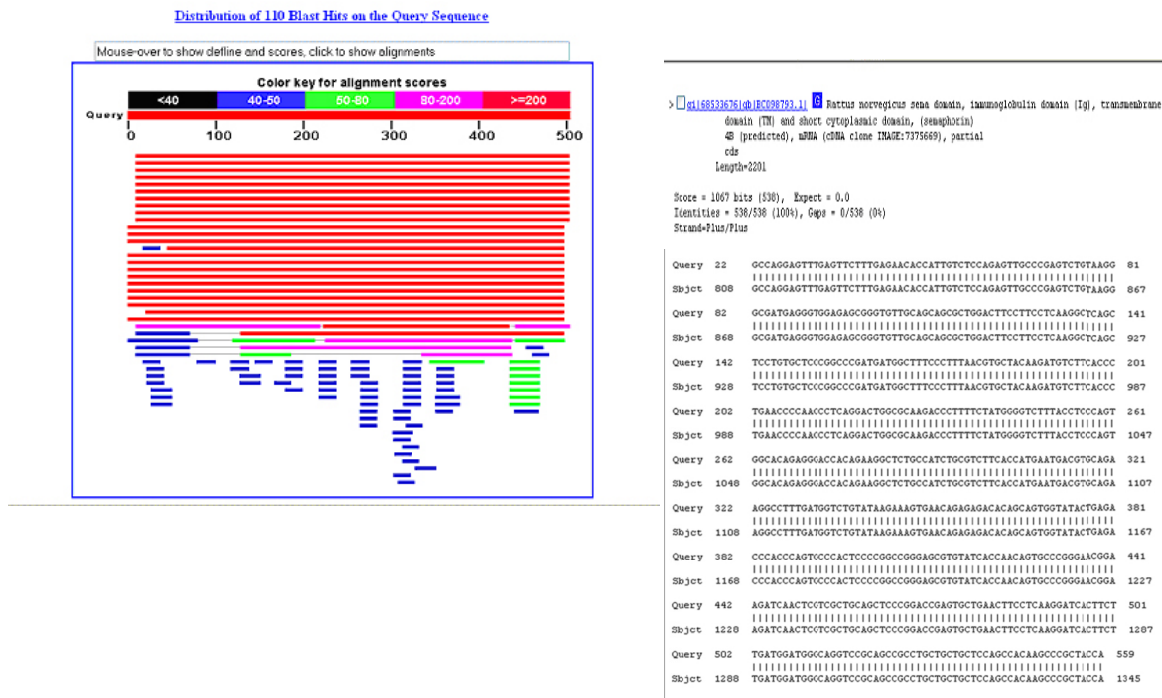


Figura 3. Alineación de secuencias nucleotídicas: identificación de otra semaforina en el útero. Nótese como una de las secuencias analizadas resultó ser idéntica a la secuencia del ARNm de rata que codifica la semaforina 4B.

Confirmación de la expresión de Sema4B en el útero de la rata y su inducción por el E2

Se confirmó la expresión de Sema4B en el útero de rata, con oligonucleótidos específicos para este miembro de la familia de las semaforinas. La corrida electroforética de los productos del qPCR mostró la presencia de amplicones del tamaño esperado, en ambos tipos de muestras (control y E2) pudiéndose ratificar la ausencia de bandas no-específicas (Figura 4A). Estos ensayos revelaron además que los niveles de ARNm para Sema4B aumentaban casi 3 veces en respuesta al estrógeno (Figura 4B).

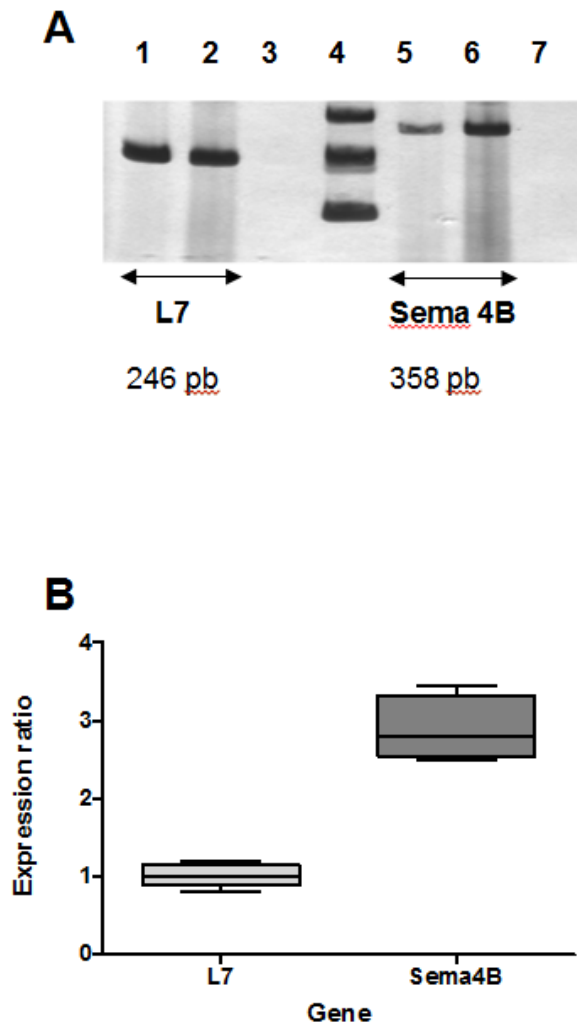


Figura 4. Niveles uterinos de ARNm de Sema4B y su inducción por el E2.

(A) Productos de RT-PCR en tiempo real analizados en gel de poliacrilamida teñido con plata. Pocillos 1 y 5: Ratas prepúberes control; 2 y 6: Ratas tratadas con E2; 3 y 7: Control negativo (sin molde). Nótese el aumento en la expresión de *sema4B* provocado por el tratamiento con E2 (pocillos 5 vs. 6). Los resultados de *sema4B* fueron normalizados contra los niveles de expresión de L7. (B) Gráfico que muestra las cantidades relativas de cada gen (L7, izquierda; *sema4B*, derecha) en el útero de ratas control y tratadas con E2. Los niveles de L7 presentes en el útero estrogenizado no fueron distintos a los detectados en el control (tasa de expresión= 1). Sin embargo, el estrógeno aumentó 2,8 veces la expresión de *sema4B* en el útero.

La búsqueda de ARNm codificante para el dominio SEMA en el útero de la rata nos permitió demostrar por primera vez que el útero produce una semaforina transmembrana, de la clase 4, la Sema4B. Además, demostramos que la expresión de Sema4B en el útero también es regulada y sus niveles se triplican en respuesta al estrógeno.

Un aspecto que merece ser comentado es que en nuestros ensayos con oligonucleótidos degenerados no se hayan detectado secuencias codificantes para las Sema3A y Sema3F, las cuales fueron detectadas con oligonucleótidos específicos. Este resultado podría deberse simplemente a que *sema4B* estaría mucho más representada en la población de ARNm totales luego del tratamiento con E2, que los miembros secretados. Esta posibilidad se ve apoyada por reportes recientes que identificaron a ARNs codificantes para semaforinas del grupo 4 en el transcriptoma de axones de raíces ventrales de ratas adultas (Farias y col., 2014). Cabe destacar que este estudio de secuenciación masiva estuvo diseñado para identificar los ARNm mayormente representados en el transcriptoma axonal.

A diferencia de la extensa información disponible acerca del rol de las semaforinas 3A y 3F sobre los nervios simpáticos y sensoriales, los antecedentes reportados sobre las funciones de Sema4B son escasos. Algunos estudios la vinculan con el sistema nervioso. Ha sido demostrada la síntesis y participación de Sema4B en la formación de las sinapsis glutamatérgicas y gabaérgicas del hipocampo de roedores (Swiercz y col., 2002; Burkhardt y col., 2005; Paradis y col., 2007; Kuzirian y Paradis, 2011; Kuzirian y col., 2013). Recientemente, se evidenció expresión de Sema4B en el corazón del ratón y que esta semaforina sería un gen blanco de acción de microARNs regulatorios (Nakagawa y col., 2011; Bernardo y col., 2012).

Sema4B también está involucrada en el sistema inmune y se expresa en linfocitos T y B de forma constitutiva. Los ratones K.O. para Sema4B poseen niveles séricos elevados de IgE (dependiente de basófilos) a pesar de que sus linfocitos y células dendríticas muestran funcionalidades normales (Nakagawa y col., 2011). Estos hallazgos la vinculan con la respuesta inmune innata, y

de manera interesante, la Sema4B recombinante inhibe la producción de las interleuquinas (IL) IL-4 e IL-6 en los basófilos estimulados. Esto indica que Sema4B estaría regulando negativamente las respuestas de los basófilos a través de contactos intercelulares.

Finalmente, nuestro análisis de expresión génica mostró que luego del tratamiento crónico con E2 Sema4B se induce en el útero de la rata. Asimismo encontramos que su secuencia posee un 94% de identidad con un clon (*clone:5031439F07; GenBank accession number: AK030331*) de una librería de ADNc de ovario y útero de ratonas gestantes que codifica para Sema4B lo cual genera interesantes interrogantes acerca de su acción en nuestro modelo uterino.

Capítulo 4. Receptores para semaforinas

Nuestros estudios bioquímicos y moleculares dieron sustento inicial a la hipótesis de que las semaforinas podrían ser uno de los factores inhibitorios para los nervios simpáticos y sensoriales producidos por el útero estrogenizado. Como se describiera anteriormente, revelamos que el estrógeno incrementa la expresión de dos semaforinas secretadas con efectos demostrados sobre este tipo de nervios, y que sus transcriptos se localizan en el área de distribución de los nervios uterinos. Además, demostramos que el útero produce una semaforina transmembrana de la clase 4 (Sema4B), cuya expresión también es regulada por el estrógeno. Considerando las acciones diversas que poseen las semaforinas, el siguiente paso necesario para valorar su posible participación en la remodelación de la innervación uterina fue explorar si estos nervios eran receptivos a dichas señales.

Neuropilinas – Aspectos generales

Como se mencionara en la introducción, los receptores para las semaforinas secretadas del grupo 3 son las neuropilinas (NRPs). Dado que en nuestros estudios profundizamos en las semaforinas 3A y 3F, se trabajó con sus receptores específicos NRP1 y NRP2. Ha sido robustamente demostrado que NRP1 es necesaria para mediar las respuestas de Sema3A: (1) NRP1 se expresa en las neuronales sensoriales y simpáticas; (2) los anticuerpos dirigidos contra el dominio extracelular de NRP1 previenen el colapso de los conos de crecimiento de axones de los GRD; (3) las neuronas del GRD provenientes de ratones K.O. para NRP1 no responden a Sema3A; y (4) la expresión de NRP1s recombinantes carentes de un subdominio extracelular genera dominantes negativos (He y Tessier-Lavigne, 1997; Kitsukawa y col., 1997; Kolodkin y col., 1997; Sheperd y col., 1997; Renzi y col., 1999; Chen y col., 1998; 1999; revisado en Raper 2000; Gavazzi 2001).

En la vida adulta, la vía Sema3A/NRP1 es re-utilizada en diversos sistemas neuronales tanto centrales como periféricos (Tanelian y col., 1997; Gavazzi 2001; Nangle y Keast, 2011; Pasterkamp, 2012; Kamo y col., 2013; Vo y col., 2013). Sema3A se expresa en el adulto (Luo y col., 1993; Shepherd y col., 1996; Giger y col., 1998; Marzioni y col., 2004) y la expresión de NRP1 ha

sido evidenciada en neuronas adultas sensoriales de los GRD (Pasterkamp y col., 1998a; Reza y col., 1999; Gavazzi y col., 2000) y simpáticas del ganglio pélvico (Nangle y Keast, 2011).

La NRP2 es el receptor de unión de Sema3F. Está descrito que la interacción específica de Sema3F con NRP2 afecta selectivamente a los axones simpáticos, sin afectar los axones sensoriales originados en neuronas de los GRD (Taniguchi y col., 2005; Fassold y col., 2009). NRP2 se expresa en los conos de crecimiento de neuronas simpáticas embrionarias y neonatales mantenidas en cultivo, y su expresión en este tipo neuronal también ha sido evidenciada in vivo (Chen y col., 1997, 1998; Atwal y col., 2003). En la vida adulta, NRP2 se considera un marcador selectivo de nervios simpáticos (Fassold y col., 2009).

Neuropilina-1

Detección de neuropilina-1 en neuronas simpáticas y sensoriales

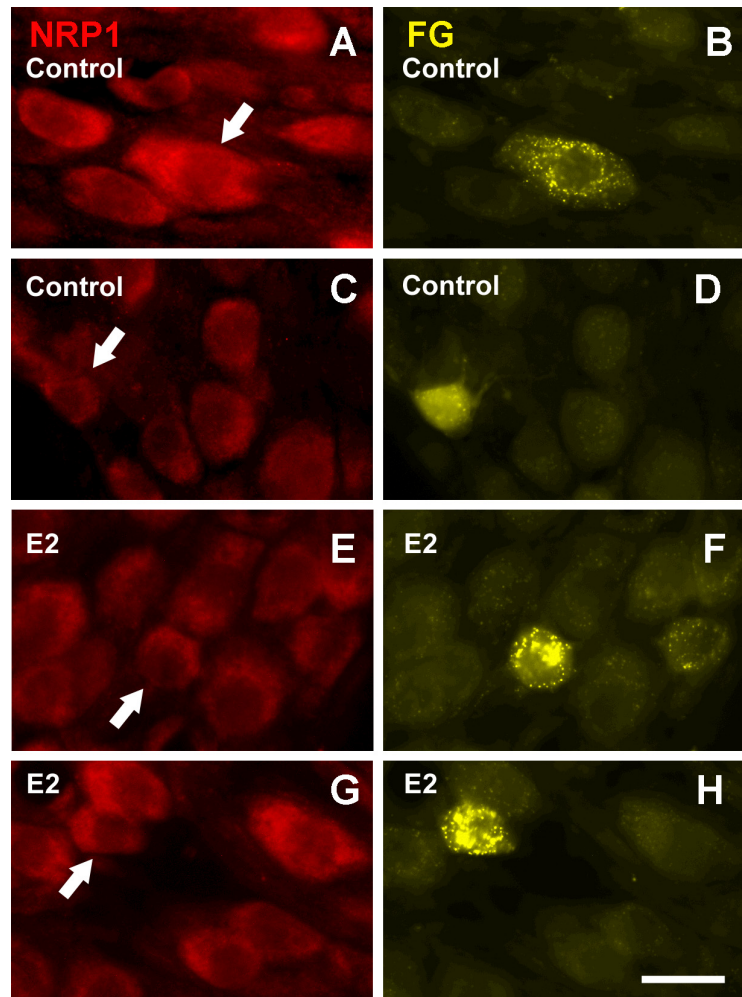
En búsqueda de un posible vínculo entre la Sema3A y la remodelación que el estrógeno induce en la innervación uterina, evaluamos: (a) si las neuronas simpáticas y sensoriales que inervan el útero expresan NRP1; (b) si la expresión de NRP1 en estas poblaciones neuronales de neuronas es constitutiva o regulada por el estrógeno; y (c) si existe una correlación espacio-temporal entre la presencia de Sema3A/NRP1 y la denervación del útero inducida por el estrógeno. Para ello valoramos la expresión de NRP1 en las neuronas que proyectan al útero, tanto a nivel ganglionar como en sus fibras terminales intrauterinas.

NRP1 en las neuronas simpáticas de proyección al útero y su regulación por el E2

La vasta mayoría de las neuronas simpáticas, de los ganglios analizados, mostró inmunorreactividad para NRP1 (Figuras 1A, C, E, G), incluyendo a la población de neuronas uterinas reconocidas por la acumulación del trazador retrógrado (Fluorogold, FG+) en su citoplasma (Figuras 1B, D, F, H).

Las neuronas simpáticas FG+ mostraron diferencias en la intensidad de marcación específica para NRP1, visualizándose neuronas intensamente marcadas (flechas, Figuras 1A y G) y otras que presentaban bajos niveles de inmunofluorescencia (flechas, Figuras 1C y E). Estas variaciones fueron detectadas tanto en neuronas provenientes de los animales control como en los que recibieron el tratamiento con E2.

Figura 1. Demostración de NRP1 en las neuronas simpáticas que proyectan al útero de la rata. Microfotografías de cortes a congelación de cadenas simpáticas provenientes de animales control (A-D) y tratados con estradiol (E2; E-F) que fueron inyectados con el trazador *fluorogold* (FG) en el útero. Los cortes fueron inmunomarcados para visualizar el receptor NRP1 (rojo). En los paneles (B) y (D) se ilustra la apariencia de neuronas que proyectan al útero (FG+, amarillo). Estas mismas neuronas poseen niveles altos (A, flecha) y bajos (C, flecha) de NRP1. Luego del tratamiento con E2, las neuronas FG+ (F y H) también mostraron diferentes niveles de NRP1 (E y G, flechas). Nótese que también se observaron diferencias en la intensidad de marcación en neuronas no trazadas. Barra de calibración= 25 μ m.



Los estudios densitométricos comparativos de los niveles de inmunorreactividad para NRP1 en las neuronas de proyección uterina no detectaron diferencias significativas entre los controles y los animales tratados con E2 (Figura 2). Con el fin de mejorar la visualización e interpretación de estos datos, los resultados se analizaron también en histogramas de frecuencias. En las neuronas FG+ de los animales control, la intensidad de fluorescencia para NRP1 mostró valores de D.O. que fluctuaban entre 28 y 135 unidades. A su vez, en estos animales, el 59% de las neuronas NRP1 positivas presentaron valores menores a 70 unidades (Figuras 2 y 3). Luego del tratamiento crónico con E2, no se detectaron cambios en los valores mínimos y máximos de D.O. Sin embargo, se observó un corrimiento de los valores hacia la izquierda, debido al aumento en la proporción de neuronas con valores de D.O. menores a 70 (Control 59% vs Estrógeno 69%) (Figura 3).

Tratamiento	n	D.O. NRP1	
		Media	min-max
Control prepúber	178	67 ± 2	28-135
Estrógeno	178	64 ± 2	27-144

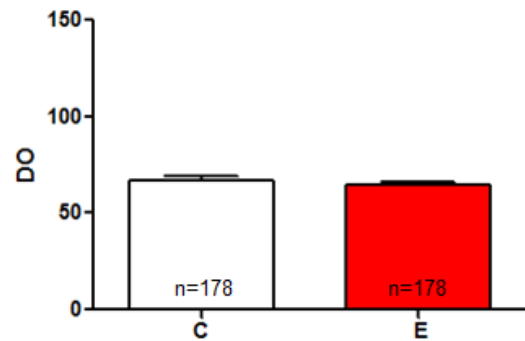


Figura 2: Neuronas simpáticas Fluorogold-positivas (FG+). Efectos del tratamiento prepuberal crónico con E2 sobre la densidad óptica de inmunofluorescencia de NRP1 (D.O.; Media + EEM). n=número de neuronas. C, Control prepúber; E, Tratadas con E2.

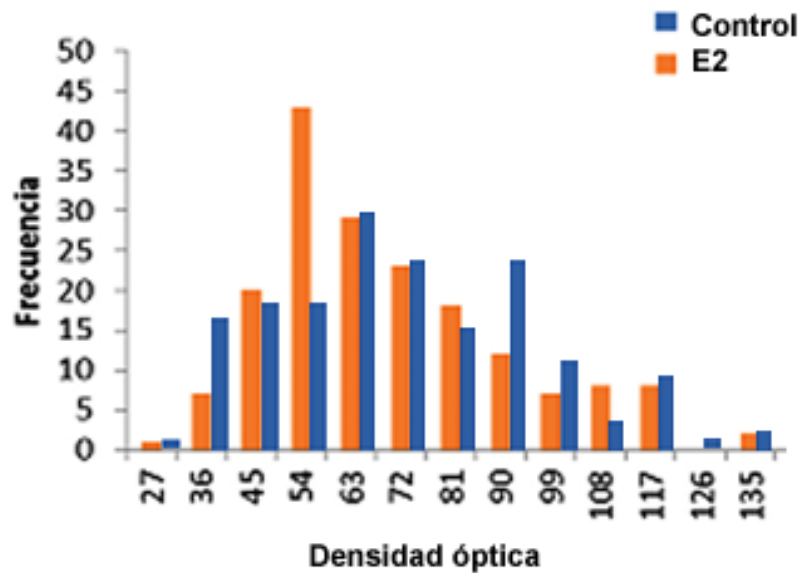


Figura 3: Histogramas de frecuencias relativas de los valores de densidad óptica para NRP1, en las neuronas FG+ muestran como luego del tratamiento los niveles de NRP1 tienden a correrse hacia la izquierda debido a que aumenta la proporción de neuronas con D.O. < 70 unidades.

Un hallazgo inesperado, fue la observación de que el anticuerpo contra NRP1 también evidenciaba vasos sanguíneos a nivel ganglionar en los animales control y tratados con E2 (Figura 4). La pérdida de esta señal vascular en los cortes de ganglio incubados con suero preinmune, confirmó la especificidad de la marcación (Figura 4D).

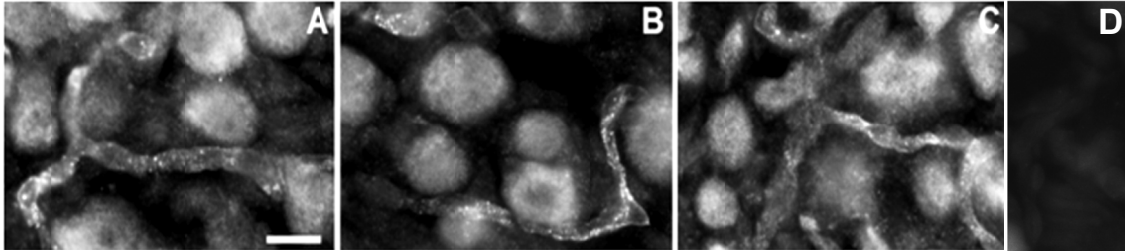


Figura 4. Visualización de vasos inmunorreactivos para NRP1 en los ganglios simpáticos. Microfotografías de cortes a congelación de cadenas simpáticas paravertebrales provenientes de animales tratados crónicamente con E2 (A, B) y prepúberes control (C) que muestran neuronas y vasos inmunomarcados para visualizar el receptor NRP1. La figura D, muestra un corte de ganglio de una rata tratada, que fue incubado con el suero preinmune. Barra de calibración = 25 μ m.

NRP1 en las neuronas sensoriales de proyección al útero y su regulación por el E2

Las neuronas sensoriales de los GRD que inervan al útero han sido clasificadas en subpoblaciones según su tamaño (Papka y col., 2001): pequeñas (diámetro < 20 μ m); medianas (diámetro 20-40 μ m) y grandes (diámetro > 40 μ m). La subpoblación de neuronas pequeñas representa el 15%, las medianas el 84% y las grandes representan menos de un 1%.

En nuestros estudios se visualizaron neuronas sensoriales FG+ inmunorreactivas para NRP1, correspondientes a la subpoblación de neuronas pequeñas (punta de flecha, Figura 5) y medianas (flecha, Figura 5), no detectándose neuronas grandes FG+. El tamaño y la proporción de neuronas FG+ de cada subpoblación, no fueron alterados por el tratamiento hormonal.

Los resultados de nuestros estudios densitométricos mostraron que luego del tratamiento con E2, los niveles de NRP1 disminuyeron significativamente en la subpoblación de neuronas medianas (control 134 ± 10 vs estrógeno 110 ± 4), no viéndose alterados en las neuronas de pequeño tamaño (control 108 ± 9 vs estrógeno 104 ± 6) (Figura 6).

Figura 5. Demostración de NRP1 en las neuronas sensoriales que proyectan al útero de la rata. Microfotografías de un corte de ganglio de la raíz dorsal de la región tóraco-lumbar (T13-L1) de una rata prepúber que fue inyectada con el trazador retrógrado. La figura **A** muestra dos neuronas trazadas con el *fluorogold* (FG, amarillo). La punta de flecha señala una neurona pequeña y las flechas indican a las otras neuronas medianas. La figura **B** muestra la imagen del mismo corte inmunomarcado para visualizar el receptor neuropilina-1 (NRP1, rojo). Barra de calibración= 20 μ m.

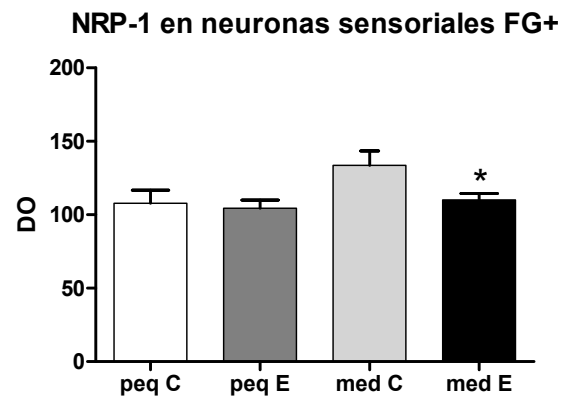
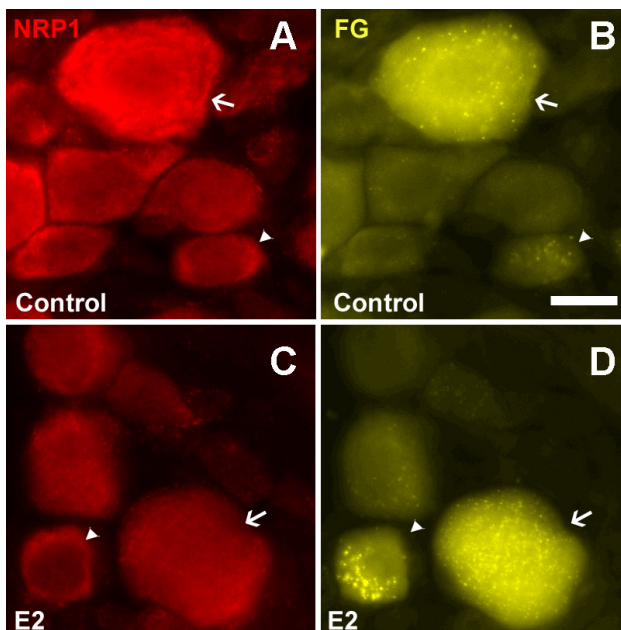
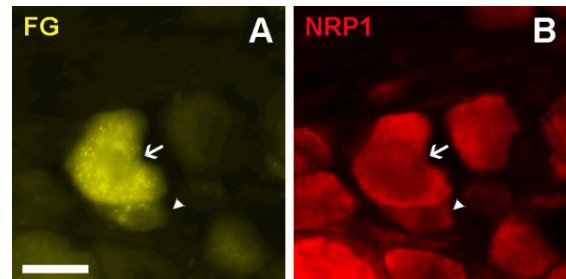


Figura 6. Demostración de NRP1 en las neuronas sensoriales que proyectan al útero de la rata y efectos del E2. Microfotografías de cortes de ganglio de la raíz dorsal inmunomarcados contra neuropilina-1 (NRP1, rojo), provenientes de una rata control (**A**) y otra tratada con E2 (**C**). La figura **A** muestra dos neuronas inmunorreactivas para NRP1, una pequeña (punta de flecha) y otra mediana (flecha), ambas FG+ (amarillo, en **B**). Las figuras **C** y **D** muestran lo mismo, ahora en un corte de GRD de una hembra estrogenizada. Notar como disminuye la señal de NRP1 solamente en la subpoblación de neuronas medianas (flecha en **A** vs. **C**). El gráfico de la derecha muestra los valores de Media + Error Estándar de la Media de la densidad óptica (DO) de intensidad de fluorescencia en función de las distintas subpoblaciones de neuronas FG+ y los tratamientos. Neuronas pequeñas (peq. C y E); neuronas medianas (med. C y E). * =Diferencia significativa de NRP1 de la subpoblación de neuronas medianas respecto a su control ($p=0.015$). Barra de calibración = 12 μ m.

Detección de neuropilina-1 en el útero

En las fibras nerviosas intrauterinas, no se detectó inmunoreactividad para NRP1 ni en los animales control ni en los tratados con E2 (Figura 7). Sin embargo, se detectó inmunoreactividad en los vasos sanguíneos en ambos grupos de animales (Figuras 7A y B). Esta inmunotinción se localizó en el plexo vascular intramiometrial (Figuras 7C, E y H) y en los vasos del endometrio (Figuras 7D y G). También se visualizó una intensa inmunotinción del epitelio luminal (Figuras 7A y B) y glandular del endometrio (g en Figuras 7A, D y F).

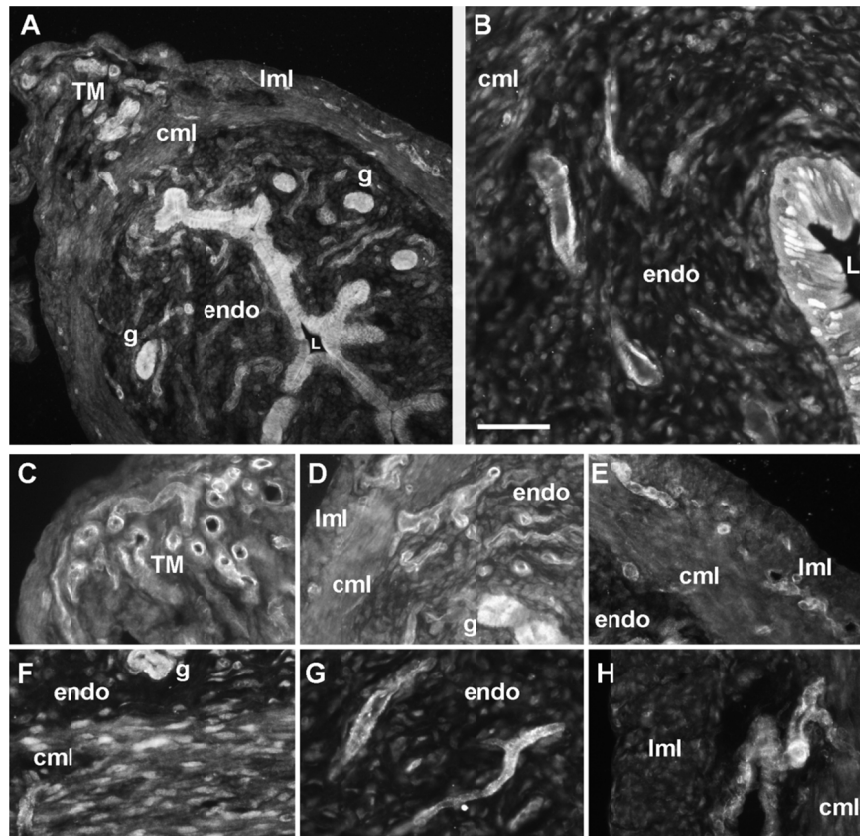


Figura 7. Demostración de NRP1 en el útero de la rata. Microfotografías de cortes de cuernos uterinos inmunomarcados con α -NRP1 de ratas control (A y C-E) y tratadas con E2 (B y F-H). En A y B se muestran vistas panorámicas en las que se aprecia NRP1 en los vasos sanguíneos del miometrio y el endometrio. También se visualizó NRP1 en el epitelio glandular (g) y luminal (L) del endometrio. Las figuras C-E muestran detalles de las estructuras positivas para NRP1 en los úteros control: vasos sanguíneos en el miometrio (C y E) y en el endometrio (D). En D, glándulas endometriales inmunorreactivas. Dada la hipertrofia que experimenta el útero luego del tratamiento con E2, no es posible visualizar ambos compartimientos en una misma imagen. Por ello en las figuras F-H se ilustran detalles de las estructuras positivas para NRP1: glándulas (F) y arterias radiales (G) en el endometrio y vasos sanguíneos del plexo vascular intermiometrial (H). Barras de calibración= 40 µm (A y B); 2 µm (C-H).

Con anterioridad a estos estudios se desconocía si en la rata, las neuronas de proyección al útero expresaban neuropilina-1. En el desarrollo de esta tesis, detectamos por inmunofluorescencia, NRP1 en los somas de las neuronas simpáticas y sensoriales vinculadas al útero, lo que sugiere que éstas serían potencialmente receptivas a las acciones de Sema3A. Si bien aquí no se detectó inmunomarcación de fibras nerviosas a nivel uterino, la observación de nervios inmunorreactivos para NRP1 ya había sido reportada en el útero humano utilizando otros protocolos de inmunohistoquímica (Marzioni y col., 2004).

El análisis densitométrico de la intensidad de fluorescencia para NRP1 mostró que luego del tratamiento con E2, los niveles de este receptor no varían en las neuronas simpáticas. Esto sugiere que la expresión de NRP1 no está regulada por la hormona en este tipo neuronal. Contrariamente, el estrógeno afecta negativamente los niveles neuronales de NRP1 en la subpoblación de neuronas sensoriales medianas vinculadas al útero. La regulación por el estrógeno de la expresión de receptores neuronales para las señales producidas en el útero, ya ha sido demostrada en este modelo (Chalar y col., 2003; Hasan y col., 2005; Richeri y col., 2005). De hecho, en estudios previos mostramos que el estrógeno regula la expresión del receptor para NGF, TrkA, en las neuronas FG+ de los GRD (Chalar y col., 2003). Esto sería consistente con el hecho de que estas neuronas expresan receptores a estrógeno del tipo α y β lo que las hace susceptibles a los efectos directos de esta hormona (Papka y col., 2001).

Considerando el rol inhibitorio de Sema3A sobre los nervios sensoriales, llama la atención que el aumento de Sema3A en el útero coincida con una reducción en la expresión de su receptor neuronal. Este resultado es de difícil interpretación y múltiples explicaciones serían posibles. Por ejemplo, el descenso de NRP1 en los somas sensoriales, podría deberse al hecho de que la proteína esté siendo transportada hacia los terminales. Sin embargo, el hecho de que no se detectaron fibras nerviosas inmunorreactivas para NRP1 dentro del útero argumenta en contra de esta explicación. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que este receptor se esté expresando en las terminales sensoriales intrauterinas con otro perfil temporal. Esta posibilidad concuerda con la expresión de NRP1 en los nervios uterinos humanos y más interesante aún, con el hecho de que la densidad de estos nervios disminuye un 80% en la semana 16 del embarazo,

hecho que además se acompaña de un aumento del ligando a nivel del miometrio (Marzioni y col., 2004).

Otra posibilidad, es que el aumento de Sema3A uterino se vincule con la regulación de otros procesos, tales como la angiogénesis. Varios estudios han demostrado expresión de NRP1 en vasos sanguíneos (Kawakami y col., 1996; Partanen y col., 1999; Kawasaki y col., 1999; Pavelok y col., 2001). En el desarrollo del presente trabajo observamos que NRP1 se expresa en los vasos sanguíneos intrauterinos de las ratas prepúberes y tratadas con E2. Esto confirma observaciones previas que mostraron NRP1 en los vasos sanguíneos del útero de la rata adulta (Pavelok y col., 2001) y también en células endoteliales de la placenta humana (Marzioni y col., 2004).

El útero y su vasculatura experimentan cambios dramáticos durante los cambios fisiológicos que ocurren en el ciclo reproductivo. La angiogénesis es un proceso esencial no sólo para la proliferación del endometrio y su regeneración durante el ciclo sexual, sino que también posee un rol fundamental en el desarrollo y la diferenciación endometrial que ocurre tras la implantación del cigoto en la gestación. Es sabido que NRP1 actúa de co-receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), un potente mitógeno para las células endoteliales que estimula la vasculogénesis y la angiogénesis. NRP1 favorece la unión del VEGF a su receptor VEGFR2 (Soker y col., 1998); un receptor del tipo tirosin-quinasa localizado principalmente en células endoteliales (Ferrara, 1999). Si bien se conocen varias isoformas del VEGF, la de 165 aminoácidos en humanos y 164 en murinos es la variante más potente y la dominante en el útero de varias especies (Halder y col., 2000). La regulación de su expresión por las hormonas sexuales ha sido muy estudiada y las evidencias apoyan un rol del VEGF en la función reproductiva (Olson y col., 2009). El aporte del presente trabajo muestra que los cambios en los niveles de estrógenos inducen en el útero al otro ligando de NRP1, la Sema3A. Esto abre interesantes interrogantes y apoya el concepto clásico de que el crecimiento vascular y el guiado axónico comparten principios mecánicos (Carmeliet y Tessier-Lavigne, 2005; Marko y Damon, 2008).

El papel que jugaría NRP1 a nivel del epitelio glandular y luminal del endometrio, no es claro (Pavelok y col., 2001).

Neuropilina-2

Detección de neuropilina-2 en neuronas simpáticas

En búsqueda de un posible vínculo entre Sema3F y la remodelación que el estrógeno induce en la inervación simpática del útero, evaluamos: (a) si estas neuronas expresan NRP2; (b) si la expresión de NRP2 es constitutiva o regulada por el estrógeno; y (c) si existe una correlación espacio-temporal entre la presencia de Sema3F/NRP2 y la denervación del útero inducida por el estrógeno. Para ello valoramos la expresión de NRP2 en las neuronas simpáticas que proyectan al útero, tanto a nivel ganglionar como en sus fibras terminales intrauterinas. Cabe aclarar que no se exploró NRP2 en las neuronas sensoriales debido a que en la vida postnatal NRP2 es considerado un marcador exclusivo del simpático (Gavazzi 2001; Fassold y col., 2009).

A nivel de los ganglios simpáticos, no se visualizó inmunorreactividad para NRP2 ni en los animales control ni en los tratados con E2. A nivel del cuerno uterino de los controles, se observaron abundantes fibras nerviosas inmunorreactivas para TH, tanto en el miometrio como alrededor de los vasos sanguíneos (Figura 8A). Sin embargo, no se detectó inmunotinción específica para NRP2 en estas fibras nerviosas. Una vez completado el tratamiento con E2, se evidenciaron algunos delicados axones terminales positivos para NRP2, principalmente en asociación con los vasos sanguíneos (Figura 8B). La especificidad de dicha marcación fue confirmada en cortes adyacentes en los que se omitió la incubación con el anticuerpo primario. Dado que al término del tratamiento no se detectan fibras perivasculares positivas para TH (Figura 8C), no se observó co-localización entre ambos marcadores. A nivel del tejido parametrial (mesometrio) de los animales tratados con E2, fue posible observar fibras nerviosas simpáticas marcadas con TH. Si bien, en esta región se observaron también fibras inmunomarcadas con NRP2, no se registraron signos de co-localización entre ambas marcas específicas (Figura 8D).

En el miometrio de los animales tratados con E2, se visualizaron también fibras nerviosas que presentaban inmunorreactividad para NRP2. Estas terminales axónicas se localizaban en las regiones de tejido conjuntivo donde los ensayos de HIS mostraron los transcritos de Sema3F

(por ej., alrededor de los haces musculares y en la cercanía de eosinófilos infiltrados; Figuras 8E-E' y F-F'). Dichas fibras no presentaron inmunorreactividad para TH.

Con el fin de avanzar en la caracterización de la inducción de NRP2 en las fibras nerviosas intrauterinas, se evaluó la inmunotinción para NRP2 en el útero durante el curso del tratamiento hormonal. De esta forma intentamos clarificar el patrón de expresión de NRP2 durante el proceso de degeneración de las fibras nerviosas. A los dos días de iniciado el tratamiento, ya fue posible detectar la presencia de varias fibras nerviosas inmunorreactivas para NRP2, las cuales se localizaban principalmente alrededor de los vasos sanguíneos del plexo intramiometrial (Figura 8G). Si bien no se detectaron signos claros de co-localización, se observaron fibras nerviosas inmunomarcadas con NRP2 que parecían continuarse con un sector que presentaba solamente inmunorreactividad para TH (Figura 8H).

En el tejido parametrial (Figura 8I), fueron reconocidos perfiles axonales marcados con NRP2 o TH pero nuevamente no se observó ningún tipo de co-localización. Luego de la administración de la segunda dosis de estrógeno, pocas fibras nerviosas presentaron inmunorreactividad para NRP2 en el cuerno uterino. Las mismas aparecieron asociadas a los vasos sanguíneos que se ubican entre el mesometrio y el borde antimesometrial, ambas localizaciones perivasculares que carecían de inervación simpática.

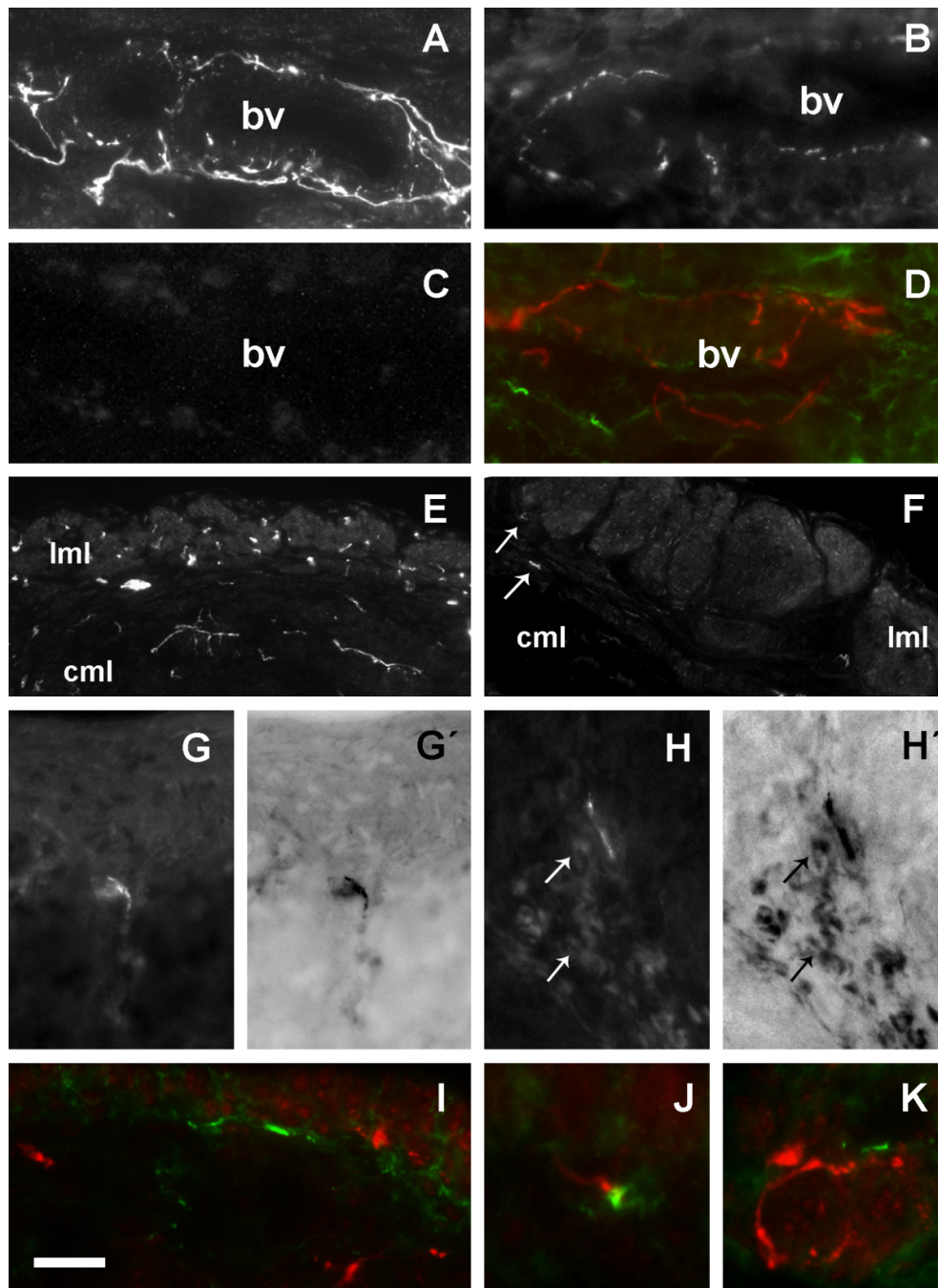


Figura 8. Inmunorreactividad para NRP2 y TH en una población de nervios intrauterinos de la rata. Microfotografías de criocortes de cuernos uterinos. Las figuras **A** y **C** muestran cortes marcados con anti-TH para la demostración de los nervios simpáticos. En **B**, **E** y **F**, los criocortes fueron inmunomarcados contra NRP2 y en **D**, **G**, **H** e **I**, se visualizan cortes que fueron co-inmunomarcados con los dos marcadores neuronales, la NRP2 y la TH. La inmunotinción para TH, permite visualizar en **(A)** la típica inervación simpática que presenta un cuerno uterino de una rata prepúber control. Las imágenes **B** y **C**, de cuernos tratados con E2, muestran nervios perivasculares inmunorreactivos para NRP2 y TH, respectivamente. Nótese como estos nervios, positivos para NRP2, dejaron de tener inmunorreactividad para TH. La figura **D**,

Con anterioridad a estos estudios se desconocía si las neuronas de proyección al útero expresaban NRP2. En nuestros estudios, observamos que luego del tratamiento con E2, aparece señal para NRP2 en algunos delicados procesos neuronales los cuales se localizaban en las mismas regiones en las que se induce su ligando, la Sema3F. La ausencia de señal para NRP2 en los nervios del útero control nos lleva a postular que el estrógeno induce la expresión de este receptor en los nervios intrauterinos. Esta posibilidad se ve apoyada por estudios que muestran que las neuronas simpáticas que inervan al útero presentan una expresión enriquecida de receptores α -estrogénicos (Zoubina y Smith, 2002), los cuales median las respuestas inhibitorias del estrógeno sobre los nervios simpáticos del útero (Zoubina y Smith, 2001). Más aun, estudios de nuestro grupo evidenciaron que in vivo, el estrógeno es capaz de provocar cambios selectivos en la receptividad de las neuronas uterinas a las neurotrofinas (Chalar y col. 2003; Richeri y col. 2005). Finalmente, cabe mencionar que análisis bioinformáticos desarrollados en el transcurso de esta tesis, nos permitieron confirmar que existen secuencias similares a los clásicos EREs en el promotor del gen que codifica para NRP2 (Análisis Bioinformático con el programa Genomatrix-MatInspector, Richeri y Chalar 2009).

Nuestros estudios de inmunofluorescencia revelaron que existe una correlación espacio-temporal inversa entre la presencia de fibras terminales dentro del útero y la expresión de NRP2 en las fibras. En el útero prepúber control no se detectó NRP2 y se visualizaron abundantes fibras nerviosas inmu-

muestra un criocorte de cuerno uterino proveniente de una rata que recibió el tratamiento con E2 completo, en el cual se observan terminales marcadas con TH (rojo) y terminales marcadas con NRP2 (verde) en el mesometrio. Nótese como la marcación específica en cada caso, aparece de forma simultánea pero separada, sin detectarse signos de co-localización. Las figuras E y F, muestran la presencia de fibras IR-NRP2 en el compartimiento miometrial. Notar su distribución, en el tejido conjuntivo que rodea los haces musculares (E', imagen invertida) y en la cercanía de eosinófilos infiltrantes (F', imagen invertida) los cuales mostraron una autofluorescencia no-específica de fondo (flechas). La figura G, muestra la presencia de ambos marcadores neuronales, en un criocorte uterino proveniente de una rata que recibió sólo la primer dosis de E2. Se visualizaron abundantes fibras intrauterinas con marcación específica para TH y NRP2 por separado sin signos de co-localización. En ocasiones, las mismas aparecían muy próximas entre sí(H). La figura I, muestra nuevamente la ausencia de co-localización entre los nervios TH+ y los nervios NRP2+ que se visualizaron alrededor de los vasos del tejido parametrial. *bv*, vaso sanguíneo; *cml*, capa miometrial circular; *lml*, capa miometrial longitudinal. Barra de calibración: 35 μ m (A); 25 μ m (B, C); 20 μ m (D, G, H, I); 30 μ m (E, E', F, F').

norreactivas para TH tanto en el miometrio como alrededor de los vasos sanguíneos. Por el contrario, la pérdida de fibras nerviosas intrauterinas que ocurre en respuesta a E2, coincidió con la aparición del receptor NRP2 en los escasos procesos neuronales que se visualizan al término del tratamiento.

La ausencia de inmunorreactividad para NRP-2 en los somas ganglionares y su visualización en las terminales sugiere que este receptor podría ser sintetizado localmente en las terminales intrauterinas. Esta idea se apoya en numerosos estudios que señalan la importancia de la síntesis proteica local de los receptores de las moléculas de guiado axónico (revisado en [Purves, 2004](#); [Raper y Mason, 2010](#)). La posible síntesis local se ve apoyada también por estudios recientes de secuenciación masiva del transcriptoma axonal que detectaron la presencia de ARNm para semaforinas en el axoplasma de fibras periféricas adultas ([Farias y col., 2014](#)).

La falta de co-marcación entre NRP2 y TH, podría tener varias interpretaciones. Una posible es que los nervios positivos para NRP2 observados en el útero estrogenizado no sean simpáticos. Esta posibilidad se ve desestimada porque NRP2 es considerada un marcador selectivo de nervios simpáticos en la vida postnatal y adulta ([Fassold y col., 2009](#)). Por otra parte, se ha descrito que la interacción específica de Sema3F (y Sema3G) con NRP2 afecta selectivamente a los axones simpáticos, sin afectar a los axones provenientes del ganglio de la raíz dorsal ([Taniguchi y col., 2005](#); [Fassold y col., 2009](#)).

Alternativamente, es posible postular que los nervios inmunomarcados por NRP2 sí son simpáticos, pero que debido a su estado degenerativo ya no expresan a la TH. Varias líneas de evidencia parecen apoyar esta posibilidad. En primer lugar, es posible que el estrógeno disminuya la expresión de TH a nivel de las terminales simpáticas intrauterinas, haciendo que éstas ya no sean demostrables por inmunofluorescencia. En este sentido, en el cobayo, se ha descrito que los niveles uterinos de TH descienden hasta valores casi indetectables al término de la gestación, momento en el cual se incrementan los niveles de estrógenos circulantes. En las gestaciones unilaterales, este descenso de TH se observa tanto en el cuerno “fértil” que contiene fetos y en el cual ocurre una completa degeneración del plexo terminal simpático, como en el cuerno “vacío” - carente de fetos- cuyo plexo de nervios noradrenérgicos se mantiene estructuralmente intacto al término del embarazo ([Owman y col., 1980](#)). La depleción de enzimas de síntesis de la NA de

axones simpáticos intactos, también fue puesta de manifiesto por Zoubina y col. (1998) en el útero de la rata durante el ciclo estral. Estos autores demostraron que en la fase de estro disminuye la densidad de fibras intrauterinas inmunorreactivas para PGP 9.5 (un marcador general de fibras nerviosas intactas) y la de fibras positivas para la dopamina beta-hidroxilasa (D β H), enzima de la vía de la síntesis de NA). Sin embargo, en el proestro se observan fibras positivas para PGP9.5 pero no para D β H sugiriendo que los axones simpáticos pierden a esta enzima aún estando intactos y previo a su degeneración o retracción.

Evidencias aportadas por otros modelos, también apoyan esta interpretación. Por ejemplo, el grupo de Straub, que se ha focalizado en el estudio de la pérdida de fibras nerviosas simpáticas que ocurre en procesos inflamatorios, encontró un descenso en los niveles de TH de los nervios simpáticos degenerantes del tejido sinovial de pacientes con artritis. Es interesante resaltar el hecho de que dichos nervios en degeneración presentan inmunorreactividad para NRP2 aunque carecen de reactividad para TH (Fassold y col., 2009). En este contexto, es posible que en nuestro modelo la NRP2, inducida por el E2 se exprese en los nervios simpáticos intrauterinos en las etapas finales de su proceso degenerativo, momento en el cual la enzima TH ya no está presente en las terminales. Colectivamente, el patrón de expresión de NRP2 revelado en nuestros estudios es consistente con un potencial rol de la vía Sema3F/NRP2 en la plasticidad de los nervios simpáticos uterinos.

En suma, a nivel neuronal, no sólo revelamos que las neuronas uterinas expresan neuropilinas en la vida postnatal sino que también demostramos que la expresión de estos receptores es modulada por el estrógeno. Resulta interesante destacar que encontramos distintos perfiles de regulación de expresión de las neuropilinas neuronales asociados a las distintas subpoblaciones de neuronas que inervan al útero. NRP1 disminuye en las neuronas sensoriales mientras que NRP2 se induce en las fibras terminales simpáticas dentro del efector. Esto podría contribuir a explicar el comportamiento diferencial de las fibras sensoriales y simpáticas que ocurre en el útero estrogenizado. Cabe recordar, que los nervios simpáticos degeneran en respuesta al E2, mientras que en los sensoriales se observa una inhibición de crecimiento que impide que la inervación crezca acompañando el aumento de tamaño del útero. Este comportamiento diferencial contribuye al desbalance simpático-sensorial que ocurre en el útero estrogenizado, en favor de las fibras sensoriales (Brauer y col., 2005; Chávez-Genaro y col., 2002; Chalar y col.,

2003). Considerando el rol inhibitorio de Sema3A sobre ambos tipos de nervios, el hecho de que la modulación de la expresión de NRP1 por el estrógeno esté restringida a la subpoblación sensorial podría explicar el comportamiento diferencial de ambos tipos de nervios frente al aumento de Sema3A en el efector, contribuyendo así al desbalance simpático-sensorial antes mencionado.

Otro hallazgo surgido de la presente tesis que también contribuiría a explicar este fenómeno es la inducción de la vía Sema3F/NRP2 en respuesta al estrógeno. Pusimos de manifiesto, una correlación espacio-temporal positiva entre la inducción del receptor NRP2 y su ligando (los dos aumentan) en respuesta al tratamiento con E2. Más interesante aún, fue el hallazgo de que en función de los niveles estrogénicos, la inducción de esta vía 3F/NRP2 se correlaciona inversamente con la presencia de fibras simpáticas dentro del útero. El hecho de que casi no se detecten fibras NRP2 positivas en el útero estrogenizado, posiblemente esté reflejando una participación de este receptor en el pruning/retracción de las fibras que lo expresan. En este contexto y considerando los efectos de Sema3F sobre los axones simpáticos (Chen y col., 1998, 2000; Giger y col., 1998; Miller y col., 2004; Damon, 2006; Fassold y col., 2009; Ieda y Fukuda, 2009), es posible postular un modelo en el que Sema3F medie los procesos que llevan a la pérdida de los nervios simpáticos intrauterinos en respuesta al estrógeno; sin afectar a la población de fibras sensoriales, las cuales no expresan NRP2 en la vida adulta (Gavazzi, 2001).

Discusión general

Los estudios desarrollados en la presente tesis, permitieron responder a las interrogantes planteadas, en tanto mostraron que el estrógeno induce la expresión uterina de por lo menos dos semaforinas con efectos negativos para los nervios simpáticos y sensoriales. Pusimos de manifiesto además, la existencia de una correlación espacial entre la distribución tisular de estas semaforinas y las áreas de proyección de los nervios simpáticos y sensoriales. Más aún, la inducción de estas señales coincide temporalmente con la remodelación de la inervación uterina por el estrógeno.

En búsqueda de un vínculo que nos permitiera avanzar en la confirmación de nuestra hipótesis exploramos si los nervios simpáticos y sensoriales que inervan al útero son receptivos a las semaforinas identificadas. Demostramos que ambos tipos neuronales expresan neuropilina-1 mientras que las neuronas simpáticas expresan además neuropilina-2. En conjunto, estos resultados sugieren que los incrementos en la producción de Sema3A y Sema3F pueden ser detectados por los nervios uterinos, y apoyan la hipótesis acerca de la posible participación de las semaforinas en la denervación uterina en respuesta al estrógeno.

Es posible postular un modelo por el cual estas señales podrían afectar a la inervación uterina. La degeneración de los nervios simpáticos iniciada por el E2 involucraría a la vía Sema3F/NRP2, dado que Sema3F aumenta en las áreas de proyección de los nervios simpáticos en un marco temporal consistente con su degeneración; y que el E2 induce la expresión de NRP2 en la fibras nerviosas degenerantes. Por su parte, Sema3A también podría estar vinculada con el proceso de degeneración simpática, dado que esta señal también aumenta en respuesta al E2; se localiza en las áreas de proyección de estos nervios y las neuronas simpáticas vinculadas al útero expresan NRP1.

En lo que respecta a los nervios sensoriales, estos también se distribuyen en las áreas donde el E2 induce a *sema3A*. Las neuronas sensoriales vinculadas al útero expresan NRP1 y aunque su expresión disminuye en respuesta al E2, no podemos descartar un posible rol inhibitorio de Sema3A. Por otra parte, la presencia de NRP1 en los vasos sanguíneos sugeriría que esta señal también puede estar vinculada con la angiogénesis, lo que apoya el concepto de que el guiado

axónico y el desarrollo vascular comparten señales y principios mecánicos (Carmeliet y Tessier-Lavigne, 2005; Marko y Damon, 2008).

Colectivamente, estos resultados sugieren una acción redundante de las semaforinas en nuestro modelo de neuroplasticidad regulada, por lo menos en lo que respecta a los nervios simpáticos. Además, es consistente con lo reportado en otros modelos del adulto (Miller y col., 2004; Fassold y col., 2009; Harel y Strittmatter, 2006; Nangle y Keast, 2011) y se ve reforzada por la detección de una semaforina transmembrana, Sema4B, cuyo rol en nuestro modelo es menos evidente. Esta redundancia no es sorprendente dado que estas señales moleculares regulan procesos neurobiológicos fundamentales y están ampliamente representadas en el genoma de los mamíferos y muy conservadas entre los vertebrados e invertebrados. Los resultados generados en esta tesis concuerdan con la visión actual de que los procesos de plasticidad del sistema nervioso re-utilizan señales moleculares relevantes durante el desarrollo (Pasterkamp, 2012; Vo y col., 2013).

Además de un efecto potencialmente redundante de Sema3A y Sema3F en la neurodegeneración regulada de los nervios simpáticos, existen evidencias de que hay otras señales involucradas en este proceso. Los efectos de Sema3F contribuirían a explicar el hecho de que frente a niveles sostenidos de NGF en el útero estrogenizado (Chalar y col., 2003; Bjorling y col., 2002; Krizan-Agbas y col., 2003), las neuronas no respondan con el crecimiento de sus fibras como lo predice la teoría neurotrófica. Llamativamente, Atwal y colaboradores (2003) mostraron que en las neuronas simpáticas, Sema3F interfiere en la vía NGF/TrkA, antagonizando la señalización desencadenada por el NGF. Además, se ha visto que el receptor p75^{NTR} también está implicado en la comunicación entre dichas señales (Sema3F-NGF). Su presencia en las neuronas simpáticas es requerida para que éstas puedan colapsar sus conos de crecimiento en respuesta a Sema3F; y no basta con su presencia, sino que además p75^{NTR} tiene que estar unido a su ligando para que ocurra el colapso mediado por Sema3F (Naska y col., 2010). Este requisito podría ser relevante en nuestro modelo, ya que sabemos que el estrógeno aumenta la expresión de p75^{NTR} en las neuronas simpáticas que proyectan al útero (Richeri y col., 2005).

Si consideramos que se necesita a un p75^{NTR} estimulado por ligando para mediar respuestas de colapso, vale destacar que en el útero también aumentan los niveles de BDNF por efecto del estrógeno (Krizsan-Agbas y col., 2003). El BDNF ejerce acciones neurotróficas sobre distintas poblaciones neuronales del sistema nervioso central, actuando a través de los receptores TrkB y p75^{NTR}. Las neuronas simpáticas no expresan TrkB, pero distintos estudios han mostrado que el BDNF tiene un efecto inhibitorio sobre los nervios simpáticos, tras su interacción con p75^{NTR} (Brann y col., 1999; Kohn y col., 1999; Song y Posse de Chaves, 2003). Esta neurotrofina estaría entonces disponible en el útero estrogenizado y uniéndose a p75^{NTR}, no sólo mediaría sus propios efectos inhibitorios sino que potenciaría los efectos de Sema3F sobre los nervios simpáticos.

Además de las señales mencionadas, cabe resaltar que en el miometrio también existen señales no-difusibles capaces de afectar a los axones que entran en contacto con ellas. Como se mencionó en la introducción (Antecedentes, pág. 15) los ensayos de criocultivo desarrollados en el transcurso de esta tesis, y que también son parte del trabajo de doctorado de la Lic. Paola Bianchimano, mostraron que el E2 modifica los componentes no-difusibles del útero (sustrato) de tal manera que inhibe el crecimiento neurítico de las neuronas simpáticas neonatales y adultas (Richeri, Bianchimano y col., 2010, adjunto). Si bien existen evidencias de que parte de la inhibición mediada por el sustrato involucra el re-alineamiento de las fibras de colágeno (ver Figura 10 en Richeri y col., 2010; Martínez y col., 2012), no podemos descartar la posible acción de señales inhibitorias presentes en el sustrato.

Estas señales pueden ser componentes intrínsecos de la matriz extracelular (proteoglicanos), moléculas que se asocian a la matriz y otras que se expresan en la superficie de las células. Entre las últimas se encontraría la Sema4B. Si bien Sema3A y Sema3F son moléculas secretadas, su difusión *in vivo* es limitada debido a que poseen residuos aminoacídicos básicos en su extremo Ct que tienden a interactuar con moléculas del sustrato. Aunque desconocemos cuánto de estas señales permanece en el sistema de criocultivo, cabe resaltar que observamos que las neuritas simpáticas evitan crecer sobre las áreas de tejido conjuntivo donde se concentran los transcritos de Sema3A y 3F (ver Figura 3C-H en Richeri, Bianchimano y col., 2010, adjunto). Desconocemos aún la influencia del sustrato sobre la vía sensorial, sin embargo, existen evidencias que indican que en el útero estrogenizado también se induce la neurotrimina, Ntm, una proteína de adhesión

celular anclada a la membrana que promueve el crecimiento de los nervios sensoriales e inhibe a los simpáticos (Gil y col., 1998; Krizsan-Agbas y col., 2008).

La regulación multifactorial de la plasticidad de la innervación uterina podría ser la responsable de conferir selectividad a las acciones del estrógeno sobre las distintas poblaciones de fibras nerviosas. Recordemos que el estrógeno causa la degeneración/retracción de los nervios simpáticos pero solo inhibe el crecimiento de las fibras sensoriales sin causar su degeneración. En este marco, es posible que la degeneración simpática sea desencadenada por la acción conjunta de Sema3F, Sema3A, BDNF, Ntm y probablemente también Sema4B. Como ya discutimos, el BDNF actúa vía el p75^{NTR} en los nervios simpáticos y colabora con los efectos inhibitorios de Sema3F. Las fibras sensoriales amielínicas también expresan p75^{NTR} (Mu y col., 1993) y son inhibidas por el BDNF (Gavazzi y col., 1999). Surge así la necesidad de que otros factores compensen los efectos inhibitorios del BDNF evitando la degeneración de los nervios sensoriales. Evidencias de la literatura en conjunto con los hallazgos aquí reportados apoyan esta posibilidad. Por ejemplo, el descenso de NRP1 en las neuronas sensoriales podría limitar las acciones inhibitorias de Sema3A. Además, la Ntm elevada en el útero estrogenizado promueve el crecimiento de las fibras sensoriales y con ello colaboraría a estabilizar a estos axones al mismo tiempo que los simpáticos degeneran (Krizsan-Agbas y col., 2008). Mediante este mecanismo, se lograría el desbalance simpático/sensorial que se observa en el útero estrogenizado.

La existencia de múltiples señales en la regulación de la plasticidad de la innervación uterina resultaría ventajosa al conferir además diferentes perfiles temporales de expresión. Así, la neurotrimina que es rápidamente inducida por el E2 podría contribuir a desencadenar los procesos degenerativos simpáticos mientras que Sema3A y Sema3F actuando junto con el BDNF ayudaría a sostenerlos, dado que su expresión se mantiene por períodos más prolongados. Sería coherente que los cambios del sustrato y así como la inducción de Ntm precedan a la acción de las moléculas secretadas, ya que las fibras necesitan perder primero la adhesión al sustrato para luego poder retraerse.

La existencia de mecanismos redundantes en la regulación de la plasticidad de la innervación uterina refleja la relevancia de este proceso. Como regla general, si un proceso es biológicamente

importante suele estar controlado por varios factores. En tal sentido sería lógico disponer de más de una señal que regule la denervación del útero, la cual ocurre no sólo en el embarazo saludable sino también durante las fluctuaciones hormonales asociadas al ciclo sexual. Finalmente, no podemos descartar que las semaforinas estén involucradas en los procesos inflamatorios que induce el estrógeno en el útero. Los procesos neurodegenerativo e inflamatorio suelen estar relacionados y es por lo tanto probable, que en nuestro modelo los procesos inflamatorios participen en la generación del microambiente hostil para las fibras nerviosas del útero.

Actualmente se piensa, que la comprensión de los mecanismos que regulan la remodelación de la inervación uterina por el estrógeno, ya no representa solamente un problema neurobiológico interesante, sino que constituye además un tema con profundas implicancias para la salud humana. La inervación uterina y su remodelación por las hormonas sexuales han sido vinculados con la sintomatología y posiblemente la etiología de varias patologías ginecológicas, incluyendo la pre-eclampsia (Fried y col., 1996; Rydhström y col., 1989; Burnstock, 2014), los leiomiomas uterinos (Adolfsson y col. 2000; Quinn 2007a; 2007b; Brauer 2008), la endometriosis (Medina y Lebovic, 2009) y la adenomiosis (Quin, 2007b). Por su dependencia del estrógeno, estas condiciones se presentan con mayor incidencia durante los años de actividad reproductiva, afectando la fertilidad y asociándose con síntomas que afectan profundamente la calidad de vida de las mujeres.

Perspectivas

El trabajo incluido en esta tesis nos permitió caracterizar la presencia de tres semaforina en el útero y demostrar que su expresión es regulada por el estradiol. Obtuvimos evidencias que los nervios simpáticos uterinos son receptivos a las acciones de estas señales y que la expresión de sus receptores NRP1 y NRP2 también es regulada hormonalmente. Pudimos establecer una correlación espacio-temporal entre el aumento en la expresión de Semas en el útero, la expresión de sus receptores y la degeneración que el estradiol induce en los nervios simpáticos del útero. También obtuvimos evidencias que indican una posible participación de estas señales en la regulación de la innervación sensorial. Dado que los resultados obtenidos hasta ahora son de naturaleza correlativa, nos resta realizar estudios funcionales que demuestren el impacto de estas semaforinas en la plasticidad de la innervación.

Una posible aproximación sería la realización de ensayos de bloqueo de función *in vitro* contra las vías Sema3F/NRP2 y Sema3A/NRP1. Para el estudio de estas señales difusibles que actúan a distancia, sería razonable usar co-cultivos de miometrio y ganglios nerviosos simpáticos y sensoriales. Estas aproximaciones aparentemente sencillas representan todo un desafío, porque la expresión de los receptores para estas semaforinas es regulada por los estrógenos. Será necesario entonces utilizar neuronas provenientes de animales sexualmente maduros que posean receptividad neuronal al estradiol. No menos importante será determinar las condiciones hormonales específicas que logren la inducción/represión (NRP2/NRP1) de los receptores para semaforinas. Otro aspecto a considerar es la redundancia demostrada de señales inhibitorias difusibles producidas por el miometrio estrogenizado, lo que podría entorpecer la identificación de los efectos de una señal particular de forma individual.

En lo que respecta a Sema4B, será necesaria la identificación de los tejidos y tipos celulares que la producen y también lograr esclarecer su rol en nuestro modelo. Por ser una semaforina de tipo 4 deberemos interferir con la vía de las plexinas del tipo B y utilizar ensayos *in vitro* que permitan evaluar la influencia de señales no-difusibles. En tal sentido podríamos ensayar criocultivos de explantos ganglionares sobre cortes a congelación de miometrio, o alternativamente, co-cultivos de ganglios sobre monocapas de músculo liso miometrial.

La manipulación de la expresión de las semaforinas identificadas en esta tesis (Sema3A, Sema3F y Sema4B) o algunos de sus receptores -por ejemplo, la obtención de animales mutantes- y el estudio del comportamiento de la innervación uterina en esos animales ayudará a elucidar si efectivamente las vías semas/receptor discutidas actúan en los procesos de plasticidad de la innervación uterina. Dado que nuestro modelo es postnatal, sería interesante valorar el ‘apagado’ de estos genes de forma condicional. Sin embargo, es probable que una vez más la redundancia de señales uterinas que son reguladas por el estrógeno y poseen capacidad de modular la innervación, sea necesario bloquear más de una vía para poder obtener datos concluyentes. Este abordaje *in vivo* –a diferencia de los co-cultivos- ofrece la ventaja de que nos evitaría los problemas de la inducción de los receptores por E2.

Otro aspecto muy interesante, sería explorar la participación de las semaforinas en la exclusión de los nervios sensoriales y simpáticos de endometrio humano. Este aspecto es clave para comprender los factores que están alterados en la endometriosis y permiten el crecimiento de los nervios hacia la capa funcional del endometrio, que normalmente no está innervada. Cabe mencionar, que los ensayos de criocultivo de ganglios simpáticos sobre cortes a congelación de endometrio de ratas castradas mostraron que el sustrato endometrial es altamente permisivo para el crecimiento neurítico (ver Figuras 8 y 9 en Richeri, Biancimano y col., 2010). Esto indicaría que *in vivo*, una o más señales inhibitorias contrarrestan la permisividad del sustrato. Luego de la exposición del endometrio al estradiol, los criocultivos mostraron que la permisividad del estroma endometrial disminuye y que las neuritas simpáticas crecen exclusivamente asociadas a las láminas basales de los glándulas endometriales y el epitelio luminal. Sema3A y Sema3F aumentan en el endometrio en respuesta a los estrógenos, principalmente asociadas a los eosinófilos. La participación de Sema4B en este fenómeno debería también ser considerada.

Finalmente, no podemos ignorar las posibles vías de investigación que abren los efectos no-neurales de las semaforinas y sus receptores en los procesos angiogénicos y de tipo inflamatorio que ocurren en el útero en respuesta a los estrógenos.

Algunos de estos tópicos serán desarrollados en nuestros estudios futuros.

Referencias bibliográficas

- Adham N, Schenk E (1969) Autonomic innervation of the rat vagina, cervix, and uterus and its cyclic variations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 104:508-516.
- Adolfsson P, Haug I, Berg G, Svensson S (2000) Changes in beta(2)-adrenoceptor expression and in adenylyl cyclase and phosphodiesterase activity in human uterine leiomyomas. *Mol. Hum. Reprod.* 6:835-842.
- Aizawa H, Wakatsuki S, Ishii A, Moriyama K, Sasaki Y, Ohashi K, Sekine-Aizawa Y, Sehara-Fujisawa A, Mizuno K, Goshima Y, Yahara I (2001) Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for Semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nat Neurosci.* 4:367-373.
- Akira S, Iwasaki N, Ichikawa M, Mine K, Kuwabara Y, Takeshita T, Tajima H (2009) Successful long-term management of adenomyosis associated with deep thrombosis by low-dose gonadotropin-releasing hormone agonist therapy. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 36: 123-125.
- Al-Jefout M, Andreadis N, Tokushige N, Markham R, Fraser I (2007) A pilot study to evaluate the relative efficacy of endometrial biopsy and full curettage in making a diagnosis of endometriosis by the detection of endometrial nerve fibers. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 197:578 e1-4.
- Al-Jefout M, Dezarnaulds G, Cooper M, Tokushige N, Luscombe G, Markham R, Fraser I (2009) Diagnosis of endometriosis by detection of nerve fibres in an endometrial biopsy: a double blind study. *Hum. Reprod.* 24: 3019-3024.
- Alm P, Lundberg L, Wharton J, Polak J (1988) Effects of pregnancy on the extrinsic innervation of the guinea pig uterus. A histochemical, immunohistochemical and ultrastructural study. *Histochem. J.* 20:414-426.
- Andres KH, von Düring M, Jänig W, Schmidt R (1985) Degeneration patterns of postganglionic fibers following sympathectomy. *Anat. Embryol.* 172:133-143.
- Atwal JK, Singh KK, Tessier-Lavigne M, Millar FD, Kaplan DR (2003) Semaphorin 3F antagonizes neurotrophin-induced phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase signaling: a mechanism for growth cone collapse. *J. Neurosci.* 23: 7602-7609.
- Bagnard D, Vaillant C, Khuth S, Dufay N, Lohrum M, Puschel AW, Belin M, Bolz J, Thomasset N (2001) Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor. *J Neurosci.* 21:3332-3341.
- Bagri A, Tessier-Lavigne M (2002) Neuropilins as Semaphorin receptors: in vivo functions in neuronal cell migration and axon guidance. *Adv. Exp. Med. Biol.* 515:13-31.
- Bagri A, Cheng H, Yaron A, Pleasure S, Tessier-Lavigne M (2003) Stereotyped pruning of long hippocampal axon branches triggered by retraction inducers of the semaphorin family. *Cell* 113:285-299.
- Bannerman P, Ara J, Hahn A, Hong L, McCauley E, Friesen K, Pleasure D (2008) Peripheral nerve regeneration is delayed in neuropilin 2-deficient mice. *J. Neurosci. Res.* 86:3163-3169.
- Barcena de Arellano M, Oldeweme J, Arnold J, Schneider A, Mechsner S (2013) Remodeling of estrogen-dependent sympathetic nerve fibers seems to be disturbed in adenomyosis. *Fertil. Steril.* 100:801-809.
- Bell C, Malcolm S (1978) Observations on the loss of catecholamine fluorescence from intrauterine adrenergic nerves during pregnancy in the guinea pig. *J. Reprod. Fert.* 53:51-58.
- Ben-Zvi A, Ben-Gigi L, Yagli Z, Lerman O, Behar O (2007). Semaphorin 3A regulates axon growth independently of growth cone repulsion via modulation of TrkA signaling. *Cell. Signal.* 20:467-479.
- Bernardo B, Gao X, Winbanks C, Boey E, Tham Y, Kiriazis H, Gregorevic P, Obad S, Kauppinen S, Du X, Lin R, McMullen J (2012) Therapeutic inhibition of the miR-34 family attenuates pathological cardiac remodeling and improves heart function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:17615-17620.
- Bianchimano P, Frías AI, Richeri A, Brauer M (2007) Effects of dexamethasone on estrogen- and pregnancy-induced plasticity in uterine sympathetic nerves. *Cell Tissue Res.* 330:413-425.
- Bjorling D, Beckman M, Clayton M, Wang Z (2002) Modulation of nerve growth factor in peripheral organs by estrogen and progesterone. *Neuroscience* 110:155-167.
- Bokor A, Kyama C, Vercruyse L, Fassbender A, Gevaert O, Vodolazkaia A, De Moor B, Fülöp V, D'Hooghe T (2009) Density of small diameter sensory nerve fibres in endometrium: a semi-invasive diagnostic test for

- minimal to mild endometriosis. *Hum. Reprod.* 24:3025-3032.
- Bogomoletz W (1980) Advantages de la coloration par le rouge Sirius de l'amyloïde et des éosinophiles. *Arch. Anat. Cytol. Pathol.* 28:252–253.
- Brann A, Scott R, Neuberger Y, Abulafia D, Boldin S, Fainzilber M, Futerman A (1999) Ceramide signaling downstream of the p75 neurotrophin receptor mediates the effects of nerve growth factor on outgrowth of cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 19: 8199-8206.
- Brauer M, Lincoln J, Blundell D, Corbacho A (1992) Postnatal development of noradrenaline-containing nerves of the rat uterus. *J. Auton. Nerv. Syst.* 39:37-50.
- Brauer M, Corbacho A, Burnstock G (1995) Effects of chronic and acute oestrogen treatment on the development of noradrenaline-containing nerves of the rat uterus. *Int. J. Devl. Neurosci.* 13:791-798.
- Brauer M, Burnstock G (1997) Expression of beta-adrenergic receptors in the rat uterus: effects of puberty and oestrogen treatment during prepubertal development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 16:29-39.
- Brauer M, Burnstock G, Thrasivoulou C, Cowen T (1998) In oculo transplants of myometrium from postpartum guinea pigs fail to support sympathetic reinnervation. *J. Anat.* 193: 509-517.
- Brauer M, Chávez, R, Llodrá J, Richeri A, Scorza C (2000) Effects of chronic oestrogen treatment are not selective for uterine noradrenaline-containing sympathetic nerves: a transplantation study. *J. Anat.* 196: 347-355.
- Brauer M, Chávez-Genaro R, Richeri A, Viettro L, Frias A, Burnstock G, Cowen T (2002) The oestrogenized rat myometrium inhibits organotypic sympathetic reinnervation. *Auton. Neurosci.* 101:13-22.
- Brauer M (2008) Cellular and molecular mechanisms underlying plasticity in uterine sympathetic nerves. *Auton. Neurosci.* 140:1-16.
- Brauer M, Richeri A (2013) Highlights in basic autonomic neuroscience: Semaphorins in the remodeling of autonomic innervation. *Auton. Neurosci.* 174:1-4. (adjunto en Apéndice).
- Brauer M, Smith P (2014) Estrogen and female reproductive tract innervation: cellular and molecular mechanisms of autonomic neuroplasticity. *Auton Neurosci: Special Issue: Estrogen and Autonomic Function* (en prensa).
- Burkhardt C, Müller M, Badde A, Garner C, Gundelfinger E, Püschel A (2005) Semaphorin 4B interacts with the post-synaptic density protein PSD-95/SAP90 and is recruited to synapses through a C-terminal PDZ-binding motif. *FEBS Lett.* 579:3821-3828.
- Burnstock G (2014) Purinergic signalling in the reproductive system in health and disease. *Purinergic Signal.* 10: 157-187.
- Bruckner G, Hartig W, Kacza J, Seeger J, Welt K, Brauer K (1996) Extracellular matrix organization in various regions of rat brain grey matter. *J. Neurocytol.* 25:333-346.
- Bruckner G, Szeoke S, Pavlica S, Grosche J, Kacza J (2006) Axon initial segment ensheathed by extracellular matrix in perineuronal nets. *Neuroscience* 138:365-375.
- Cariboni A, Hickok J, Rakic S, Andrews W, Maggi R, Tischkau S, Parnavelas J (2007) Neuropilins and their ligands are important in the migration of gonadotropin-releasing hormone neurons. *J. Neurosci.* 27: 2387-2395.
- Carmeliet P, Tessier-Lavigne M (2005) Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature Rev.* 436:193-200.
- Carulli D, Pizzorusso T, Kwok J, Putignano E, Poli A, Forostyak S, Andrews M, Deepa S, Glant T, Fawcett JW (2010) Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain* 133:2331-2347.
- Castellani V, Chédotal A, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, Rougon G (2000) Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* 27:237-249.

- Castellani V, Rougon G (2002) Control of semaphorin signaling. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12:532–541.
- Caunt M, Mak J, Liang W, Stawicki S, Pan Q, Tong R, Kowalski J, Ho C, Reslan H, Ross J, Berry L, Kasman I, Zlot C, Cheng Z, Le Couter J, Filvaroff E, Plowman G, Peale F, French D, Carano R, Koch A, Wu Y, Watts, Tessier-Lavigne M, Bagri A (2008) Blocking neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis. *Cancer Cell* 13:331-342.
- Cha K, Lee W, Rudzic A., Miller J (1965) A comparison of the catecholamine concentrations of uteri from several species and the alterations which occur during pregnancy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 148: 9-13.
- Chalar C, Richeri A, Crutcher K, Viettro L, Chávez-Genaro R, Burnstock G, Cowen T, Brauer M (2003) Oestrogen- and sympathectomy-induced plasticity in developing uterine sensory nerves: the role of NGF. *Cell Tissue Res.* 314:191-205.
- Chang E, Frasor J, Komm B, Katzenellenbogen B (2006) Impact of estrogen receptor beta on gene networks regulated by estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Endocrinology* 147:4831-4842.
- Chávez-Genaro R, Crutcher K, Viettro L, Richeri A, Coirolo N, Burnstock G, Cowen T, Brauer M (2002) Differential effects of oestrogen on developing and mature uterine sympathetic nerves. *Cell Tissue Res.* 308:61-73.
- Chédotal A, Del Rio J, Ruiz M, He Z, Borrell V, de Castro F, Ezan F, Goodman C, Tessier-Lavigne M, Sotelo C, Soriano E (1998) Semaphorins III and IV repel hippocampal axons via two distinct receptors. *Development* 125:4313-4323.
- Chen H, Chédotal A, He Z, Goodman C, Tessier-Lavigne M (1997) Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* 19:547-559.
- Chen H, He Z, Bagri A, Tessier-Lavigne M (1998) Semaphorin-neuropilin interactions underlying sympathetic axon responses to class III semaphorins. *Neuron* 21:1283-1290.
- Chen H, Bagri A, Zupicich J, Zou Y, Stoeckli E, Pleasure S, Lowenstein DH, Skarnes WC, Chédotal A, Tessier-Lavigne M. (2000) Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. *Neuron* 25:43-56.
- Cheng H, Bagri A, Yaron A, Stein E, Pleasure S, Tessier-Lavigne M (2001) Plexin-A3 mediates semaphorin signaling and regulates the development of hippocampal axonal projections. *Neuron* 32: 249–263.
- Cloutier J, Giger R, Koentges G, Dulac C, Kolodkin A, Ginty D (2002) Neuropilin-2 mediates axonal fasciculation, zonal segregation, but not axonal convergence, of primary accessory olfactory neurons. *Neuron* 33:877-892.
- Corbacho A, Brauer M, Pérez T (1997) Development and maturation of noradrenaline-containing nerves of the rat uterine artery. Effects of acute and chronic oestrogen treatment. *Int. J. Dev. Neurosci.* 15:363–371.
- Cowen T, Thrasivoulou C (1992) A microscopical assay using densitometric application of image analysis to quantify neurotransmitter dynamics. *J. Neurosci. Meth.* 45:107-116.
- Damon DH (2006) Vascular endothelial-derived semaphorin 3 inhibits sympathetic axon growth. *Am J. Physiol Heart Circ. Physiol.* 290:H1220–H1225.
- De Winter F, Oudega M, Lankhorst A, Hamers F, Blits B, Ruitenbergh M, Pasterkamp R, Gispen W, Verhaagen J (2002) Injury-induced class 3 semaphorin expression in the rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 175:61-75.
- Degano A, Pasterkamp R, Ronnett G (2009) MeCP2 deficiency disrupts axonal guidance, fasciculation, and targeting by altering Semaphorin 3F function. *Mol. Cell. Neurosci.* 42:243-254.
- Dent E, Barnes A, Tang F, Kalil K (2004) Netrin-1 and semaphorin 3A promote or inhibit cortical axon branching, respectively, by reorganization of the cytoskeleton. *J. Neurosci.* 24:3002-3012.
- Deroo B, Hewitt S, Peddada S, Korach K (2004) Estradiol regulates the thioredoxin antioxidant system in the mouse uterus. *Endocrinology* 145:5485-5492.
- Dontchev V, Letourneau P (2002) Nerve growth factor and semaphorin 3A signaling pathways interact in regulating sensory neuronal growth cone motility. *J Neurosci* 22:6659–6669.

- Ebendal T (1982) Orientational behavior of extending neurites. *En: Bellairs R, Curtis A, Dunn G, editors. Cell Behavior. A tribute to Michael Abercrombie.* Cambridge: Cambridge University Press. Pp 281–297.
- Eichman A, Simons M (2012) VEGF signalling inside vascular endothelial cells and beyond. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24:188-193.
- Ennis B, Stumpf W (1989) Autoradiographic localization of [³H]hydrotamoxifen in oestrogen- and antioestrogen-binding sites. *Hist. J.* 21:52-60.
- Evans R (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240 :889-896.
- Falck B, Gardmark S, Nybell G, Owman C, Rosengren E, Sjöberg N (1974) Ovarian influence on the content of norepinephrine transmitter in the guinea pig and rat uterus. *Endocrinology* 94:1475-1479.
- Falk B, Owman C, Rosengren E, Sjöberg N (1975) Reduction by progesterone of the estradiol-induced increase in transmitter level of the short adrenergic neurons innervating the uterus. *Endocrinology* 19:1475–1482.
- Fan J, Mansfield S, Redmond T, Gordon-Weeks P, Raper J (1993) The organization of F-actin and microtubules in growth cones exposed to a brain-derived collapsing factor. *J. Cell. Biol.* 121:867-878.
- Fariás J, Di Paolo A, Canclini L, Sotelo-Silveira J (2014) Análisis del transcriptoma de axones mielínicos mediante secuenciación masiva. *Resumen XV Jornadas SUB.* Mesa Redonda de la Sociedad de Neurociencias del Uruguay, Dr Luis Colom. *Libro de resúmenes SUB* p65.
- Fassold A, Falk W, Anders S, Hirsch T, Mirsky V, Straub R (2009) Soluble neuropilin-2, a nerve repellent receptor, is increased in rheumatoid arthritis synovium and aggravates sympathetic fiber repulsion and arthritis. *Arthritis Rheum* 60:2892-2901.
- Feiner L, Koppel A, Kobayashi H, Raper J (1997) Secreted chick semaphorins bind recombinant neuropilin with similar affinities but bind different subsets of neurons in situ. *Neuron* 19:539-545.
- Ferrara N (1999) Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 237:1-30.
- Fong C, Burgoon L, Williams K, Forgacs A, Zacharewski T (2007) Comparative temporal and dose-dependent morphological and transcriptional uterine effects elicited by tamoxifen and ethynylestradiol in immature, ovariectomized mice. *BMC Genomics* 8:151-165.
- Fried G, Hökfelt T, Lundberg J, Terenius L, Hamberger L (1986) Neuropeptide Y and noradrenaline in human uterus and myometrium during normal and pre-eclamptic pregnancy. *Hum. Reprod.* 1:359-364.
- Fujisawa H, Ohtsuki T, Takagi S, Tsuji T (1989) An aberrant retinal pathway and visual centers in *Xenopus* tadpoles share a common cell surface molecule, A5 antigen. *Dev Biol.* 135:231-40.
- Fujisawa H, Takagi S, Hirata T (1995) Growth-associated expression of a membrane protein, neuropilin, in *Xenopus* optic nerve fibers. *Dev Neurosci.* 17:343-349.
- Fujisawa H, Kitsukawa T, Kawakami A, Takagi S, Shimizu M, Hirata T (1997) Roles of a neuronal cell-surface molecule, neuropilin, in nerve fiber fasciculation and guidance. *Cell Tissue Res.* 290:465-470.
- Fujisawa H, Kitsukawa T (1998) Receptors for collapsin/semaphorins. *Curr Opin Neurobiol* 8: 587-592.
- Fujisawa H (2004) Discovery of semaphorin receptors, neuropilin and plexin, and their functions in neural development. *J Neurobiol* 59:24-33.
- Gammill L, Gonzalez C, Gu C, Bronner-Fraser M (2006) Guidance of trunk neural crest migration requires neuropilin 2/semaphorin 3F signaling. *Development* 133: 99-106
- Gavazzi I, Cowen T (1996) Can the neurotrophic hypothesis explain degeneration and loss of plasticity in mature and ageing autonomic nerves? *J. Auton. Nerv. Syst.* 58:1-10.
- Gavazzi I, Kumar R, McMahon S, Cohen J (1999) Growth responses of different subpopulations of adult sensory neurons to neurotrophic factors in vitro. *Eur J Neurosci.* 11:3405-3414.
- Gavazzi I, Stonehouse J, Sandvig A, Reza J, Appiah-Kubi L, Keynes R, Cohen J (2000) Peripheral, but not central, axotomy induces neuropilin-1 mRNA expression in adult large diameter primary sensory neurons.

- Gavazzi I (2001) Semaphorin-neuropilin-1 interactions in plasticity and regeneration of adult neurons. *Cell Tissue Res* 305:275-284.
- Giger R, Urquhart E, Gillespie S, Levensgood D, Ginty D, Kolodkin A (1998) Neuropilin-2 is a receptor for semaphorin IV: insight into the structural basis of receptor function and specificity. *Neuron* 21:1079-1092.
- Giger R, Cloutier J, Sahay A, Prinjha R, Levensgood D, Moore S, Pickering S, Simmons D, Rastan S, Walsh F, Kolodkin A, Ginty D, Geppert M (2000) Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron* 25:29-41.
- Gil O, Zanazzi G, Struyk A, Salzer J (1998) Neurotrimin mediates bifunctional effects on neurite outgrowth via homophilic and heterophilic interactions. *J. Neurosci.* 18:9312-9325.
- Giordano S, Corso S, Conrotto P, Artigiani S, Gilestro G, Barberis D, Tamagnone L, Comoglio P (2002) The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. *Nat Cell Biol.* 4:720-724.
- Gnanamanickam G, Llewellyn-Smith I (2011) Innervation of the rat uterus at estrus: a study in full-thickness, immunoperoxidase-stained whole-mount preparations. *J. Comp. Neurol.* 519:621-643.
- Goshima Y, Ito T, Sasaki Y, Nakamura F (2002) Semaphorins as signals for cell repulsion and invasion. *J. Clin. Invest* 109:993-998.
- Grunwald I, Klein R (2002) Axon guidance: receptor complexes and signaling mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12: 250-259.
- Gu Y, Ihara Y (2000) Evidence that collapsin response mediator protein-2 is involved in the dynamics of microtubules. *J Biol Chem.* 275:17917-17920.
- Haase E, Buchman J, Tietz A, Schramm L (1997) Pregnancy-induced uterine neuronal degeneration in the rat. *Cell Tissue Res.* 288:293-306.
- Hafez ES (1970) Female reproductive organs. Cap. 4. En *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals*. Lea & Febiger.
- Halder J, Zhao X, Soker S, Paria B, Klagsbrun M, Das S, Dey S (2000) Differential expression of VEGF isoforms and VEGF(164)-specific receptor neuropilin-1 in the mouse uterus suggests a role for VEGF(164) in vascular permeability and angiogenesis during implantation. *Genesis* 26:213-24.
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-514.
- Hall A, Lalli G (2010) Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a001818.
- Harel N, Strittmatter S (2006) Can regenerating axons recapitulate developmental guidance during recovery from spinal cord injury? *Nat. Rev. Neurosci.* 7:603-616.
- Hasan W, Smith H, Ting A, Smith P (2005) Estrogen alters trkA and p75 neurotrophin receptor expression within sympathetic neurons. *J Neurobiol.* 65:192-204.
- He Z, Tessier-Lavigne M (1997) Neuropilin is a receptor for the axon chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90:739-751.
- He X, García K (2004) Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science.* 304:870-875.
- Hempstead B, Martin-Zanca D, Kaplan D, Parada L, Chao M (1991) High affinity binding requires co-expression of trk proto-oncogen and the low affinity NGF receptor. *Nature* 350:678-683.
- Hendry S, Jones E, Hockfield S, McKay R (1988) Neuronal populations stained with the monoclonal antibody Cat-301 in the mammalian cerebral cortex and thalamus. *J. Neurosci.* 8:518-542.
- Hong S, Nah H, Lee J, Lee Y, Lee JW, Gye M, Kim C, Kang B, Kim M (2004) Estrogen regulates the expression of the small proline-rich 2 gene family in the mouse uterus. *Mol. Cells* 17:477-484.

- Hou S, Keklikian A, Slinn J, O'Hare M, Jiang S, Aylsworth A (2008) Sustained up-regulation of Semaphorin 3A, Neuropilin1, and Doublecortin expression in ischemic mouse brain during long-term recovery. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 367:109-115.
- Ibáñez C, Ebendal T, Barbany G, Murray-Rust J, Blundell T, Persson H (1992) Disruption of the low-affinity receptor-binding site in NGF allows neuronal survival and differentiation by binding to the trk gene product. *Cell* 69:329-341.
- Houdeau E, Prud'homme M, Rousseau A, Rousseau J (1995) Distribution of noradrenergic neurons in the female rat pelvic plexus and involvement in the genital tract innervation. *J. Auton. Nerv. Syst.* 54:113-125.
- Houdeau E, Rousseau A, Meusnier C, Prud'homme M, Rousseau J (1998) Sympathetic innervation of the upper and lower regions of the uterus and cervix in the rat have different origins and routes. *J. Comp. Neurol.* 399:403-412.
- Hung R, Terman J (2011) Extracellular Inhibitors, Repellents, and Semaphorin/Plexin/MICAL-Mediated Actin Filament Disassembly. *Cytoskeleton* 68:415-433
- Ieda M, Kanazawa H, Kimura K, Hattori F., Ieda Y, Taniguchi M, Lee J, Matsumura K, Tomita Y, Miyoshi S, Shimoda K, Makino S, Sano M, Kodama I, Ogawa S, Fukuda K (2007) Sema3a maintains normal heart rhythm through sympathetic innervation patterning. *Nature Med.* 13:604-612.
- Ieda M, Fukuda K (2009) New aspects for the treatment of cardiac diseases based on the diversity of functional controls on cardiac muscles: the regulatory mechanisms of cardiac innervation and their critical roles in cardiac performance. *J. Pharmacol. Sci.* 109:348-353.
- Jin Z, Strittmatter S (1997) Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse. *J. Neurosci.* 17:6256-6263.
- Johnson J (1999) Neurotrophic factors. En *Fundamental Neuroscience* (M. Zigmond, F. Bloom, S. Landis, J. Roberts & L. Squire, eds), pág. 611-635. Academic Press, San Diego.
- Joseph D, Ho S, Syed V (2010) Hormonal regulation and distinct functions of semaphorin-3B and semaphorin-3F in ovarian cancer. *Mol. Cancer Ther.* 9:499-509.
- Ju G, Han Z, Fan L (1989) Fluorogold as a retrograde tracer used in combination with immunohistochemistry. *J. Neurosci. Methods* 29:69-72.
- Kamo A., Tominaga M., Taneda K., Ogawa H., Takamori K. (2013) Neurotrophin inhibits the increase in intraepidermal nerve density in the acetone-treated dry-skin mouse model. *Clinical and Experimental Dermatology* 38:665-668.
- Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M, Kishino A, Kikuchi K, Shibata S, Okano H, Ikegami T, Moriya A, Konishi O, Nakayama C, Kumagai K, Kimura T, Sato Y, Goshima Y, Taniguchi M, Ito M, He Z, Toyama Y, Okano H (2006) A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nature Med.* 12:1380-1389.
- Kapfhammer J, Raper J (1987) Collapse of growth cone structure on contact with specific neurites in culture. *J. Neurosci.* 7:201-212.
- Kawakami A, Kitsukawa T, Takagi S, Fujisawa H (1996) Developmentally regulated expression of a cell surface protein, neuropilin, in the mouse nervous system. *J. Neurobiol.* 29:1-17.
- Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T, Fujisawa H (1999) A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 126:4895-4902.
- Kawasaki T, Bekku Y, Suto F, Kitsukawa T, Taniguchi M, Nagatsu I, Nagatsu T, Itoh K, Yagi T, Fujisawa H (2002) Requirement of neuropilin 1-mediated Sema3A signals in patterning of the sympathetic nervous system. *Development* 129:671-680.
- Kitsukawa T, Shimono A, Kawakami A, Kondoh H, Fujisawa H (1995) Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* 121:4309-4318.

- Kitsukawa T, Shimizu M, Sanbo M, Hirata T, Taniguchi M, Bekku Y, Yagi T, Fujisawa H (1997) Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 19:995-1005.
- Ko J, Morishige N, Yanai R, Nishida T (2008) Up-regulation of semaphorin 3A in human corneal fibroblasts by epidermal growth factor released from cocultured human corneal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.*377:104-108.
- Kobayashi H, Yamada Y, Morioka S, Niuro E, Shigemitsu A, Ito F (2014) Mechanism of pain generation for endometriosis-associated pelvic pain. *Arch. Gynecol. Obstet.* 289:13-21.
- Kobayashi H, Koppel A, Luo Y, Raper J (1997) A role for collapsin-1 in olfactory and cranial sensory axon guidance. *J. Neurosci.* 17: 8339-8352.
- Kolodkin A, Matthes D, O'Connor T, Patel N, Admon A, Bentley D, Goodman C (1992) Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron* 9:831-845.
- Kolodkin A, Matthes D, Goodman C (1993) The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75:1389-1399.
- Kolodkin A, Ginty D (1997) Steering clear of semaphorins: neuropilins sound the retreat. *Neuron* 19:1159-1162.
- Kolodkin A, Levengood D, Rowe E, Tai Y, Giger R, Ginty D (1997) Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90: 753-762.
- Kolodkin A (1998) Semaphorin-mediated neuronal growth cone guidance. *Prog Brain Res.* 117:115-132.
- Koch S (2012) Neuropilin signalling in angiogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 40: 20-25.
- Kohn J, Aloyz R, Toma J, Haal-Frendsch M, Miller F (1999) Functionally antagonistic interactions between the TrkA and p75 neurotrophin receptors regulate sympathetic neuron growth and target innervation. *J. Neurosci.* 19:5393-5408.
- Krizsan-Agbas D, Smith P (2002) Oestrogen modulates myometrium-induced sympathetic neurite formation through actions on target and ganglion. *Neuroscience* 114: 339-347.
- 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.
- Krizsan-Agbas D, Pedchenko T, Smith P (2008) Neurotrimin is an estrogen-regulated determinant of peripheral sympathetic innervation. *J. Neurosci. Res.* 86 :3086–3095.
- Koppel A, Feiner L, Kobayashi H, Raper J (1997) A 70 amino acid region within the semaphorin domain activates specific cellular response of semaphorin family members. *Neuron* 19:531-537.
- Korsching S, Thoenen H (1983) Nerve growth factor in sympathetic ganglia and corresponding target organs of the rat, correlation with density of sympathetic innervation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3513-3616.
- Kushner P, Agard D, Feng W-J, Lopez G, Schiau A, Uht R, Webb P, Greene G (2000) Oestrogen receptor function at classical and alternative response elements. En: *Neuronal and Cognitive Effects of Oestrogens*. Wiley, Chichester (Novartis Foundation Symposium 230) pp. 20-32.
- Kuzirian M, Paradis S (2011) Emerging themes in GABAergic synapse development. *Prog Neurobiol.* 95:68-87.
- Latini C, Frontini A, Morrioni M, Marzioni D, Castellucci M, Smith P (2008) Remodeling of uterine innervation. *Cell Tissue Res.* 334:1-6.
- Lillesaar C, Fried K (2004) Neurites from trigeminal ganglion explants grown in vitro are repelled or attracted by tooth-related tissues depending on developmental stage. *Neuroscience* 125:149-161.
- Liu X, Low L, Jones E, Cheng H (2005) Stereotyped axon pruning via plexin signaling is associated with synaptic complex elimination in the hippocampus. *J Neurosci.* 25:9124-34.
- Luo Y, Raible D, Raper J (1993) Collapsin: a protein in brain that induces collapse and paralysis of neuronal

- growth cones. *Cell* 75:217-227.
- Luo Y, Shepherd I, Li J, Renzi M, Chang S, Raper J (1995) A family of molecules related to collapsin in the embryonic chick nervous system. *Neuron* 14:1131-1140.
- Lundberg L, Alm P, Thorbert G (1989) Local mechanical effects and humoral factors evoke degeneration of guinea pig uterine innervation. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 68:487-496.
- Marin O, Yaron A, Bagri A, Tessier-Lavigne M, Rubenstein J (2001) Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin neuropilin interactions. *Science* 293:872-875.
- Mann F, Chauvet S, Rougon G (2007) Semaphorins in development and adult brain: Implication for neurological diseases. *Prog Neurobiol* 82:57-79.
- Mark M, Lohrum M, Puschel A (1997) Patterning neuronal connections by chemorepulsion: the semaphorins. *Cell Tissue Res.* 290:299-306.
- Marshall J (1970) Adrenergic innervation of the female reproductive tract: anatomy, physiology and pharmacology. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 62:5-67.
- Marko S, Damon D (2008) VEGF promotes vascular sympathetic innervation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294:H2646-H2652.
- Martínez GF (2012) Contribución de la reorganización del colágeno en la plasticidad de la inervación simpática del útero. Tesina de grado. Lic. en Ciencias Biológicas. FCien-UdelaR.
- Marzioni D, Tamagnone L, Capparuccia L, Marchini C, Amici A, Todros T, Bischof P, Neidhart S, Grenningloh G, Castellucci M (2004) Restricted Innervation of Uterus and Placenta During Pregnancy: Evidence for a Role of the Repelling Signal Semaphorin 3A. *Dev. Dynamics* 231:839-848.
- Mechsner S (2014) Nerve repellent factors affect the inflammatory condition of endometriosis. 12th World Congress on Endometriosis, Sao Paulo, S6-1 (Abstract).
- Medina M, Lebovic D (2009) Endometriosis-associated nerve fibers and pain. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 88: 968-975.
- Messersmith E, Leonardo E, Shatz C, Tessier-Lavigne M, Goodman C., Kolodkin A (1995) Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron* 14: 949-959.
- Miller L, Weidler C, Falk W, Angele P, Schaumburger J, Scholmerich J, Straub R (2004) Increased prevalence of semaphorin 3C, a repellent of sympathetic nerve fibers, in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50:1156-1163.
- Moustafa F (1988) Changes in cholinergic and noradrenergic nerves in the pregnant and postpartum uterus of the albino rat and guinea pig. *Acta Anat.(Base)* 132:310-316.
- Mu X, Silos-Santiago I, Carroll S, Snider W (1993) Neurotrophin Receptor Genes Are Expressed in Distinct Patterns in Developing Dorsal Root Ganglia. *J.Neurosci.* 73:4029-4041.
- Mueller BK (1999) Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Ann. Rev. Neurosci.* 22: 351-388.
- Nakagawa Y, Takamatsu H, Okuno T, Kang S, Nojima S, Kimura T, Kataoka T, Ikawa M, Toyofuku T, Katayama I, Kumanogoh A (2011) Identification of semaphorin 4B as a negative regulator of basophil-mediated immune responses. *J. Immunol.* 186:2881-2888.
- Nakamura F, Kalb R, Strittmatter S (2000) Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance. *J Neurobiol.* 44:219-229.
- Nance D, Burns J, Klein C, Burden H (1988) Afferent fibers in the reproductive system and pelvic viscera of female rats; Anterograde tracing and immunohistochemical studies. *Brain Res. Bull.* 21:701-709.
- Nangle M, Keast J (2011) Semaphorin 3A inhibits growth of adult sympathetic and parasympathetic neurones via distinct cyclic nucleotide signalling pathways. *British Journal of Pharmacology* 162:1083-1095.
- Naska S, Lin D, Miller F, Kaplan D (2010) p75NTR is an obligate signalling receptor required for cues that cause

- sympathetic neuron growth cone collapse. *Mol. Cell. Neurosci.* 45:108-120.
- Niclou S, Ehlert E, Verhaagen J (2006) Chemorepellent axon guidance molecules in spinal cord injury. *J Neurotrauma* 23:409-421.
- Ochs S (1972) Fast transport of materials in mammalian nerve fibers. *Science* 176:252-260.
- Orike N, Thrasivoulou C, Wrigley A, Cowen T (2001) Differential regulation of survival and growth in adult sympathetic neurons: an *in vitro* study of neurotrophin responsiveness. *J. Neurobiol.* 47:295-305.
- Ortega N, Hutchings H, Plouet J (1999) Signal relays in the VEGF system. *Front Biosci* 4:D141–D152.
- Ortega-Villalobos M, García-Bazán M, Solano-Flores L, Ninomiya-Alarcón J, Guevara-Guzmán R, Wayner M (1990) Vagus nerve afferent and efferent innervation of the rat uterus: an electrophysiological and HRP study. *Brain Res Bull.* 25:365-371.
- Osol G, Mandala M (2009) Maternal Uterine Vascular Remodeling During Pregnancy. *Physiology* 24: 58–71.
- Owesson C, Pizzey J, Tonge D (2000) Sensitivity of NGF-responsive dorsal root ganglion neurons to semaphorin D is maintained in both neonatal and adult mice. *Exp Neurol* 165:394-398.
- Owman C, Alm P, Rosengren E, Sjöberg N, Thorbert G (1976) Variations in the level of uterine norepinephrine during pregnancy in the guinea pig. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 122:961-964.
- Owman C (1981) Pregnancy induces degenerative and regenerative changes in the autonomic innervation of the female reproductive tract. *Development of the autonomic nervous system. Pitman Medical, London (Ciba Foundation symposium 83) p. 252-279.*
- Owman C, Stjernquist M (1988) Origin, distribution, and functional aspects of aminergic and peptidergic nerves in the male and female genital tracts. En: *Handbook of Chemical Neuroanatomy* (eds. A. Björklund, T. Hökfelt, Ch. Owman), Elsevier Science Publishers, pp. 445-544.
- Oztas E (2003) Neuronal tracing. *Neuroanatomy* 2:2-5.
- Papka R, Traurig H (1993) Autonomic and visceral sensory innervation of the female reproductive system: special reference to neurochemical markers in nerves and ganglionic connections. En: *Nervous Control of the Urogenital System.* (Ed. Maggi C.A.), pág. 423-436. Harwood Academic Publishers, Switzerland.
- Papka R, Traurig H, Schemann M, Collins J, Copelin T, Wilson K (1999) Cholinergic neurons of the pelvic autonomic ganglia and uterus of the female rat: distribution of axons and presence of muscarinic receptors. *Cell Tissue Res.* 296:293-305.
- Papka R, Storey-Workley M, Shughrue P, Merchenthaler I, Collins J, Usip S, Saunders P, Shupnik M (2001) Estrogen receptor-alpha and beta- immunoreactivity and mRNA in neurons of sensory and autonomic ganglia and spinal cord. *Cell Tissue Res.* 304:193-214.
- Papka R, Mowa C (2003) Estrogen receptors in the spinal cord, sensory ganglia and pelvic autonomic ganglia. *Int. Rev. Cytol.* 231:91-127.
- Paradis S, Harrar D, Lin Y, Koon A, Hauser J, Griffith E, Zhu L, Brass L, Chen C, Greenberg M (2007) An RNAi-based approach identifies molecules required for glutamatergic and GABAergic synapse development. *Neuron* 53:217-232.
- Partanen T, Makinen T, Arola J, Suda T, Weich H, Alitalo K (1999) Endothelial growth factor receptors in human fetal heart. *Circulation* 100:583–586.
- Pasterkamp R, Giger R, Verhaagen J (1998a) Regulation of semaphorin III/collapsin-1 gene expression during peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol.* 153:313-327.
- Pasterkamp R, De Winter F, Holtmaat A, Verhaagen J (1998b) Evidence for a role of the chemorepellent Semaphorin III and its receptor neuropilin-1 in the regeneration of primary olfactory axons. *J. Neurosci.* 18: 9962-9976.
- Pasterkamp R, Giger R, Ruitenbergh M, Holtmaat A, Wit J, De W, Verhaagen J (1999) Expression of gene encoding the chemorepellent semaphorin III is induced in the fibroblast components of neural scar tissue formed following injuries of adult but not neonatal CNS. *Mol. Cell Neurosci.* 13: 143-166.

- Pasterkamp R, Giger R, Baker R, Hermens W, Verhaagen J (2000) Ectopic adenoviral vector-directed expression of Semaphorin 3A in organotypic spinal cord explants inhibits growth of primary sensory afferents. *Dev. Biol.* 220:129-141.
- Pasterkamp R, Verhaagen J (2001) Emerging roles for semaphorins in neural regeneration. *Brain Res. Rev.* 35:36-54.
- Pasterkamp R, Kolodkin A (2003) Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13:79-89.
- Pasterkamp R, Dai H, Terman J, Wahlin K, Kim B, Bregman B, Popovich P, Kolodkin A (2005) MICAL flavoprotein monooxygenases: expression during neural development and following spinal cord injuries in the rat. *Mol. Cell. Neurosci.* 31:52-69.
- Pasterkamp R, Verhaagen J (2006) Semaphorins in axon regeneration: developmental guidance molecules gone wrong? *Phil. Trans. R. Soc. B* 361:1499-1511.
- Pasterkamp R, Giger R (2009) Semaphorin function in neural plasticity and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19:263-274.
- Pasterkamp R (2012) Getting neural circuits into shape with semaphorins. *Nat Rev Neurosci.* 13:605-618.
- Pavelock K, Braas K, Ouafik L, Osol G, May V (2001) Differential expression and regulation of the vascular endothelial growth factor receptors neuropilin-1 and neuropilin-2 in rat uterus. *Endocrinology* 142:613-622.
- Peterson E, Crain S (1982) Preferential growth of neurites from isolated fetal mouse dorsal root ganglia in relation to specific regions of co-cultured spinal cord explants. *Dev. Brain. Res.* 2:363-382.
- Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Hall W, LaMantia A, McNamara J, Williams S Eds. (2004). Sección IV The changing brain. Capítulo. 22 *Construction of neural circuits*. p.527. En: *Neuroscience* 3rd Ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, USA.
- Püschel A, Adams R, Betz H (1995) Murine semaphorin D/collapsin is a member of a diverse gene family and creates domains inhibitory for axonal extension. *Neuron* 14:941-948.
- Püschel A, Adams R, Betz H (1996) The sensory innervation of the mouse spinal cord may be patterned by differential expression of and differential responsiveness to semaphorins. *Mol. Cell. Neurosci.* 7:419-431.
- Püschel A (2002). The function of neuropilin/plexin complexes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 515:71-80.
- Püschel A (2007) GTPases in semaphorin signaling. *Adv Exp. Med. Biol.* 600:12-23.
- Quach T, Duchemin A., Rogemond V., Aguera M., Honnorat J., Belin M., Kolattukudy P (2004) Involvement of collapsin response mediator proteins in the neurite extension induced by neurotrophins in dorsal root ganglion neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 25:433-443.
- Quinn M (2007a) Uterine innervation in fibroids: a qualitative study. *J. Obstet. Gynaecol.* 27:489-492.
- Quinn M (2007b) Uterine innervation in adenomyosis. *J. Obstet. Gynaecol.* 27:287-291.
- Raper J (2000) Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10:88-94.
- Raper J, Mason C (2010) Cellular Strategies of Axonal Pathfinding. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1-21.
- Renzi M, Feiner L, Koppel A, Raper J (1999) A dominant negative receptor for specific secreted semaphorins is generated by deleting an extracellular domain from neuropilin-1. *J Neurosci.* 19:7870-7880.
- Reza J, Gavazzi I, Cohen J (1999) Neuropilin-1 is expressed on adult mammalian dorsal root ganglion neurons and mediates semaphorin3a/collapsin-1-induced growth cone collapse by small diameter sensory afferents. *Mol. Cell. Neurosci.* 14:317-326.
- Rhen T, Grissom S, Afshari C, Cidlowski J (2003) Dexamethasone blocks the rapid biological effects of 17beta-estradiol in the rat uterus without antagonizing its global genomic actions. *FASEB J.* 17:1849-1870.
- Rice F, Albers K, Davis B, Silos-Santiago I, Wilkinson G, LeMaster A, Ernfors P, Smeyne R, Aldskogius H, Phillips H, Barbacid M, DeChiara T, Yancopoulos G, Dunne C, Fundin B (1998) Differential dependency of

- unmyelinated and A delta epidermal and upper dermal innervation on neurotrophins, trk receptors, and p75LNGFR. *Dev Biol.* 198:57-81.
- Richeri A, Viettro L, Chavez-Genaro R, Burnstock G, Cowen T, Brauer M (2002) Effects of infantile/prepubertal chronic estrogen treatment and chemical sympathectomy with guanethidine on developing cholinergic nerves of the rat uterus. *J. Histo. Cyto.* 50:839-850.
- Richeri A, Bianchimano P, Marmol N, Viettro L, Cowen T, Brauer M (2005) Plasticity in rat uterine sympathetic nerves: the role of TrkA and p75 nerve growth factor receptors. *J. Anat.* 207:125-134.
- Richeri A, Bianchimano P, Crutcher K, Brauer M (2010) Reduced sympathetic neurite outgrowth on uterine tissue sections from rats treated with estrogen. *Cell Tissue Res.* 340:287–301 (adjunto en Apéndice).
- Richeri A, Chalar C, Martínez G, Grief G, Bianchimano P, Brauer M (2011) Estrogen up-regulation of semaphorin 3F correlates with sympathetic denervation of the rat uterus. *Auton. Neurosci.* 164: 43-50 (adjunto en Apéndice).
- Roche J, Boldog F, Robinson M, Robinson L, Varella-Garcia M, Swanton M, Waggoner B, Fishel R, Franklin W, Gemmill R, Drabkin H (1996) Distinct 3p21.3 deletions in lung cancer and identification of a new human semaphorin. *Oncogene* 12:1289-1297.
- Rodriguez-Tebar A, Dechandt G, Barde Y (1990) Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 4:487-492.
- Rodriguez-Tebar A, Dechandt G, Götz R, Barde Y (1992) Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J.* 11:917-922.
- Roth L, Koncina E, Satkauskas S, Cremel G, Aunis D, Bagnard D (2009) The many faces of semaphorins: from development to pathology *Cell. Mol. Life Sci.* 66:649-666.
- Rohm B, Ottemeyer A, Lohrum M, Puschel A (2000) Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mech. Dev.* 93:95-104.
- Rydhström H, Walles B, Owman C. (1989) Myometrial norepinephrine in human pregnancy. Elevated levels in various disorders leading to cesarean section. *J. Reprod. Med.* 34:901-904.
- Sahay A, Molliver M, Ginty D, Kolodkin A (2003) Semaphorin 3F Is Critical for Development of Limbic System Circuitry and Is Required in Neurons for Selective CNS Axon Guidance Events. *J. Neurosci.* 23:6671-6680.
- Semaphorin nomenclature Committee (1999) Unified nomenclature for the semaphorin/collapsins. *Cell* 97:551-552.
- Schwartz G, Kostek C, Ahmad N, Dibble C, Pays L, Puschel A (2000) Semaphorin 3A is required for guidance of olfactory axons in mice. *J. Neurosci.* 20:7691-7697.
- Schweigreiter R (2006) The dual nature of neurotrophins. *BioEssays* 28:583-594.
- Shelton D, Reichardt L (1984) Expression of the β -nerve growth factor gene correlates with the density of sympathetic innervation in effector organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7951-7955.
- Shepherd I, Luo Y, Lefcort F, Reichardt L, Raper J (1997) A sensory axon repellent secreted from ventral spinal cord explants is neutralized by antibodies raised against collapsin-1. *Development* 124:1377-1385.
- Shim E-J, Chun E, Kang H-R, Cho S-H, Min K-U; Park H (2013) Expression of Semaphorin 3A and Neuropilin 1 in Asthma. *Korean Med. Sci.* 28:1435-1442.
- Sjöberg NO (1968) Increase in transmitter content of adrenergic nerves in the reproductive tract of female rabbits after oestrogen treatment. *Acta Endocrinol (Copenh).* 57:405-413.
- Soker S, Takashima S, Miao H, Neufeld G, Klagsbrun M (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92:735-745.
- Soker S, Miao H, Nomi M, Takashima S, Klagsbrun M (2002) VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J Cell Biochem.* 85:357-368.

- Sohrabji F, Miranda R, Toran-Allerand C (1994) Estrogen differentially regulates estrogen and nerve growth factor receptors mRNAs in adult sensory neurons. *J. Neurosci.* 14:459-471.
- Song M, Posse de Chaves E (2003) Inhibition of rat sympathetic neuron apoptosis by ceramide. Role of p75NTR in ceramide generation. *Neuropharmacol.* 45:1130-1150.
- Sporrong B, Alm P, Owman C, Sjöberg N, Thorbert G (1981) Pregnancy is associated with extensive adrenergic nerve degeneration in the uterus. An electronmicroscopic study in the guinea pig. *Neurosci.* 6:1119-1126.
- Stein K, Ascher-Walsh C (2009) A Comprehensive Approach to the Treatment of Uterine Leiomyomata. *Mt Sinai J Med* 76:546-556.
- Steinbach K, Volkmer H, Schlosshauer B (2002) Semaphorin 3E/collapsin-5 inhibits growing retinal axons. *Exp. Cell. Res.* 279:52-61.
- Steindler D, Cooper N (1986) Wheat germ agglutinin binding sites in the adult mouse cerebellum: light and electron microscopic studies. *J. Comp. Neurol.* 249:170-185.
- Stjernquist M, Alm P, Ekman R, Owman C, Sjöberg N, Sundler F (1985) Levels of neural vasoactive intestinal polypeptide in rat uterus are markedly changed in association with pregnancy as shown by immunocytochemistry and radioimmunoassay. *Biol. Reprod.* 33:157-163.
- Straub R, Besedovsky H (2003) Integrated evolutionary, immunological, and neuroendocrine framework for the pathogenesis of chronic disabling inflammatory diseases. *FASEB J.* 17:2176-2183.
- Suto F, Ito K, Uemura M, Shimizu M, Shinkawa Y, Sanbo M, Shinoda T, Tsuboi M, Takashima S, Yagi T, Fujisawa H. (2005) Plexin-a4 mediates axon-repulsive activities of both secreted and transmembrane semaphorins and plays roles in nerve fiber guidance. *J. Neurosci.* 25:3628-3637.
- Swiercz J, Kuner R, Behrens J, Offermanns S (2002) Plexin-B1 directly interacts with PDZ-RhoGEF/LARG to regulate RhoA and growth cone morphology. *Neuron* 35:51-63.
- Takagi S, Tsuji T, Amagai T, Takamatsu T, Fujisawa H (1987) Specific cell surface labels in the visual centers of *Xenopus laevis* tadpole identified using monoclonal antibodies. *Dev. Biol.* 122:90-100.
- Takagi S, Hirata T, Agata K, Mochii M, Eguchi G, Fujisawa H (1991) The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors. *Neuron* 7:295-307.
- Takagi S, Kasuya Y, Shimizu M, Matsuura T, Tsuboi M, Kawakami A, Fujisawa H (1995) Expression of a cell adhesion molecule, neuropilin, in the developing chick nervous system. *Dev Biol.* 170:207-22.
- Takahashi T, Nakamura F, Jin Z, Kalb RG, Strittmatter SM (1998) Semaphorins A and E act as antagonists of neuropilin-1 and agonists of neuropilin-2 receptors. *Nat. Neurosci.* 1:487-493.
- Takahashi T, Fournier A, Nakamura F, Wang LH, Murakami Y, Kalb R, Fujisawa H, Strittmatter S (1999) Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 99:59-69.
- Takeuchi H, Inokuchi K, Aoki M, Suto F, Tsuboi A, Matsuda I, Suzuki M, Aiba A, Serizawa S, Yoshihara Y, Fujisawa H, Sakano H (2010) Sequential Arrival and Graded Secretion of Sema3F by Olfactory Neuron Axons Specify Map Topography at the Bulb. *Cell* 141:1056-1067.
- Taleghany N, Sarajari S, DonCarlos L, Gollapudi L, Oblinger M (1999) Differential expression of estrogen receptor alpha and beta in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci. Res.* 57:603-615.
- Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, He Z, Ming G, Song H, Chedotal A, Winberg M, Goodman C, Poo M, Tessier-Lavigne M, Comoglio P (1999) Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99:71-80.
- Tamagnone L, Comoglio P (2000) Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond. *Trends Cell Biol.* 10:377-383.
- Tanelian D, Barry M, Johnston S, Le T, Smith G (1997) Semaphorin III can repulse and inhibit adult sensory afferents in vivo. *Nat. Med.* 3:1398-1401.
- Tang B (2003) Inhibitors of neuronal regeneration: mediators and signaling mechanisms. *Neurochem. Int.* 42:

- Tang X, Tanelian D, Smith G (2004) Semaphorin3A inhibits nerve growth factor-induced sprouting of nociceptive afferents in adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 24:819-827.
- Taniguchi M, Yuasa S, Fujisawa H, Naruse I, Saga S, Mishina M, Yagi T (1997) Disruption of semaphorin III/D gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection. *Neuron* 19: 519-530.
- Taniguchi M, Nagao H, Takahashi Y, Yamaguchi M, Mitsui S, Yagi T, Mori K, Shimizu T (2003) Distorted odor maps in the olfactory bulb of semaphorin 3A-deficient mice. *J. Neurosci.* 23:1390-1397.
- Taniguchi M, Masuda T, Fukaya M, Kataoka H, Mishina M, Yaginuma H, Watanabe M, Shimizu T (2005) Identification and characterization of a novel member of murine semaphorin family. *Genes Cells* 10:785-792.
- Tessier-Lavigne M, Goodman C (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274:1123.
- Thorbert G, Alm P, Owman C, Sjöberg N (1977) Regional distribution of autonomic nerves in guinea pig uterus. *Am. J. Physiol.* 233:C25-34.
- Thorbert G (1978) Regional changes in structure and functions of adrenergic nerves in the guinea pig uterus during pregnancy. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* (suppl) 79:5-32.
- Thorbert G, Alm P, Björklund A, Owman C, Sjöberg N (1979) Adrenergic innervation of the human uterus. Disappearance of the transmitter and transmitter-forming enzymes during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 135:223-226.
- Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser I (2006) High density of small nerve fibres in the functional layer of the endometrium in women with endometriosis. *Hum. Reprod.* 21:782-787.
- Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser I (2007) Different types of small nerve fibers in eutopic endometrium and myometrium in women with endometriosis. *Fertil. Steril.* 88:795-803.
- Tran T, Kolodkin A, Bharadwaj R (2007) Semaphorin regulation of cellular morphology. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 23:263-292.
- Traurig H, Papka R (1993) Autonomic efferent and visceral sensory innervation of the female reproductive system: special reference to the functional roles of nerves in reproductive organs. En: *Nervous Control of the Urogenital System*. (Ed. Maggi C.A.), pág. 103-141. Harwood Academic Publishers, Switzerland.
- Van Orden D, Goodale D, Baker H, Farley D, Bhatnagar R (1980) Uterine catecholamines and prostaglandins during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 106:1650-1654.
- Vercellini P, Somigliana E, Vigano P, Abbiati A, Barbar G, Crosignani P (2009) Endometriosis: current therapies and new pharmacological developments. *Drugs* 69:649-675.
- Vo T, Carulli D, Ehlert E, Kwok J, Dick G, Mecollari V, Moloney E, Neufeld G, de Winter F, Fawcett J, Verhaagen J (2013) The chemorepulsive axon guidance protein semaphorin3A is a constituent of perineuronal nets in the adult rodent brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 56:186-200.
- Waimey K, Huang P, Chen M, Cheng H (2008) Plexin-A3 and plexin-A4 restrict the migration of sympathetic neurons but not their neural crest precursors. *Dev. Biol.* 315:448-458.
- Walter J, Kern-Veits R, Huf J, Stolze B, Bonhoeffer F (1987) Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axons in vitro. *Development* 101:685-696.
- Wanigasekara Y, Keast J (2006) Nerve growth factor, glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin prevent semaphorin 3A-mediated growth cone collapse in adult sensory neurons. *Neuroscience* 142:369-379.
- Winberg M, Tamagnone L, Bai J, Comoglio P, Montell D, Goodman C (2001) The transmembrane protein Off-track associates with Plexins and functions downstream of Semaphorin signalling during axon guidance. *Neuron* 32:53-62.
- Xiang R, Hensel C, Garcia D, Carlson H, Kok K, Daly M, Kerbacher K, van den Berg A, Veldhuis P, Buys C, Naylor S (1996) Isolation of the human semaphorin III/F gene (SEMA3F) at chromosome 3p21, a region

deleted in lung cancer. *Genomics* 32:39-48.

Yaron A, Huang P, Cheng H, Tessier-Lavigne M (2005) Differential requirement for Plexin-A3 and -A4 in mediating responses of sensory and sympathetic neurons to distinct class 3 semaphorins. *Neuron* 45:513-523.

Yazdani U, Terman J (2006) The semaphorins. *Genome Biology* 7:211.1-14.

Zhou L, White F, Lentz S, Wright D, Fisher D, Snider W (1997) Cloning and expression of a novel murine semaphorin with structural similarity to insect semaphorin I. *Mol. Cell. Neurosci.* 9:26-41.

Zoubina E, Fan Q, Smith P (1998) Variation in uterine innervation during the estrous cycle. *J Comp. Neurol.* 397: 561-571.

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

Zoubina E, Smith P (2001) Sympathetic hyperinnervation of the uterus in the estrogen receptor alpha knock-out mouse. *Neuroscience* 103:237-244.

Zoubina E, Mize A, Alper R, Smith P (2001) Acute and chronic estrogen supplementation decreases uterine sympathetic innervation in ovariectomised adult virgin rats. *Histol. Histopathol.* 16:989-996.

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

Anexo: Trabajos científicos



Highlights in basic autonomic neuroscience: Semaphorins in the remodeling of autonomic innervation

Prepared by: M. Mónica Brauer*, Analía Richeri

Laboratory of Cell Biology, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avenida Italia 3318, Montevideo 11600, Uruguay

ARTICLE INFO

Keywords:

Sympathetic
Parasympathetic
Inflammation
Estrogen
Neurotrophins

ABSTRACT

Chemorepellent signals of the semaphorin family are known to play a crucial role in the development of the nervous system. Some semaphorins continue being expressed in the adult life when they regulate plasticity and regeneration. Increasing evidence indicates that semaphorins are implicated in the development of the autonomic nervous system as well as in the regulation of different forms of plasticity observed in the adulthood. Here we present selected examples illustrating the involvement of semaphorins in the regulation of autonomic plasticity in physiological and pathological conditions.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Semaphorins are a family of proteins that were discovered in the early 1990s and originally identified as cues that guide axons through repulsion during the development of the nervous system. It is now clear that semaphorins are repeatedly used throughout development and reused in postnatal and adult life, controlling plasticity and regeneration (Pasterkamp, 2012). To date, more than twenty semaphorins of secreted or membrane forms have been identified and categorized into eight classes (Semaphorin Nomenclature Committee, 1999). Here we present advances in semaphorin research focusing on autonomic nervous system and highlight semaphorin implications in both physiological and pathological aspects of neuronal plasticity.

Ieda, M., Kanazawa, H., Kimura, K., Hattori, F., Ieda, Y., Taniguchi, M., Lee, J.-K., Matsumura, K., Tomita, Y., Miyoshi, S., Shimoda, K., Makino, S., Sano, M., Kodama, I., Ogawa, S., Fukuda, K. (2007). *Sema3a* maintains normal heart rhythm through sympathetic innervation patterning. *Nature Med.* 13, 604–612.

Article summary

Cardiac tissues are extensively innervated by sympathetic nerves. In the ventricle, sympathetic nerves distribute predominantly in the subepicardium and this epicardial-to-endocardial transmural innervation gradient is crucial for effective cardiac performance. In this study, the authors showed that during development, semaphorin 3A (*Sema3a*) is produced by cardiomyocytes and demonstrated that this chemorepellent signal contributes to the establishment of the organotypic sympathetic innervation. *Sema3a* homozygous null mice

(*Sema3a*^{-/-}) showed a marked reduction in the subpericardial-to-subendocardial ratio of sympathetic innervation. Moreover, *Sema3a*^{-/-} mice showed stellate ganglia malformation, which led to sinus bradycardia due to sympathetic dysfunction. Cardiac-specific overexpression of *Sema3a* in transgenic mice (*SemaTG*) elicited reductions in sympathetic innervation and an attenuation in the epicardial-to-endocardial sympathetic innervation density. *SemaTG* mice showed sudden death and increased susceptibility to ventricular tachycardia due to catecholamine supersensitivity and prolongation of action potential duration.

Commentary

The organotypic pattern of distribution and relative density of sympathetic nerves in the heart are critical for normal cardiac function. There is evidence that cardiac innervation is altered in pathological hearts, such as following myocardial infarction. In spite of its clinical relevance, factors determining cardiac innervation are not fully understood. Neurotrophic factors from the neurotrophin and glial cell line-derived factor families are known to be critical chemoattractants for cardiac sympathetic nerves (Kimura et al., 2012). In particular, heart levels of nerve growth factor (NGF) correlate with the density of sympathetic innervation and NGF upregulation in the infarcted myocardium elicits sympathetic sprouting and heterogeneous innervation (Ieda and Fukuda, 2009). The participation of chemorepellent molecules in the development and maintenance of normal cardiac innervation was not investigated until recently. *Sema3a*, the prototypic member of the class 3 secreted semaphorins, has been shown to be a potent chemorepellent for sympathetic axons. In this work, Ieda and colleagues demonstrated that appropriate expression of *Sema3a* in cardiac tissue is needed for the patterning of sympathetic nerves and is critical for heart rate control. Their work also showed a negative correlation between the pattern and kinetics of *Sema3a* expression and the distribution and density of sympathetic innervation in the developing heart, indicating that *Sema3a* negatively

* Corresponding author. Tel.: +598 24871616x116.

E-mail address: brauer2009@gmail.com (M.M. Brauer).

regulates cardiac innervation. In this context, current evidence indicates that the balance between NGF and Sema3a synthesized by the cardiac tissue determines heart sympathetic innervation. Consistently, alterations in Sema3a expression disrupt cardiac innervation patterning and lead to sudden cardiac death and lethal arrhythmias. In line with this concept, a recent study (Wen et al., 2011) presented evidence indicating that Sema3a attenuates electrical remodeling at the infarct border zones in a rat model of myocardial infarction. Similarly, it has been suggested that increased expression of Sema3a may partially account for the sympathetic denervation observed in congestive heart failure (Sun et al., 2011). Taken together, these results indicate that Sema3a plays a crucial role in the development of cardiac sympathetic innervation and would be involved in heart diseases, thus making this molecular signal a potential target for pharmacological interventions.

Straub, R.H., Lowin, T., Klatt, S., Wolff, C., Rauch, L. (2011). Increased density of sympathetic nerve fibers in metabolically activated fat tissue surrounding human synovium and mouse lymph nodes in arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 63, 3234–3242.

Article summary

In previous studies, Straub's group demonstrated that members of the Class 3 secreted semaphorins are involved in the loss of sympathetic nerve fibers in inflammatory lesions. In this study, they looked for changes in the density of sympathetic nerve fibers in the fat tissue surrounding inflamed regions. This article demonstrated increased density of sympathetic nerve fibers in fat tissue adjacent to human synovium of arthritic patients and in adipose depots around the lymph nodes of mice with experimental arthritis. The authors interpreted that sympathetically induced local activation of lipolysis may provide the energy-rich fuels (fatty acids) that are necessary to nourish the neighboring inflammatory process. In addition, they speculated that semaphorin-induced repulsion of sympathetic nerve fibers from inflamed regions might contribute to the increased occurrence of these nerves in the adjacent fat tissue.

Commentary

The loss of sympathetic nerve fibers is a general principle in inflammation. It has been suggested that loss of sympathetic nerve fibers from inflamed lesions is an evolutionarily conserved mechanism allowing an adequate immune/inflammatory response which would be prevented in the presence of these nerves (Straub and Besedovsky, 2003). Although the loss of peripheral nerve fibers in inflamed areas has been described for many years, the role of nerve repellent factors in inflammatory diseases has recently begun to be investigated. Straub and colleagues recently demonstrated the concept of intentional repulsion of sympathetic nerve fibers by semaphorins. In particular, semaphorin 3F (Sema3F) was shown to be a strong repellent for sympathetic nerve fibers leading to rapid repulsion within hours. Moreover, there is evidence indicating that Sema3F is upregulated in the synovial fibroblasts and macrophages present in inflamed tissue of arthritic patients (Fassold et al., 2009). The question appears as to what is the stimulus for the increase of nerve fibers in the fat tissue surrounding inflamed lesions reported in this study. Although there is no direct proof that upregulation of repellent factors in inflamed tissue is the cause of an increased number of nerve fibers in the adjacent fat tissue, the authors interpreted this coincidence as an adaptive program induced by semaphorins expressed in inflamed tissue. Considering that the sympathetic nervous system should serve the activated immune system, this semaphorin-induced compartmentalization of nerve fibers (present in the fat tissue but not in inflamed tissue) could allow parallel

lipolysis and immune activation, solving the two contrasting functions of adrenergic neurotransmitters in favor of a proinflammatory milieu.

Richeri, A., Chalar, C., Martínez, G., Grief, G., Bianchimano, P., Brauer, M.M. (2011). Estrogen up-regulation of semaphorin 3F correlates with sympathetic denervation of the rat uterus. *Auton. Neurosci.: Basic Clinic* 164, 43–50.

Article summary

The sympathetic innervation of the uterus is remarkably dynamic and undergoes considerable remodeling in response to physiological and experimental changes in systemic levels of sex hormones. In particular, estrogen inhibits the growth and causes the degeneration of intrauterine sympathetic nerve fibers in the non-pregnant female. In this article, the authors evaluated whether semaphorin 3F (Sema3F), a potent sympathetic nerve repellent, was produced by the rat uterus and if its expression was modulated by estrogen. These studies showed that chronic exposure to estrogen of immature rats led to a 5-fold induction of Sema3F mRNA. In situ hybridization revealed that Sema3F transcripts were distributed in the myometrial connective tissue and selectively expressed by fibroblasts and infiltrating eosinophil leukocytes. Immunohistochemistry showed that some isolated axonal profiles present in the estrogenized uterus were immunoreactive for the Sema3F binding receptor, neuropilin-2.

Commentary

Regulation of estrogen-induced remodeling of uterine innervation involves changes in the ability of myometrium to support its sympathetic innervation. After failing in demonstrating reductions in neurotrophic support (Brauer, 2008), investigations were addressed to disclose the potential contribution of inhibitory signals for sympathetic nerves. Studies developed in the last decade have shown that, under the influence of estrogen, the myometrium produces a range of target-derived molecular signals with negative effects on sympathetic nerves, including brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin (Krizsan-Agbas et al., 2003, 2008). The study by Richeri and co-workers provided the first evidences indicating a positive correlation between the pattern and kinetics of sema3F expression and the estrogen-induced degeneration of myometrial sympathetic nerves. Although correlative in nature, these results suggest that Sema3F negatively regulates uterine innervation in response to estrogen. Similarly, an increased immunostaining for Sema3A has been demonstrated in the human myometrium during pregnancy (Marzoni et al., 2004). These results suggest that under certain hormonal conditions, the uterus may produce several semaphorins with potentially redundant negative effects for sympathetic nerves. Two main cell types appeared to be responsible for the sema3F expression observed in estrogen-treated animals: fibroblasts and eosinophil leukocytes. This is not surprising because in other models, semaphorins are produced by a wide range of cells, including fibroblasts and inflammatory cells. Finally, this article describes the presence of axon profiles positive for neuropilin 2, the binding receptor for Sema3F, thus giving additional support to the hypothesis that Sema3F is involved in the degeneration elicited by estrogen in uterine sympathetic nerves.

Naska, S., Lin, D.C., Miller, F.D., Kaplan, D.R. (2010). p75NTR is an obligate signaling receptor required for cues that cause sympathetic neuron growth collapse. *Mol. Cel. Neurosci.* 45, 108–120.

Article summary

Detection of a repellent factor, such as a semaphorin, causes localized collapse of the growth cone and directs the neurite away from the repellent. Growth cone collapse results from cytoskeletal rearrangements and detachment of adhesion sites. In this study, the authors assessed the requirement of p75 neurotrophin receptor (p75NTR) for the growth cone collapsing responses to *Sema3A* and *Sema3F* in sympathetic neurons. They showed that the ability of these semaphorins to collapse growth cones is suppressed in p75NTR^{-/-} sympathetic neurons. Ectopic expression of p75NTR restores the collapsing activity of these semaphorins in p75NTR^{-/-} neurons. Moreover, they showed that p75NTR must be bound to brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to participate in semaphorin 3-mediated collapse. Finally, it was shown that ligand-bound p75NTR participates in semaphorin-mediated collapse via the Rho signaling pathway, since inhibition of Rho signaling is sufficient to suppress the effects of semaphorin 3s in p75NTR^{+/+} but not in p75NTR^{-/-} neurons.

Commentary

The biological actions of secreted semaphorins of the Class 3 are mediated through receptor complexes composed by neuropilins and Plexin A (He and Tessier-Lavigne, 1997; Takahashi et al., 1999). However, there is evidence that some actions of semaphorins require interactions with neurotrophins and/or their receptors. In this study, evidence was presented that the pan-neurotrophin receptor p75NTR is necessary for *Sema3A* and *Sema3F* mediated growth cone collapse in sympathetic neurons. In addition, it was shown that p75NTR is also involved in the decreased sympathetic nerve growth elicited by these semaphorins, and evidence was presented that this growth-inhibition is not caused by axon degeneration. Sympathetic neurons express two surface receptors for neurotrophins, the tyrosine kinase TrkA and p75NTR. TrkA mediates the survival and growth-promoting effects of NGF, whereas these positive effects are inhibited by BDNF signaling through p75NTR (Kohn et al., 1999). In this context, the authors explored whether BDNF binding to p75NTR was necessary for semaphorin 3-mediated growth cone collapse in sympathetic neurons. These studies showed that function-blocking of BDNF inhibited *Sema3A*-mediated growth cone collapse, indicating that p75NTR must be ligand-bound to allow *Sema3A* action. Interestingly, it was shown that BDNF-bound p75NTR is not sufficient on its own to induce collapse of growth cones. Finally, data presented in this article suggest that for sympathetic neurons, p75NTR is involved in the Rho-ROCK pathway activation which is required for *Sema3A*- and *Sema3F*-elicited growth cone collapse. Considering that p75NTR also acts as an inhibitory co-receptor for other receptors, such as those of Nogo, Ephrin A and Ephrin B2, the authors conclude that in addition to its role as a co-receptor, p75NTR may provide an obligate parallel neurotrophin-activated inhibitory pathway that broadly sensitizes neurons to inhibitory cues.

Keast J.R., Nangle M.R. (2011). Semaphorin 3A inhibits growth of adult sympathetic and parasympathetic neurons via distinct cyclic nucleotide signaling pathways. *Br. J. Pharmacol.* 162, 1083-1095.

Article summary

This paper examined whether adult rat pelvic neurons are targets for *Sema3A*. In vitro studies showed that *Sema3A* caused growth cone collapse in both adult parasympathetic and sympathetic neurons expressing neuropilin-1. Pharmacological approaches allowed the authors to determine that in these two neuronal types, *Sema3A* induced

growth cone collapse by completely different mechanisms. In sympathetic neurons, *Sema3A*-induced growth cone collapse was mediated by the soluble guanylyl cyclase (sGC)-cGMP pathway, whereas in parasympathetic neurons adenylyl cyclase-cAMP signaling was required. To further investigate *Sema3A* signaling downstream of cyclic nucleotides, functions of the respective prototypical mediators of cAMP and cGMP were studied using inhibitors of protein kinase A (PKA) and protein kinase G (PKG). As predicted, PKA mediates *Sema3A* effects in parasympathetic neurons. In contrast, in sympathetic neurons, cyclic nucleotide-gated ion channel signaling mediated *Sema3A*-induced growth cone collapse.

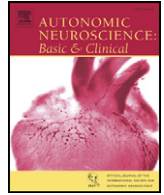
Commentary

Sensory and sympathetic neurons have been described as classical targets for semaphorin actions (Messersmith et al., 1995; Feiner et al., 1997; Chen et al., 1998). Remarkably, this study is the first to demonstrate that adult parasympathetic neurons are also targets for *Sema3A*. Another striking finding of this article is that in sympathetic and parasympathetic pelvic neurons, the response to *Sema3A* was mediated by distinct mechanisms. In both nitrenergic and non-nitrenergic parasympathetic neurons, *Sema3A* response was mediated by cAMP whereas cGMP did not cause collapse. In contrast, in sympathetic neurons, *Sema3A* response was mediated by cGMP. Interestingly, a *Sema3A*-independent collapse was observed after elevating cAMP levels, indicating that sympathetic neurons may be targeted by additional guidance factors that signal via this cyclic nucleotide. This paper also revealed that cGMP-dependent collapse in sympathetic neurons may require activation of cyclic nucleotide-gated ion channels (CNGCs), a novel regulatory mechanism of growth cone dynamics for adult neurons in response to *Sema3A*. Autonomic neurons innervating the pelvic viscera are particularly susceptible to damage during pelvic surgical procedures, and failure to regenerate or aberrant growth of sympathetic and parasympathetic nerves leads to organ dysfunction. The authors propose that *Sema3A* is an important guidance factor for adult autonomic neurons and that targeting of particular intracellular mechanisms could potentially be exploited to selectively promote appropriate regenerative growth after injury. In this way, this paper provides interesting evidence and supports the general idea that guidance factors, such as semaphorins, can be reused in adulthood for the remodeling of the diverse growth responses after injury (Pasterkamp, 2012).

References

- Brauer, M.M., 2008. Cellular and molecular mechanisms underlying plasticity in uterine sympathetic nerves. *Auton. Neurosci.* 140, 1–16.
- Chen, H., He, Z., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., 1998. Semaphorin-neuropilin interactions underlying sympathetic axon responses to class III semaphorins. *Neuron* 21, 1283–1290.
- Fassold, A., Falk, W., Anders, S., Hirsch, T., Mirsky, V.M., Straub, R.H., 2009. Soluble neuropilin-2, a nerve repellent receptor, is increased in rheumatoid arthritis synovium and aggravates sympathetic fiber repulsion and arthritis. *Arthritis Rheum.* 60, 2892–2901.
- Feiner, L., Koppel, A., Kobayashi, H., Raper, J.A., 1997. Secreted chick semaphorins bind recombinant neuropilins with similar affinities but bind different subsets of neurons in vitro. *Neuron* 19, 539–545.
- He, Z., Tessier-Lavigne, M., 1997. Neuropilin is a receptor for the axon chemorepellent semaphorin III. *Cell* 90, 739–751.
- Ieda, M., Fukuda, K., 2009. Cardiac innervation and sudden cardiac death. *Curr. Cardiol. Rev.* 5, 289–295.
- Kimura, K., Ieda, M., Fukuda, F., 2012. Development, maturation and transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves. *Circ. Res.* 110, 325–336.
- Kohn, J., Aloyz, R.S., Toma, J.G., Haak-Frendscho, M., Miller, F.D., 1999. Functionally antagonistic interactions between the TrkA and p75 neurotrophin receptors regulate sympathetic neuron growth and target innervation. *J. Neurosci.* 19, 5393–5408.
- Krizsan-Agbas, D., Pedchenko, T., Hassan, W., Smith, P.G., 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.
- Krizsan-Agbas, D., Pedchenko, T., Smith, P.G., 2008. Neurotrimin is an estrogen-regulated determinant of peripheral sympathetic innervation. *J. Neurosci. Res.* 86, 3086–3095.
- Marzioni, D., Tamagnone, L., Capparuccia, L., Marchini, C., Amici, A., Todros, T., Bischof, P., Neidhart, S., Grenningloh, G., Castellucci, M., 2004. Restricted innervation of

- uterus and placenta during pregnancy: evidence for a role of the repelling signal semaphorin 3A. *Dev. Dyn.* 231, 839–848.
- Messersmith, E.K., Leonardo, E.D., Shatz, C.J., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., Kolodkin, A.L., 1995. Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron* 14, 949–959.
- Pasterkamp, R.J., 2012. Getting neural circuits into shape with semaphorins. *Rev. Neurosci.* 13, 605–618.
- Semaphorin Nomenclature Committee, 1999. Unified nomenclature for the semaphorin/collapsins. *Cell* 97, 551–552.
- Straub, R.H., Besedovsky, H.O., 2003. Integrated evolutionary, immunological, and neuroendocrine framework for the pathogenesis of chronic disabling inflammatory diseases. *FASEB J.* 17, 2176–2183.
- Sun, S., Wang, X., Qu, X., Yang, L.L., Yu, Y., Song, Y., Wang, S., 2011. Increased expression of myocardial semaphorin 3A in isoproterenol-induced heart failure rats. *Chin. Med. J.* 124, 2173–2178.
- Takahashi, T., Fournier, A., Nakamura, F., Wang, L.H., Murakami, Y., Kalb, R.G., Fujisawa, H., Strittmatter, S.M., 1999. Plexin–neuropilin-1 complexes from functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 99, 59–69.
- Wen, H., Jiang, H., Li, L., Xie, P., Li, J., Lu, Z., He, B., 2011. Semaphorin 3A attenuates electrical remodeling at infarct border zones in rat after myocardial infarction. *Tohoku J. Exp. Med.* 225, 51–57.



Estrogen up-regulation of semaphorin 3F correlates with sympathetic denervation of the rat uterus

Analía Richeri ^a, Cora Chalar ^b, Gaby Martínez ^a, Gonzalo Greif ^c, Paola Bianchimano ^a, M. Mónica Brauer ^{a,*}

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

^b Sección Bioquímica, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay

^c Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 October 2010

Received in revised form 2 May 2011

Accepted 8 June 2011

Keywords:

Autonomic

Plasticity

Sex hormones

Axon degeneration

Axon pruning

ABSTRACT

Current evidence indicates that rises in systemic levels of estrogen create in the uterus an inhibitory environment for sympathetic nerves. However, molecular insights of these changes are far from complete. We evaluated if semaphorin 3F mRNA, a sympathetic nerve repellent, was produced by the rat uterus and if its expression was modulated by estrogen. We also analyzed whether uterine nerves express the semaphorin 3F binding receptor, neuropilin-2. Uterine levels of semaphorin 3F mRNA were measured using real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction in prepubertal rat controls and following chronic estrogen treatment. Localization of semaphorin 3F transcripts was determined by in situ hybridization and the expression of neuropilin-2 was assessed by immunohistochemistry. These studies showed that: (1) chronic estrogen treatment led to a 5-fold induction of semaphorin 3F mRNA in the immature uterus; (2) estrogen provoked a tissue-specific induction of semaphorin 3F which was particularly localized in the connective tissue that borders muscle bundles and surrounds intrauterine blood vessels; (3) two major cell-types were recognized in the areas where transcripts were concentrated, fibroblast-like cells and infiltrating eosinophil leukocytes; and (4) some delicate nerve terminal profiles present in the estrogenized uterus were immunoreactive for neuropilin-2. Temporal and spatial expression patterns of semaphorin 3F/neuropilin-2 are consistent with a possible role of this guidance cue in the remodeling of uterine sympathetic innervation by estrogen. Though correlative in its nature, these data support a model whereby semaphorin 3F, in combination with other inhibitory molecules, converts the estrogenized myometrium to an inhospitable environment for sympathetic nerves.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Several lines of evidence indicate that estrogen is the key hormone controlling physiological remodeling of uterine sympathetic nerves, being able to cause both growth inhibition and degeneration of the intrauterine sympathetic terminal plexus (Brauer, 2008; Latini et al., 2008). Much headway has been made in characterizing this model of natural plasticity, however, comparable fewer insights have been obtained to date into its molecular control (Bjorling et al., 2002; Chalar et al., 2003; Krizsan-Agbas et al., 2003; Lobos et al., 2005; Richeri et al., 2005; Krizsan-Agbas et al., 2008). A better understanding of the molecular factors controlling the responses of uterine nerves to estrogen has gained attention in the last decade, due to evidence that points toward the altered behavior and contribution of uterine sympathetic nerves to the symptoms of some estrogen-regulated gynecological diseases (McAllister et al., 2009; Odagiri et al., 2009).

It has been well established that the inhibitory effects of estrogen on this population of autonomic nerves are influenced by molecular signals produced by the target uterine tissue (Brauer et al., 2000, 2002; Krizsan-Agbas and Smith, 2002; Richeri et al., 2010). For example, evidence from co-culture experiments showed that myometrium explanted from ovariectomized rats elicits neurite outgrowth from sympathetic ganglia. In contrast, a diffusible inhibitory signal for sympathetic neurite outgrowth was seen to emanate from myometrium explanted from ovariectomized rats treated with estrogen (Krizsan-Agbas and Smith, 2002). Interestingly, estrogen is capable of converting the myometrium into an inhibitory field for sympathetic nerves even in extrauterine localizations, as demonstrated by in oculo transplantation studies (Brauer et al., 2000, 2002).

Recent evidence points to chemo-repellent factors of the semaphorin family as possible candidates in the regulation of the sympathetic denervation of the uterus by estrogen (Richeri et al., 2008) and pregnancy (Marzioni et al., 2004). Semaphorins comprise a large family of secreted, transmembrane and membrane-anchored proteins (Semaphorin Nomenclature Committee, 1999). These proteins were originally identified as cues that guide axons through repulsion during the development of the nervous system. Studies performed in the last decade

* Corresponding author at: Laboratory of Cell Biology, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avenida Italia 3318, Montevideo 11600, Uruguay. Fax: +598 2 487 5548.

E-mail address: brauer@iibce.edu.uy (M.M. Brauer).

indicate that semaphorins continue to be expressed in postnatal and adult life, controlling plasticity and regeneration (Pasterkamp and Verhaagen, 2001; Pasterkamp and Giger, 2009).

In particular, semaphorin 3F (Sema3F) a member of the vertebrate class-3 secreted semaphorins has been shown to be repellent for sympathetic nerves (Chen et al., 1998, 2000; Fassold et al., 2009; Ieda and Fukuda, 2009; Fassold and Straub, 2010). Nerve repulsion by Sema3F is mediated by neuropilin-2 (NRP2) and plexin receptors present on the surface of sympathetic axon terminals. Moreover, in vivo and in vitro studies have shown the absolute requirement of NRP2 in mediating the axonal responses to Sema3F (Chen et al., 1997, 1998; Giger et al., 1998; Chen et al., 2000; Yaron et al., 2005; Bannerman et al., 2008; Waimey et al., 2008; Fassold et al., 2009).

In this context, we investigated if Sema3F is expressed in the uterus and if its expression is modulated by estrogen. To this end, we conducted gene expression analyses of uterine levels of messenger RNA (mRNA) and assessed the uterine distribution of Sema3F transcripts by in situ hybridization. Preliminary evidence of the expression of NRP2 in uterine nerves was obtained using immunohistochemistry. These studies were conducted in intact prepubertal rats because immature animals respond to estrogen like mature ovariectomized females and are a widely accepted model to study estrogen actions in the uterus (Rhen et al., 2003). Moreover, chronic exposure of prepubertal animals to estrogen provokes a dramatic reduction in the sympathetic innervation of the uterus, similar to that seen at the end of pregnancy (Brauer et al., 1995).

2. Materials and methods

2.1. Animals and estrogen treatment

Female Wistar-derived albino rats from the breeding colony held at the Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE, Montevideo, Uruguay) were used for this study. Animals were sexed at birth, weaned at 3 weeks, and maintained under controlled conditions of temperature (21–22 °C) and illumination (12 h light/dark cycles) with water and food provided ad libitum. Animals were injected subcutaneously with four doses of 10 µg of β-estradiol 17-cypionate, (Laboratorios König, Argentina), or vehicle (peanut oil, Sigma, USA) on days 10, 15, 20 and 25 of postnatal development and killed at 28 days of age by an overdose of sodium pentobarbital. High doses of estrogen were employed to block ovulation and ovarian production of progesterone (Brauer et al., 2002). All procedures were conducted in accordance with the Statement of Compliance with Standards for Human Care and Use of Laboratory Animals signed by the IIBCE with the NIH (USA) (Statement of Compliance A5495-01).

2.2. RT-PCR

Total RNA was extracted from homogenized uterine horns of prepubertal controls and chronic estrogen-treated rats using Trizol reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. RNA quality was assessed by visualization under ultraviolet light following ethidium bromide agarose gel electrophoresis (ratio 28S/18S RNA species ≥ 2) and spectrophotometric UV absorbance at 260/280 nm. Isolation of cDNAs encoding rat Sema3F and the housekeeping gene ribosomal protein L7 (Rpl7) were carried out as described previously (Chalar et al., 2003). One microgram of each RNA sample was treated with DNase (Promega, USA) to remove possible contaminating genomic DNA and reverse transcribed with a SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) using an oligo-dT primer following manufacturer recommendations. A 1/10 dilution of cDNA obtained was subsequently used as a template for PCR reactions. PCR primers for amplification of rat Sema3F and Rpl7 were designed corresponding to the coding region of these genes: Sema3F primers, sense 5'-ATTTATGGGCACTGATGCA-3' and antisense 5'-AAACACGCTCTGGAGT TCA-3' (Lillesaar and Fried, 2004); Rpl7 primers, sense 5'-TCAATGGAGTGAGCCCAAAG-3' and antisense 5'-

CAAGAGATCGAGCAACCAAG-3' (Deroo et al., 2004). These primers were used in the PCR reactions following standard techniques. PCR products of the expected size were isolated (Concert Gel Extraction System, Life Technologies, USA), cloned into pGEM-T-Easy (Promega) and confirmation of sequence was done with BigDye Terminator chemistry (Applied Biosystems, USA) using manufacturer protocol and resolved on an ABI Prism 377 DNA sequence. The recombinant plasmids obtained were named rRsema3f and rRrpl7.

2.3. Real time RT-PCR (qRT-PCR)

Quantitative real time PCR was performed in a Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Australia) by using a reaction mixture with SYBR Green as the fluorescent dye (Biotools, Spain). The PCR cycle parameters were as follows: 95 °C for 10 min (1 time); 95 °C for 40 s, 57 °C for 45 s, and 72 °C for 40 s (40 times); and 95 °C for 60 s (1 time). After completion, melting curve analyses and gel electrophoresis were performed to confirm the amplification specificity. PCR amplification was performed in triplicate and replicated in two independent experiments. Relative quantification was performed by using the Relative Expression Software Tool (REST 2005; Corbett Research Pty Ltd and Michael W. Pfaffl). For each cDNA sample a ratio between the relative amounts of Sema3F, our gene of interest (target gene) and Rpl7, the reference gene, was calculated to compensate for variations in quantity and quality of starting material, as well as for differences in reaction efficiencies. The fold change in the target gene relative to the Rpl7 endogenous reference gene was determined. Data were analyzed by using statistical randomization tests (REST 2005; Corbett Research Pty Ltd and Michael W. Pfaffl).

2.4. In situ hybridization of Sema3F mRNA

In situ hybridization was carried out on cryostat tissue sections (12 µm) from fresh unfixed uterine horns from control and estrogen-treated animals as previously described (Chalar et al., 2003). Sense and antisense digoxigenin-labeled riboprobes were generated from the rRsema3f using T7 and Sp6 polymerases (RNA Labelling Kit, Roche, Switzerland). Hybridization was carried out overnight at 50 °C with 50 µL of the hybridization solution containing 2 ng/µL of previously denatured (95 °C, 3 min) digoxigenin-labeled RNA probe. Sections were incubated overnight at 4 °C with 1:2000 alkaline phosphatase (AP)-conjugated anti-digoxigenin antibody (Boehringer Ingelheim, Germany) in blocking solution and later color reaction was developed by incubating with NBT (Nitro Blue Tetrazolium) and BCIP (5-Bromo-1-Chloro-3-Indolyl Phosphate). After color development, sections were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) and mounted with 70% glycerol. Images were captured under identical conditions using a CoolSNAP-Pro Monochrome Digital camera and submitted to identical contrast and brightness corrections using the Image Pro Plus software. After imaging, slides were un-mounted, washed in PBS, fixed for 10 min in 4% PFA and stained either with hematoxylin and eosin or hematoxylin/Sirius Red (Direct Red 80, Aldrich Chemical Company, USA), a specific stain for eosinophils (Bogomoletz, 1980).

To further characterize the cell types present in the uterine connective tissue (see Results), a transmission electron microscopic examination of this area was conducted. To this end, fragments of the uterine horns of chronic estrogen-treated rats were fixed by immersion in 2.5% buffered glutaraldehyde, post-fixed in 1% buffered osmium tetroxide, dehydrated and embedded in Durcupam ACM (Fluka, USA). Ultrathin sections of selected uterine areas were stained with 2% uranyl acetate and lead citrate and examined with a Jeol 100 CXII electron-microscope operated at 60 kV.

2.5. Immunohistochemistry for NRP2 and TH

Females were terminally anesthetized with sodium pentobarbital (Sigma, USA) and perfused transcardially with 25 mL of heparinized

saline solution (NaCl 0.9% + 50 IU/mL of Liqueurine, Roche, Uruguay). Unfixed fresh uterine horns from control and estrogen-treated animals were dissected, frozen, cryostat-sectioned (12 μ m) and processed for immunohistochemistry. Tissue sections were allowed to dry for 10 min, rinsed in PBS and incubated overnight at room temperature with anti-Neuropilin-2 (NRP2, 1:150, a generous gift of Dr. A. Bagri, Genentech Inc., USA) and anti-tyrosine hydroxylase (TH, 1:400; Affiniti Bioreagents, USA). Primary antibodies were revealed respectively, with goat anti-mouse IgG conjugated with FITC (1:250; Sigma-Aldrich, USA) and goat anti-rabbit IgG conjugated with Alexa-Fluor 568 (1:400; Molecular Probes, USA), and mounted in antifade mountant (Citifluor, UK). NRP2 immunolabeling specificity was checked by omitting primary antibody and incubating sections with normal mouse serum. Sections were examined with a Nikon E800 microscope. Images were captured by using a CoolSNAP-Pro Monochrome Digital camera with the Image Pro Express software (Media Cybernetics, USA).

To further characterize NRP2/TH immunoreactivity in the estrogenized rat uterus, a complementary group of females was euthanized 2 days following the first and second dose of estrogen treatment (12 and 17 days of age, respectively). We chose to study the initial stages of estrogen treatment based on previous data indicating that: (1) at 12 days of age, sympathetic nerves have already entered the uterus and established an organotypic pattern of innervation (Brauer et al., 1992); and (2) these immature fibers are sensitive to the growth-inhibitory and degenerative actions of estrogen (Brauer et al., 2002).

3. Results

3.1. Changes in uterine *sema3F* expression elicited by estrogen

RT-PCR assays demonstrated the presence of mRNA encoding *Sema3F* in the uterus of both control and estrogen-treated prepubertal rats (Fig. 1A). As suggested by comparison with the expression of the *L7* housekeeping gene, levels of *Sema3F* mRNA increased following estrogen treatment (Fig. 1A). This result was confirmed by quantitative real-time RT-PCR showing a 5-fold induction of *sema3F* in the uterus of estrogen-treated rats, as compared to calibrator samples from control animals (Fig. 1B).

3.2. Tissue distribution of *Sema3F* mRNA in the rat uterus

Estrogen-induced differences in semaphorin expression detected with RT-PCR were further analyzed by localizing *Sema3F* transcripts in the uterus. In situ hybridization showed that in controls, *Sema3F* mRNA was scarcely evident and predominantly confined to the outer myometrial compartment (Fig. 2A). Following estrogen treatment, an increased expression of *Sema3F* signal was seen in this uterine compartment and circumscribed to the hypertrophic connective tissue separating smooth muscle bundles (Fig. 2B, D, E) and surrounding intra-myometrial mayor blood vessels (Fig. 2G, H). No detectable *Sema3F* transcripts were seen in myometrial cells (Fig. 2B, D, asterisks), neither in the vascular smooth muscle or endothelium (Fig. 2G). Positive signal was absent from all regions following hybridization with the sense RNA probe (Fig. 2C).

Strong expression of *Sema3F* mRNA was evident in some cells present in the connective tissue space. Staining of the in situ hybridized uterine sections with hematoxylin and eosin, revealed that this strong *sema3F* signal was present in the cytoplasm of fibroblast-like cells and mesenteric (peritoneal) cells covering the uterine surface (Fig. 2D, E, F). Following Sirius Red staining, it was observed that strong *sema3F* signal was also present in the cytoplasm of eosinophil leukocytes, which were particularly abundant around blood vessels (Fig. 2G, H, I–I', J–J'). The identity of all these cell types was further confirmed by transmission electron microscopy (Fig. 3).

After estrogen treatment, a subtle but apparent induction was observed in the endometrial stroma (Fig. 4A, B) where labeled cells were

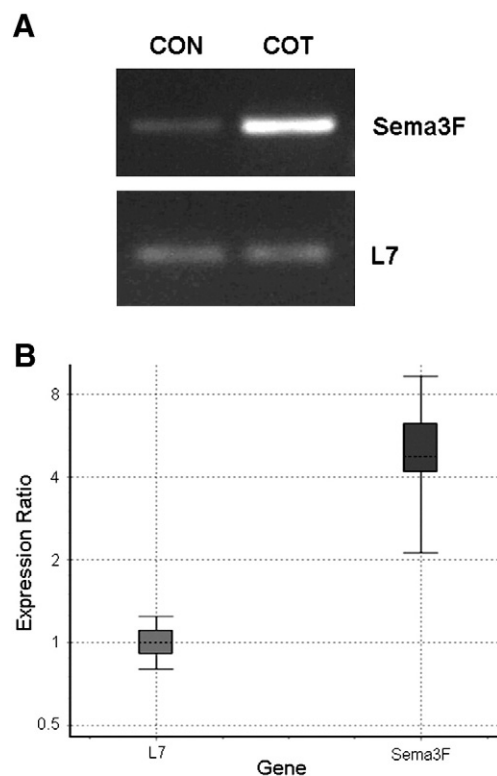


Fig. 1. Estrogen treatment modifies *sema3F* gene expression in the rat uterus. Prepubertal rats were chronically treated with vehicle (CON) or with estradiol (COT). (A) Ethidium bromide-stained gel showing products of RT-PCR reactions from uterine RNA of control and treated rats. Results were normalized to the ribosomal protein (*L7*) levels. As predicted, estrogenized uterus expressed higher endogenous levels of *sema3F* compared with control organs. (B) Quantification of *Sema3F* mRNA changes by real time RT-PCR. Uterine cDNA was prepared from prepubertal control ($n=6$) and estrogen treated ($n=5$) rats. Results are represented as a ratio between the relative amounts of each gene (*L7*, left box; *sema3F*, right box) in control and estrogen samples. *L7* from estrogen treated group was not different to control group (expression ratio = 1), whereas a significant 5-fold increase ($p=0.016$) of *sema3F* was observed following estrogen treatment.

recognized as eosinophil leukocytes (Fig. 4C, C'). No induction of *sema3F* was seen in the endometrial epithelium and glands (Fig. 4A, B).

3.3. Demonstration of NRP2- and TH-immunoreactive nerves in the rat uterus

To begin to understand the impact of altered *sema3F* levels, we looked for the presence of NRP2-immunoreactivity in the rat uterus. In prepubertal rat controls, neither neural nor non-neural structures were labeled by the NRP2 antibody. At this age several TH-immunoreactive (TH-I) sympathetic nerve fibers were seen around blood vessels and in the myometrium (Fig. 5A).

At the end of chronic estrogen treatment, some delicate NRP2-immunoreactive (NRP2-I) nerve profiles were recognized in association with the hypertrophic intrauterine blood vessels (Fig. 5B). This label was absent when the first antibody was omitted or substituted by non-immune mouse serum (data not shown). Simultaneous labeling with antibodies against NRP2 and TH demonstrated no TH-immunoreactivity in these NRP2-I nerve fibers, because at the end of chronic estrogen treatment, no TH-I intrauterine perivascular nerves were visible (Fig. 5C). In the parametrial tissue (mesometrium), both TH-I and NRP2-I nerve profiles were recognized, however, no evidence of co-localization was obtained (Fig. 5D).

NRP2-I fibers were also seen in the myometrial compartment of estrogen-treated animals. These nerves were mainly located at the connective tissue areas where *Sema3F* transcripts were demonstrated by ISH (i.e. surrounding smooth muscle bundles and closely apposed

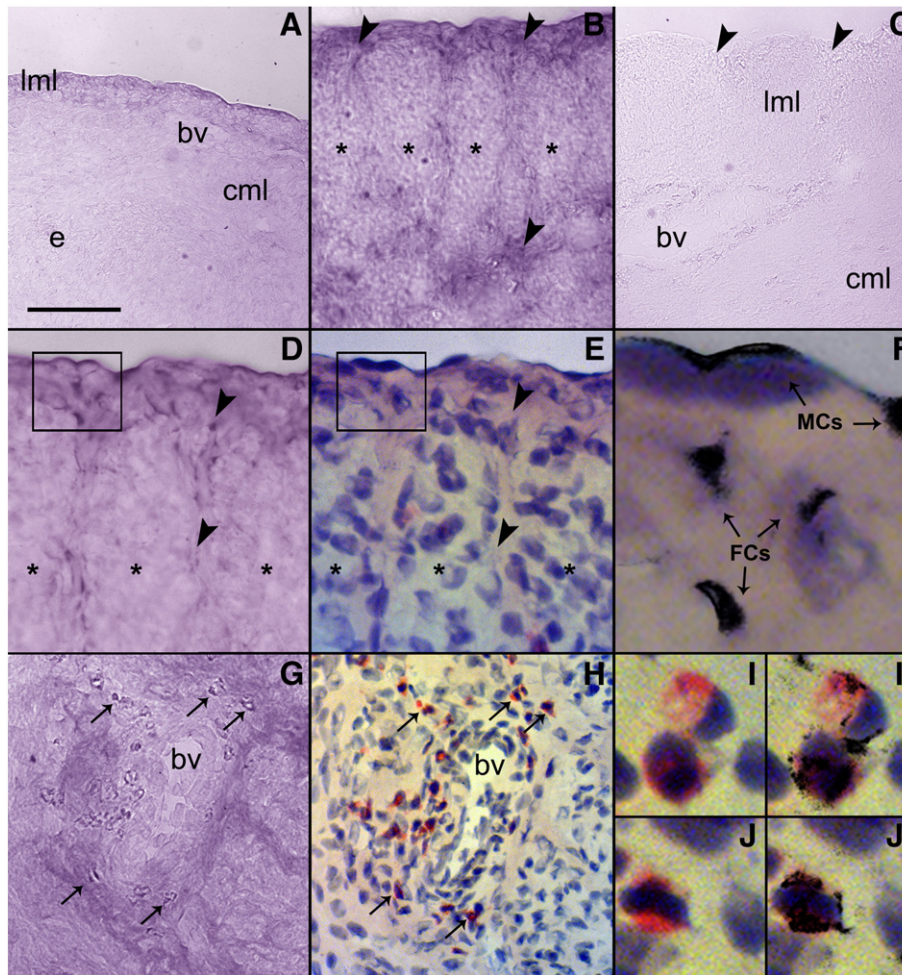


Fig. 2. Localization of *Sema3F* mRNA in rat myometrium. Cross sections of the uterine horn from prepubertal control (A) and estrogen-treated rats (B, D, G) hybridized with the *sema3F* antisense RNA probe (false color). In C, a representative uterine section from an estrogen-treated rat hybridized with *sema3F* sense probe served as negative control. Moderate *sema3F* signal was evident in the myometrial compartment of control uterus (A). B and D show an intense and highly localized *sema3F* hybridization signal (arrowheads) surrounding hypertrophic myometrial bundles (asterisks) in the estrogenized uterus. Histology showed that these areas correspond to connective tissue (E, arrowheads). In this tissue, a strong signal was seen in some cells (D, frame). Staining of hybridized sections with hematoxylin and eosin (E, frame; F) revealed that label localizes in the cytoplasm of fibroblast-like cells (FCs) and mesenteric cells (MCs). G illustrates *sema3F* signal associated to the connective tissue surrounding blood vessels and labeling eosinophil leukocytes (arrows) which were identified by Sirius Red staining (H, arrows; I, J). I, I' and J, J' higher magnifications showing the presence of *Sema3F* transcripts overlapping the cytoplasm of eosinophil leukocytes. bv, blood vessel; cml, circular myometrial layer; e, endometrium; lml, longitudinal myometrial layer. Calibration bar: 40 μ m (A, B, C, G, H); 20 μ m (D, E); 4 μ m (F); 10 μ m (I, J).

to infiltrating eosinophils; Fig. 5E, E' and F, F'). These fibers did not display TH immunoreactivity.

To further characterize NRP2 immunolabeling in the rat uterus, we conducted a timeline study with estrogen treatment. Following the administration of the first estrogen dose (12 days of age) several TH-I and NRP2-I nerve profiles were recognized within the different areas of the uterine horn (Fig. 5G). No signs of co-localization between these two neural markers were observed, although on occasion, TH-I and NRP2-I nerves appeared closely apposed (Fig. 5H). In the parametrial tissue (Fig. 5I), both TH-I and NRP2-I nerve profiles were also recognized but no co-localization was observed. After the second dose of estrogen (17 days of age), a few NRP2-I nerve profiles were recognized within the uterine horn. These NRP2-I fibers were mainly associated with blood vessels located between the mesometrial and antimesometrial border, perivascular locations that showed no TH-I innervation (data not shown).

4. Discussion

4.1. Estrogen affects the expression of *Sema3F* mRNA in the rat uterus

Our current data showed that estrogen significantly up-regulates the expression of *Sema3F* mRNA in the prepubertal rat uterus. This result

points to confirm a previous microarray study showing regulation of *sema3F* by estradiol and tamoxifen in the immature mouse uterus (Fong et al., 2007). Similarly, an increased immunostaining for *Sema3A* has been demonstrated in the human myometrium during middle and term pregnancy (Marzioni et al., 2004), thus suggesting that under certain hormonal conditions, the uterus may produce several members of the semaphorin family with potentially redundant negative effects for sympathetic nerves. Class-3 semaphorin pathway genes have been shown to be also regulated by estrogen in ovarian and breast cancer cell lines (Chang et al., 2006; Joseph et al., 2010). In line with this concept, bioinformatics analyses performed during the course of this investigation revealed the presence of several sequences similar to the estrogen response elements in the promoter region of the *sema3F* gene (Richeri and Chalar, unpublished observations). Further studies will be necessary to determine by which mechanism estrogen regulates *sema3F* expression.

Sema3F has been shown to be involved in the regulation of neural crest cells migration (Gammill et al., 2006) and can also cause repulsion and collapse of sympathetic axons (Chen et al., 1998; Giger et al., 1998; Chen et al., 2000; Miller et al., 2004; Damon, 2006; Fassold et al., 2009; Ieda and Fukuda, 2009; Fassold and Straub, 2010). Interestingly, *Sema3F* can antagonize nerve growth factor (NGF)-stimulated TrkA signaling in sympathetic neurons (Atwal et al., 2003). This cross-talk might be

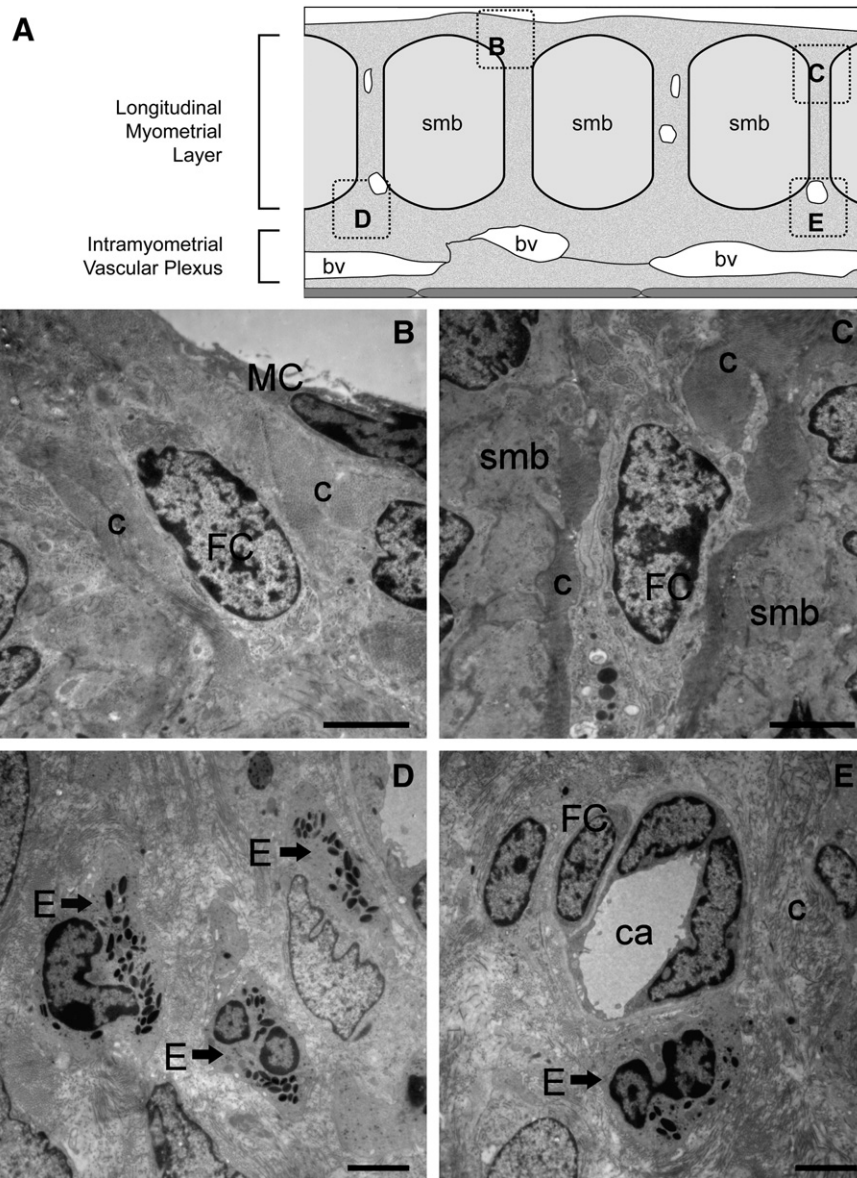


Fig. 3. Electron microscopic identification of the cell types present in the estrogen-induced hypertrophic uterine connective tissue. A shows a schematic diagram depicting the four uterine areas analyzed under the electron microscope (dotted frames). B shows a fibroblast-like cell (FC) in the connective tissue lying beneath a mesenteric cell (MC) of the uterine peritoneum and C illustrates a fibroblast-like cell in the connective space located in between muscle bundles (smb). In D and E, several eosinophil leukocytes (E), recognized by their typical granules, were seen respectively, in the connective tissue and surrounding capillaries (ca). bv, blood vessel, c, collagen. Calibration bars: 10 μ m (B, C); 5 μ m (D, E).

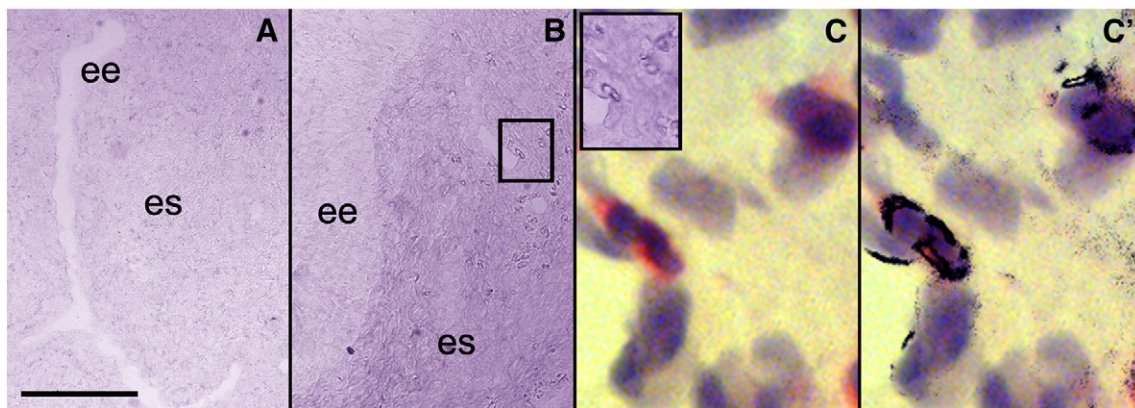


Fig. 4. Localization of *Sema3F* mRNA in rat endometrium. Cross sections of the uterine horn from prepubertal control (A) and estrogen-treated rats (B, C). *Sema3F* signal became apparent in the estrogenized endometrial stroma (es, B) although no signal was induced in the endometrial epithelium (ee). Strong signal was detected in endometrial infiltrating eosinophil leukocytes (B, C, frames). C and C' show higher magnifications, confirming the localization of *Sema3F* transcripts in the cytoplasm of Sirius Red-stained eosinophils. Calibration bar: 40 μ m (A, B); 10 μ m (C); 20 μ m (inset in C).

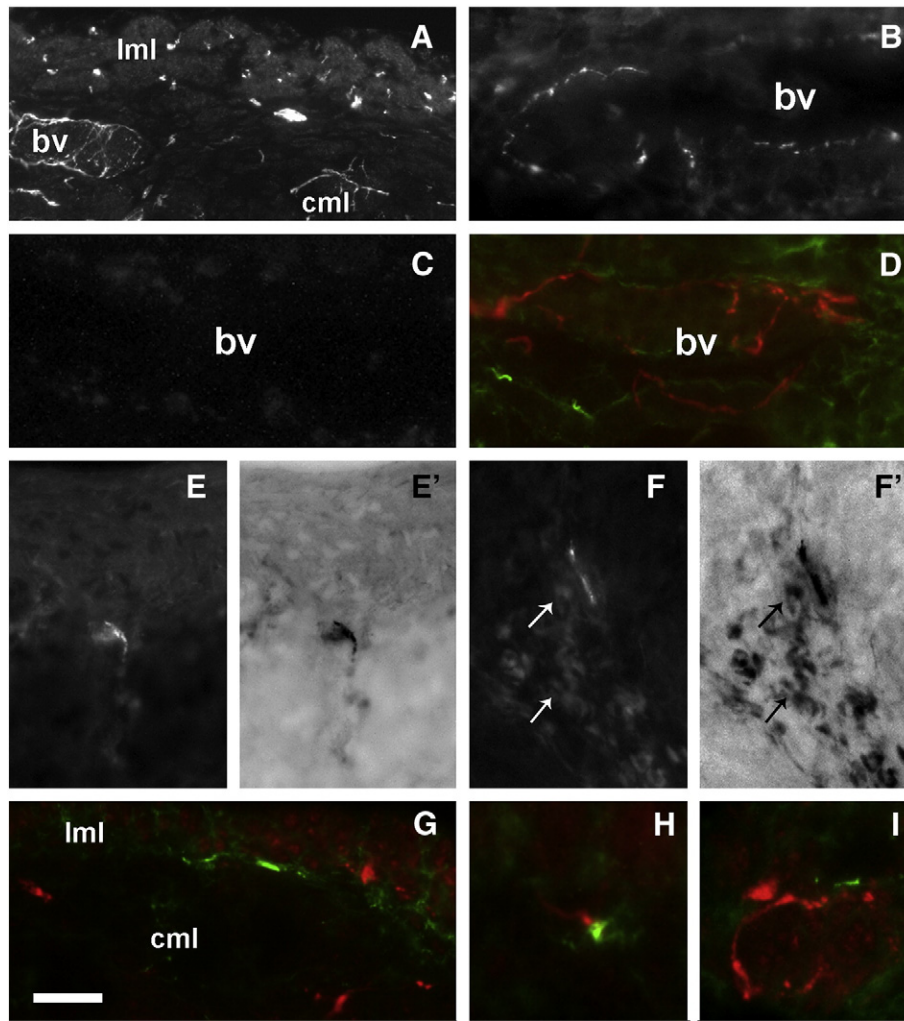


Fig. 5. Neuropilin-2 and TH-immunoreactive nerves in the rat uterus. Transverse tissue sections of rat uterine horns stained with anti-tyrosine hydroxylase (TH), (A, C); anti-neuropilin-2 (NRP2), (B, E, F) or a combination of both antibodies (D, G, H, I). A illustrates the sympathetic innervation of the prepubertal control rat uterus (TH staining). B and C show respectively, perivascular nerves stained with NRP2 and TH antibodies of an estrogen-treated rat. Note that these perivascular nerves are positive for NRP2 but they are no longer demonstrable by their TH immunoreactivity. D illustrates a double immunolabeled section showing the simultaneous but separate presence of TH-I (red) and NRP2-I (green) nerve profiles in the parametrial tissue (mesometrium) at the end of chronic estrogen treatment. In E and F, positive NRP2 fibers located at the myometrial compartment are shown. These fibers run in the connective tissue spaces surrounding smooth muscle bundles (E', inverted image) and closely apposed to infiltrating eosinophils which show non-specific autofluorescence (arrows), (F', inverted image). G–I illustrate transverse sections of the rat uterus 2 days after the first dose of estrogen (12 days of age). Simultaneous labeling with TH (red) and NRP2 (green) illustrates the presence of several intrauterine axon profiles showing no signs of co-localization (G). In H, nerves labeled with both neural markers appear closely apposed. I shows blood vessels in the parametrial tissue where TH and NRP2 nerve profiles were observed, with no signs of co-localization. bv, blood vessel; cml, circular myometrial layer; lml, longitudinal myometrial layer. Calibration bar: 35 μm (A); 25 μm (B, C); 20 μm (D, G, H, I); 30 μm (E, E', F, F').

important in our model because estrogen increases the synthesis of NGF (Bjorling et al., 2002; Chalar et al., 2003; Krizsan-Agbas et al., 2003). A recent study demonstrated that p75 neurotrophin receptor (p75NTR) is required for growth cone collapsing responses of sympathetic neurons to *Sema3A* and *Sema3F*; and p75NTR has to be bound to neurotrophins to participate in *Sema3*-mediated collapse (Naska et al., 2010). This might be relevant, because estrogen increases the expression of p75NTR in uterine-projecting sympathetic neurons (Richeri et al., 2005).

4.2. Estrogen provokes a tissue-specific induction of *sema3F*

Sema3F mRNA hybridization signal was seen in both control and estrogen-treated rat uteri; however, labeled areas were larger and more strongly labeled in uterine sections of estrogen-treated animals than in controls. In treated rats, *Sema3F* transcripts were localized in the hypertrophic connective tissue separating smooth muscle bundles and surrounding major blood vessels.

Two main cell types appeared to be responsible for the *sema3F* expression observed in estrogen treated animals: fibroblast-like cells and eosinophil leukocytes. It is known that semaphorins are produced by a wide range of cells, including fibroblasts and inflammatory cells. Harel and Strittmatter (2006) reviewed solid evidence for shifts in axon guidance factor distributions in the adult nervous system following injury; and a common feature was that re-expression of semaphorins occurs in fibroblasts and macrophages invading the scar. Up-regulation of *Sema3A* was observed in human corneal fibroblasts under the influence of the epidermal growth factor released by co-cultured human corneal epithelial cells (Ko et al., 2008). Similarly, fibroblasts and macrophages were shown to be involved in the up-regulation of *Sema3C* and *Sema3F* detected in the synovial tissue of patients affected by rheumatoid arthritis (Miller et al., 2004; Fassold et al., 2009).

In our current study, we observed a great population of infiltrating eosinophil leukocytes in the uterus in response to estrogen. These cells showed a positive *Sema3F* mRNA hybridization signal which was

stronger than the intrinsic alkaline phosphatase activity observed in control sections hybridized with the sense mRNA probe. Previous studies described the presence of eosinophils closely apposed to sympathetic nerves in the estrogenized uterus; and reductions in uterine eosinophilia by dexamethasone diminished the estrogen-induced loss of intrauterine sympathetic nerves (Bianchimano et al., 2007).

4.3. A population of nerves present in the estrogenized uterus is positive for *Neuropilin-2*

Our immunohistochemical studies showed the presence of NRP2-immunoreactive nerves in the uterus of estrogen-treated animals. These positive nerves were seen not only at the end of treatment but also at the beginning, after the first and second estrogen dose. Since no NRP2-I nerves were seen in the control uterus, it could be suggested that estrogen induces the expression of NRP2 in uterine nerves. This possibility appears to be supported by the existence of estrogen response elements in the promoter region of the *neuropilin-2* gene (Richeri and Chalar, bioinformatics search). Uterine-projecting sympathetic neurons express estrogen receptors (Zoubina and Smith, 2002) and alterations in levels of neurotrophin receptors have been demonstrated in these neurons in response to estrogen (Richeri et al., 2005).

Simultaneous labeling with antibodies against NRP2 and tyrosine hydroxylase demonstrated no TH-immunoreactivity in NRP2-I intrauterine nerve fibers. One possible explanation for this result is that NRP2-I nerves present in the estrogenized uterus are not sympathetic. This seems to be unlikely because NRP2 is considered a target antigen for sympathetic nerves (Chen et al., 1997, 1998; Fassold et al., 2009). Moreover, specific interactions with NRP2 allow Sema3F (and Sema3G) to affect selectively sympathetic but not dorsal root ganglion axons (Taniguchi et al., 2005; Fassold et al., 2009). A second explanation for the absence of TH-immunoreactivity in NRP2 positive nerves is that estrogen down-regulates tyrosine hydroxylase expression in uterine sympathetic nerves, thus making them not demonstrable by immunohistochemistry. Early studies revealed that in the guinea pig uterus, TH reached undetectable levels at term pregnancy. Remarkably, in unilateral pregnancies, such changes occur in both the fetus-containing uterine horn (which shows a complete degeneration of its terminal sympathetic network) as well as in the contralateral “empty” horn, where the noradrenergic nerve plexus remained structurally intact at term (Owman et al., 1980). Similarly, reductions in TH levels have been suggested to occur in degenerating NRP2-I sympathetic nerves of the synovial tissue affected by rheumatoid arthritis (Fassold et al., 2009). In this context, it is possible that during the estrogen-induced degeneration process NRP2 might be expressed in sympathetic nerve axons only at stages when TH is no longer present in nerve fibers.

5. Conclusions

Results reported in this study showed that expression of *sema3F*, a chemorepellent signal for sympathetic nerves, is up-regulated in the prepubertal rat uterus in response to estrogen, thus coinciding with the well-established sympathetic nerve degeneration induced by estrogen in the immature uterus. Sema3F mRNA hybridization signal was seen in the connective tissue surrounding myometrial bundles and intra-myometrial blood vessels, where it was shown to be associated with resident fibroblasts and infiltrating eosinophil leukocytes. Following exposure to estrogen, a population of presumably degenerating sympathetic nerves present in the uterus, became positive for NRP2, one of the components of the receptor complex mediating the neural responses to Sema3F. The precise spatial and temporal distribution of Sema3F mRNA and its neural receptor NRP2 are consistent with the idea that this guidance cue may be involved in the remodeling of uterine nerves by estrogen. However, further functional studies will be necessary to fully elucidate the role of Sema3F in the remodeling of uterine innervation by estrogen.

Acknowledgments

Special thanks are extended to the staff of Biochemistry Department (Faculty of Sciences-UdelaR) for their technical assistance and valuable suggestions. Help provided by Mrs. Camila Texidor with histology is greatly appreciated. Analia Richeri and Paola Bianchimano are postgraduate students of PEDECIBA, Uruguay. This work was partially supported by Fondo Clemente Estable (DICyT, Uruguay) and PEDECIBA (Uruguay).

References

- Atwal, J.K., Singh, K.K., Tessier-Lavigne, M., Millar, F.D., Kaplan, D.R., 2003. Semaphorin 3F antagonizes neurotrophin-induced phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase signaling: a mechanism for growth cone collapse. *J. Neurosci.* 23, 7602–7609.
- Bannerman, P., Ara, J., Hahn, A., Hong, L., McCauley, E., Friesen, K., Pleasure, D., 2008. Peripheral nerve regeneration is delayed in neuropilin 2-deficient mice. *J. Neurosci. Res.* 86, 3163–3169.
- Bianchimano, P., Frías, A.I., Richeri, A., Brauer, M.M., 2007. Effects of dexamethasone on estrogen- and pregnancy-induced plasticity in uterine sympathetic nerves. *Cell Tissue Res.* 300, 413–425.
- Bjorling, D.E., Beckman, M., Clayton, M.K., Wang, Z.Y., 2002. Modulation of nerve growth factor in peripheral organs by estrogen and progesterone. *Neuroscience* 110, 155–167.
- Bogomolez, W., 1980. Avantages de la coloration par le rouge Sirius de l'amyloïde et des éosinophiles. *Arch. Anat. Cytol. Pathol.* 28, 252–253.
- Brauer, M.M., 2008. Cellular and molecular mechanisms underlying plasticity in uterine sympathetic nerves. *Auton. Neurosci.* 140, 1–16.
- Brauer, M.M., Lincoln, J., Blundell, D., Corbacho, A., 1992. Postnatal development of noradrenaline-containing nerves of the rat uterus. *J. Auton. Nerv. Syst.* 39, 37–50.
- Brauer, M.M., Corbacho, A., Burnstock, G., 1995. Effects of chronic and acute oestrogen treatment on the development of noradrenaline-containing nerves of the rat uterus. *Int. J. Dev. Neurosci.* 13, 791–798.
- Brauer, M.M., Chávez, R., Llodrá, J., Richeri, A., Scorza, C., 2000. Effects of chronic oestrogen treatment are not selective for uterine noradrenaline-containing sympathetic nerves: a transplantation study. *J. Anat.* 196, 347–355.
- Brauer, M.M., Chávez-Genaro, R., Richeri, A., Viettro, L., Frías, A.I., Burnstock, G., Cowen, T., 2002. The oestrogenized rat myometrium inhibits organotypic sympathetic reinnervation. *Auton. Neurosci.* 101, 13–22.
- Chalar, C., Richeri, A., Viettro, L., Chávez-Genaro, R., Bianchimano, P., Marmol, N.M., Crutcher, K., Burnstock, G., Cowen, T., Brauer, M.M., 2003. Plasticity in developing rat uterine sensory nerves: the role of NGF and TrkA. *Cell Tissue Res.* 314, 191–205.
- Chang, E.C., Frasier, J., Komm, B., Katzenellenbogen, B.S., 2006. Impact of estrogen receptor beta on gene networks regulated by estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Endocrinology* 147, 4831–4842.
- Chen, H., Chedotal, A., He, Z., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., 1997. *Neuropilin-2*, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* 19, 547–559.
- Chen, H., He, Z., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., 1998. Semaphorin–neuropilin interactions underlying sympathetic axon responses to class III semaphorin. *Neuron* 21, 1283–1290.
- Chen, H., Bagri, A., Zupicich, J.A., Zou, Y., Stoekli, E., Pleasure, S.J., Lowenstein, D.H., Skarnes, W.C., Chédotal, A., Tessier-Lavigne, M., 2000. *Neuropilin-2* regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. *Neuron* 25, 43–56.
- Damon, D.H., 2006. Vascular endothelial-derived semaphorin 3 inhibits sympathetic axon growth. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H1220–H1225.
- Deroo, B.J., Hewitt, S.C., Peddada, S.D., Korach, K.S., 2004. Estradiol regulates the thioredoxin antioxidant system in the mouse uterus. *Endocrinology* 145, 5485–5492.
- Fassold, A., Straub, R.H., 2010. A new assay for nerve fiber repulsion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1193, 43–47.
- Fassold, A., Falk, W., Anders, S., Hirsch, T., Mirsky, V.M., Straub, R.H., 2009. Soluble neuropilin-2, a nerve repellent receptor, is increased in rheumatoid arthritis synovium and aggravates sympathetic fiber repulsion and arthritis. *Arthritis Rheum.* 60, 2892–2901.
- Fong, C.J., Burgoon, L.D., Williams, K.J., Forgacs, A.L., Zacharewski, T.R., 2007. Comparative temporal and dose-dependent morphological and transcriptional uterine effects elicited by tamoxifen and ethynylestradiol in immature, ovariectomized mice. *BMC Genomics* 8, 151–165.
- Gammill, L.S., Gonzalez, C., Gu, C., Bronner-Fraser, M., 2006. Guidance of trunk neural crest migration requires neuropilin 2/semaphorin 3F signaling. *Development* 133, 99–106.
- Giger, R.J., Urquhart, E.R., Gillespie, S.K., Levengood, D.V., Ginty, D.D., Kolodkin, A.L., 1998. *Neuropilin-2* is a receptor for semaphorin IV: insight into the structural basis of receptor function and specificity. *Neuron* 21, 1079–1092.
- Harel, N.Y., Strittmatter, S.M., 2006. Can regenerating axons recapitulate developmental guidance during recovery from spinal cord injury? *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 603–616.
- Ieda, M., Fukuda, K., 2009. New aspects for the treatment of cardiac diseases based on the diversity of functional controls on cardiac muscles: the regulatory mechanisms of cardiac innervation and their critical roles in cardiac performance. *J. Pharmacol. Sci.* 109, 348–353.
- Joseph, D., Ho, S.M., Syed, V., 2010. Hormonal regulation and distinct functions of semaphorin-3B and semaphorin-3F in ovarian cancer. *Mol. Cancer Ther.* 9, 499–509.

- Ko, J.A., Morishige, N., Yanai, R., Nishida, T., 2008. Up-regulation of semaphorin 3A in human corneal fibroblasts by epidermal growth factor released from cocultured human corneal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 104–108.
- Krizsan-Agbas, D., Smith, P.G., 2002. Estrogen modulates myometrium-induced sympathetic neurite formation through actions on target and ganglion. *Neuroscience* 114, 339–347.
- Krizsan-Agbas, D., Pedchenko, T., Hasan, W., Smith, P.G., 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.
- Krizsan-Agbas, D., Pedchenko, T., Smith, P.G., 2008. Neurotrimin is an estrogen-regulated determinant of peripheral sympathetic innervation. *J. Neurosci. Res.* 86, 3086–3095.
- Latini, C., Frontini, A., Morroni, M., Marzioni, D., Castellucci, M., Smith, P.G., 2008. Remodeling of uterine innervation. *Cell Tissue Res.* 334, 1–6.
- Lillesaar, C., Fried, K., 2004. Neurites from trigeminal ganglion explants grown in vitro are repelled or attracted by tooth-related tissues depending on developmental stage. *Neuroscience* 125, 149–161.
- Lobos, E., Gebhardt, C., Kluge, A., Spanel-Borowski, K., 2005. Expression of nerve growth factor (NGF) isoforms in the rat uterus during pregnancy: accumulation of precursor proNGF. *Endocrinology* 146, 1922–1929.
- Marzioni, D., Tamagnone, L., Capparuccia, L., Marchini, C., Amici, A., Todros, T., Bischof, P., Neidhart, S., Grenningloh, G., Castellucci, M., 2004. Restricted innervation of uterus and placenta during pregnancy: evidence for a role of the repelling signal semaphorin 3A. *Dev. Dyn.* 231, 839–848.
- McAllister, S.L., McGinty, K.A., Resuehr, D., Berkley, K.J., 2009. Endometriosis-induced hyperalgesia in the rat: role of ectopic growths and their innervation. *Pain* 147, 255–264.
- Miller, L.E., Weidler, C., Falk, W., Angele, P., Schaumburger, J., Schölmerich, J., Straub, R., 2004. Increased prevalence of semaphorin 3 C, a repellent of sympathetic nerve fibers, in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 50, 1156–1163.
- Naska, S., Lin, D.C., Miller, F.D., Kaplan, D.R., 2010. p75NTR is an obligate signaling receptor required for cues that cause sympathetic neuron growth cone collapse. *Mol. Cell. Neurosci.* 45, 108–120.
- Odagiri, K., Konno, R., Fujiwara, H., Netsu, S., Yang, C., Suzuki, M., 2009. Smooth muscle metaplasia and innervation in interstitium of endometriotic lesions related to pain. *Fertil. Steril.* 92, 1525–1531.
- Owman, C., Alm, P., Björklund, A., Thorbert, G., 1980. Extensive sympathetic denervation of the uterus during pregnancy as evidenced by tyrosine hydroxylase determinations in the guinea pig. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 25, 313–320.
- Pasterkamp, R.J., Giger, R.J., 2009. Semaphorin function in neural plasticity and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 263–274.
- Pasterkamp, R.J., Verhaagen, J., 2001. Emerging roles for semaphorins in neural regeneration. *Brain Res. Rev.* 35, 36–54.
- Rhen, T., Grissom, S., Afshari, C., Cidlowski, J.A., 2003. Dexamethasone blocks the rapid biological effects of 17 β -estradiol in the rat uterus without antagonizing its global genomic actions. *FASEB J.* 17, 1849–1870.
- Richeri, A., Bianchimano, P., Mármol, N.M., Viettro, L., Cowen, T., Brauer, M.M., 2005. Plasticity in rat uterine sympathetic nerves: the role of TrkA and p75 nerve growth factor receptors. *J. Anat.* 207, 125–134.
- Richeri, A., Chalar, C., Bianchimano, P., Greif, G., Brauer, M.M., 2008. Estrogen regulation of semaphorin expression in the rat uterus. *EMBO Workshop "Semaphorin Function and Mechanisms of Action"*. Abbaye des Vaux de Cernay, France (Abstract).
- Richeri, A., Bianchimano, P., Crutcher, K.A., Brauer, M.M., 2010. Reduced sympathetic neurite outgrowth on uterine tissue sections from rats treated with estrogen. *Cell Tissue Res.* 340, 287–301.
- Semaphorin Nomenclature Committee, 1999. Unified nomenclature for the semaphorin/collapsins. *Cell* 97, 551–552.
- Taniguchi, M., Masuda, T., Fukaya, M., Kataoka, H., Mishina, M., Yaginuma, H., Watanabe, M., Shimizu, T., 2005. Identification and characterization of a novel member of murine semaphorin family. *Genes Cells* 10, 785–792.
- Waimey, K.E., Huang, P.H., Chen, M., Cheng, H.J., 2008. Plexin-A3 and plexin-A4 restrict the migration of sympathetic neurons but not their neural crest precursors. *Dev. Biol.* 315, 448–458.
- Yaron, A., Huang, P.H., Cheng, H.J., Tessier-Lavigne, M., 2005. Differential requirement for Plexin-A3 and -A4 in mediating responses of sensory and sympathetic neurons to distinct class 3 semaphorins. *Neuron* 45, 513–523.
- Zoubina, E.V., Smith, P.G., 2002. Distributions of estrogen receptors alpha and beta in sympathetic neurons of female rats: enriched expression by uterine innervation. *J. Neurobiol.* 52, 14–23.

Reduced sympathetic neurite outgrowth on uterine tissue sections from rats treated with estrogen

Analía Richeri · Paola Bianchimano ·
Keith A. Crutcher · M. Mónica Brauer

Received: 25 November 2009 / Accepted: 25 February 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract In order to evaluate the contribution of substrate-bound factors to the extent and patterning of the sympathetic innervation of rat uterus following estrogen treatment, superior cervical ganglion explants from neonatal and adult ovariectomized rats were cultured on tissue sections of fresh frozen uterus from adult ovariectomized rats treated with estrogen or a vehicle. The main findings were: (1) neurite growth was greatly influenced by histological features of the underlying section; (2) on myometrial sections, neurites followed the orientation of the main axis of the longitudinally sectioned muscle cells; (3) neurites showed limited growth on transversally sectioned smooth muscle; (4) neuritic patterning was unaffected by a reduction in migrating ganglionic non-neuronal cells; (5) neurite outgrowth, but not non-neural cell migration, was markedly reduced on myometrial sections from rats treated with estrogen. These results suggest that adult myometrium continues to provide signals allowing the organotypic patterning and growth of sympathetic axons, that

estrogen treatment modifies myometrial substrate properties so that it is less supportive for sympathetic neurite growth, and that adult sympathetic neurons retain their ability to recognize substrate-bound cues present in the myometrium. On endometrial sections, neurites formed radially symmetric halos, which were reduced in size on estrogen-treated endometrial substrates. Thus, changes in the neuritogenic capacity of the uterus underlie plasticity in uterine sympathetic nerves, and alterations in substrate-bound factors contribute to the diminished receptivity of the estrogenized uterus to its sympathetic innervation.

Keywords Autonomic · Plasticity · Tissue culture · Gynecological pathologies · Collagen · Rat (Wistar)

Introduction

One of the most outstanding features of the sympathetic innervation of the uterus is its remarkable physiological plasticity, which is regulated by naturally occurring changes in the systemic levels of sex hormones. Although the contribution of progesterone to this plasticity still remains unclear, strong evidence suggests that estrogen is a key hormone regulating the remodeling of uterine sympathetic nerves in the non-pregnant female (for a review, see Brauer 2008). In sexually mature rats, the density of myometrial sympathetic nerves decreases during the estrogen-dominant phases of the sex cycle, and chronic exposure of adult ovariectomized rats to estrogen induces the pruning of mature intrauterine sympathetic nerves (Zoubina et al. 1998, 2001). The inhibitory effects of estrogen are mediated through alpha-estrogen receptors (ER- α). ER- α knockout mice possess an increased density of uterine sympathetic nerves and do not respond to ovariectomy or

Analía Richeri and Paola Bianchimano contributed equally to this work and are postgraduate students of PEDECIBA, Uruguay. This work was supported by a Fogarty International Research Collaboration Award (FIRCA, NIH, grant no. TW007213).

A. Richeri · P. Bianchimano · M. M. Brauer (✉)
Laboratory of Cell Biology,
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable,
Avenida Italia 3318,
Montevideo 11600, Uruguay
e-mail: brauer@iibce.edu.uy

K. A. Crutcher
Department of Neurosurgery,
University of Cincinnati College of Medicine,
231 Albert Sabin Way,
Cincinnati, OH 45267-0515, USA

estrogen supplementation with changes in the density of uterine sympathetic nerves (Zoubina and Smith 2001).

Early studies have shown the abnormal behavior of uterine sympathetic nerves in pregnancy-associated pathologies, such as pre-eclampsia (Rydström et al. 1989). However, the behavior and contribution of uterine nerves to the symptoms and etiology of gynecological disorders, such as endometriosis (Medina and Lebovic 2009), adenomyosis (Quinn 2007a), and uterine fibroids (Adolfsson et al. 2000; Quinn 2007b) have only recently started to be analyzed in detail. All these conditions are considered to be dependent on estrogens because they occur in women of childbearing age and decrease during natural reproductive senescence (estropause/menopause). For these reasons, these pathologies respond to hormonal treatments that produce a hypoestrogenic state, including gonadotropin-releasing hormone agonists (GnRHa; Akira et al. 2009; Stein and Ascher-Walsh 2009; Vercellini et al. 2009). Such findings reinforce the need for a better understanding of the cellular and molecular factors controlling the responses of uterine nerves to estrogen under normal and pathological conditions.

Previous *in vivo* (Brauer et al. 2000, 2002) and *in vitro* (Krizsan-Agbas and Smith 2002) studies have shown that, under the influence of estrogen, the uterine myometrium loses its ability to support its sympathetic innervation. Moreover, current evidence indicates that the estrogenized myometrium is a source of several locally produced, diffusible factors with negative effects on sympathetic nerve growth, including brain-derived neurotrophic factor (BDNF; Krizsan-Agbas et al. 2003), pro-nerve growth factor (pro-NGF; Lobos et al. 2005), neurotrimin (Krizsan-Agbas et al. 2008), and some secreted members of the class 3 semaphorins (Marzioni et al. 2004; Richeri et al. 2008; Brauer 2008). In addition to soluble factors, neurite outgrowth requires substrate-bound signals. These signals play a crucial role during development, and evidence has been presented that such factors continue to function during maturity to regulate neuronal plasticity and regeneration (Hou et al. 2008).

Many *in vitro* studies have addressed the contribution of substrate-bound signals to neurite outgrowth by using patterned surfaces (i.e., stripe assays; Snow et al. 2002). More recently, high-resolution nanoscale patterned substrates have demonstrated that, at least *in vitro*, both substrate composition and geometry (including three-dimensional patterning) contribute to the regulation of growth cone behavior (Li et al. 2008; Crutcher et al. 2009; von der Mark et al. 2010). In the present study, we have sought to test the hypothesis that alterations in substrate-bound signals in the estrogenized myometrium contribute to its inability to support sympathetic nerve growth. With this aim, we have used the tissue section culture method (cryoculture), because this technique allows

the study of the contribution of substrate-bound signals independently of any ongoing synthesis of neurite growth-promoting and growth-inhibiting factors by the target tissue. In addition, this method permits the correlation of patterns of nerve growth with specific features of the underlying tissue (reviewed in Crutcher 1993). Some of these results have been published in abstract form (Bianchimano et al. 2008).

Materials and methods

Animals and treatments

Studies were conducted on female Wistar-derived albino rats from the breeding colony at the Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE, Montevideo, Uruguay). Animals were sexed at birth, weaned at 3 weeks, and maintained under controlled conditions of temperature (21–22°C) and illumination (12 h light/dark cycles) with water and food provided *ad libitum*. All animal procedures were conducted in accordance with the Statement of Compliance with Standards for Human Care and Use of Laboratory Animals, and the number of experimental animals was reduced to the minimum required to obtain statistically significant data.

Uterine tissue donors Adult rats (10 weeks old) were anesthetized with 90 mg/kg ketamine (Unimedical, Uruguay) plus 10 mg/kg xylazine (Unimedical) and bilaterally ovariectomized (OVX) through two small incisions in the lumbar region. Following surgery, rats were allowed to recover and returned to the animal facility. None of the animals showed signs of pain or infection requiring post-operative analgesics or antibiotics. To minimize discomfort, ovariectomized females were housed in individual cages following surgery and until they were killed. Estrogen treatment of OVX uterine tissue donors, consisted of three subcutaneous injections of 50 µg β-estradiol 17-cypionate (Laboratorios König, Argentina) given on days 5, 7, and 9 following surgery. Animals were killed by an overdose of sodium pentobarbital on the day after completion of treatment. This regimen was selected because it provoked a substantial degree of uterine sympathetic denervation and reduced the atrophic changes induced by ovariectomy in the uterus (Chávez-Genaro et al. 2002; Richeri et al. 2005). Vehicle-treated (peanut oil; Sigma-Aldrich, USA) OVX rats were killed 3 days following surgery. Although the harvesting of this tissue would have been desirable at the same post-operative time as the estrogen-treated animals, reductions in the thickness of the myometrium following ovariectomy (Fig. 1a, b) limited the number of usable tissue sections

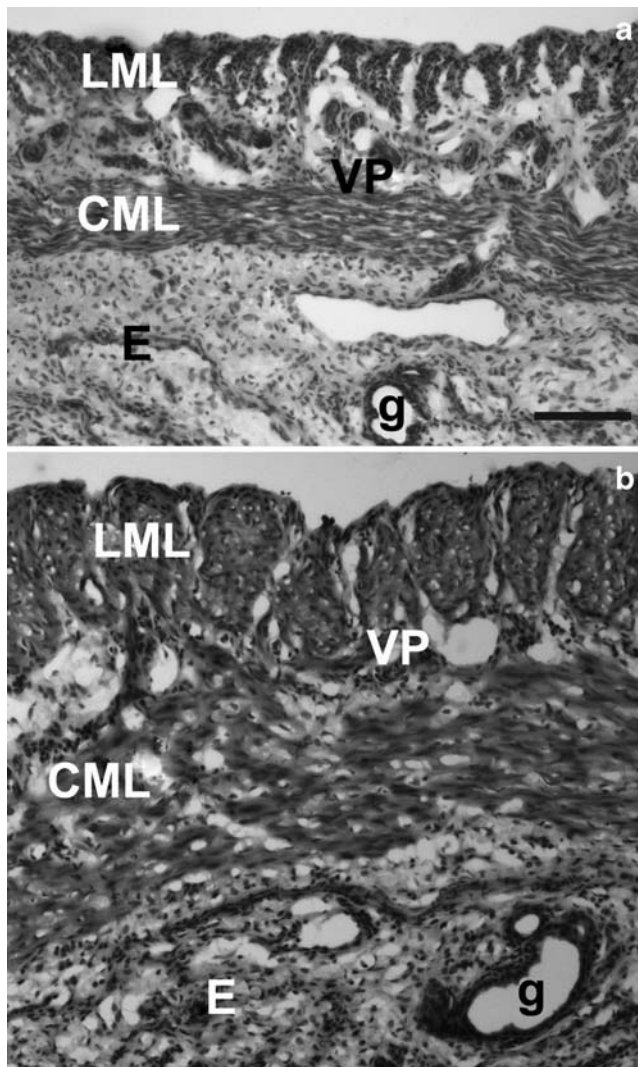


Fig. 1 Histological changes in the uterus following ovariectomy and estrogen replacement. Transverse cryostat tissue sections (8 μm thick) of the rat uterine horn at 3 days following ovariectomy (**a**) and at 10 days following ovariectomy plus estrogen replacement (**b**). Hematoxylin and eosin staining (*CML* circular myometrial layer, *E* endometrium, *g* endometrial gland, *LML* longitudinal myometrial layer, *VP* vascular plexus). Bars 100 μm

with appropriate orientation of the smooth muscle cells for quantitative studies. As a result, the use of a 3-day survival time point substantially reduced the number of donor animals needed.

Ganglionic explants donors Explants of the superior cervical ganglion (SCG) from neonatal (4–5 days old) and adult (10 weeks) OVX rats were used. Although the SCG does not normally innervate the uterus (Vera et al. 1997; Houdeau et al. 1998), their neurons have been shown to respond to several uterine-derived growth-promoting and growth-inhibiting signals in a way similar to that of uterine-projecting sympathetic neurons, both in vitro (Krizsan-

Agbas and Smith 2002; Krizsan-Agbas et al. 2003, 2008) and in anterior eye chamber transplantation studies (Brauer et al. 1998, 2000, 2002).

Tissue culture

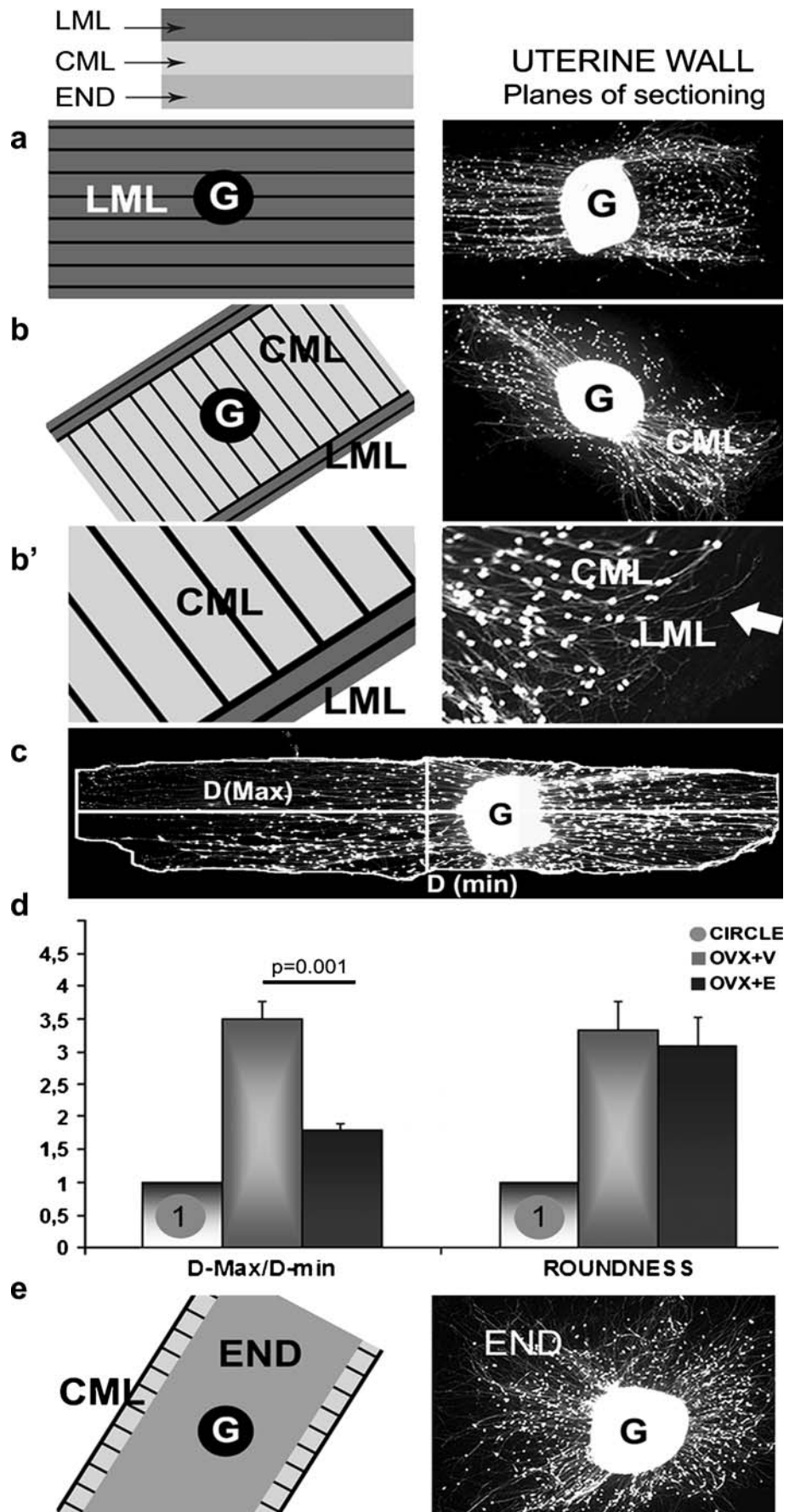
The uterine horns were removed under aseptic conditions, freed from fat and connective tissue, opened longitudinally, and flat-mounted onto pre-cooled cryostat chucks. Cryostat tissue sections (14 μm thick) were obtained at various depths into the tissue, including the longitudinal myometrial layer, the circular myometrial layer, and the endometrium. In some studies, sections cut transversally to the long axis of the uterine horn were employed. Sections were thaw-mounted onto the bottom of 35-mm untreated plastic tissue-culture dishes (Falcon BD, USA). Some sections were mounted on glass slides and immunostained with anti-tyrosine-hydroxylase (α -TH, final dilution 1:400; ABR–Affinity BioReagents, USA) to assess endogenous sympathetic innervation.

SCGs were freed from connective tissue and further dissected into explants (500–600 μm in diameter). Cultures were grown in serum-free Neurobasal medium (Gibco, Invitrogen, USA) supplemented with 2% B-27 (Gibco, Invitrogen), 0.5 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich), 1% antibiotics (Gibco, Invitrogen), and NGF (Harlan Bio-products for Science, USA) at concentrations of 0.5 ng/ml for neonatal explants and 5 ng/ml for adult ganglion explants. NGF concentrations were based on preliminary studies designed to establish the minimum concentration required to obtain consistent neurite outgrowth on sections from freshly frozen tissue. To assess the contribution of non-neuronal cells to neuritic patterning and outgrowth, cell proliferation in the ganglion explants was arrested by treatment with 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mitomycin C (Sigma-Aldrich) dissolved in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 medium (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37°C (Damon 2006). After a washout of mitomycin C, explants were placed onto tissue sections. Control ganglion explants were incubated in DMEM/F12 medium for 1 h at 37°C.

Microscopy, imaging, and quantitative assessment of neurite outgrowth and non-neuronal cell migration

At 3 days after plating, cultures were incubated with a fluorescent vital dye (5-carboxyfluorescein diacetate, acetoxymethyl ester; Molecular Probes, Invitrogen) for 1.5 h and examined under a Nikon E800 fluorescence microscope. Images were captured at magnifications of 4 \times and 10 \times by using a CoolSNAP-Pro Monochrome Digital camera with Image ProExpress software (Media Cybernetics, USA). Following imaging, preparations

Fig. 2 Influence of uterine substrate on neurite patterning. Culture of sympathetic ganglion explants (*G*; 500–600 μm in diameter) on tissue sections obtained at various depths from freshly frozen flat-opened uterine horn showed that neurites grew following particular features of the underlying tissue sections. On sections of the longitudinal (*LML*, **a**) and circular (*CML*, **b**) myometrial layers, neurites followed the orientation of the main axis of the longitudinally sectioned, smooth muscle cells. When neurites reached a boundary between these two cell orientations, they make sharp turns to adapt their course to the main axis of the muscle cells (**b'**, *arrow*). The schematic representation in **c** shows the quantitative method employed to assess the diameter ratio ($D\text{-Max}/D\text{-min}$) and roundness of the neuritic halo observed on sections of the longitudinally-sectioned *LML*. The diameter ratio and roundness of the elongated neuritic halo formed on sections of the *LML* of control (*OVX+V*) and estrogen-treated (*OVX+E*) uterine tissue donors (**d**) was quantified. Radially symmetric halos formed on sections of the endometrium (*END*, **e**)



were fixed in 4% paraformaldehyde and stained with 0.01% toluidine blue to assess their histology. Neurite outgrowth and non-neuronal cell migration were blindly measured on tissue sections of the longitudinally sectioned, longitudinal myometrial layer and endometrium by using ImagePro Plus software (Media Cybernetics). Measurement data collected from uterine sections obtained from the same rat were averaged, so that each uterine donor was treated as one independent observation ($n=4-5$ rats per treatment). Results are expressed as the median with first and third quartiles. Morphometric measurements were compared by using non-parametric tests. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

Results

Pattern of neurite outgrowth on control uterine tissue sections

Culture experiments carried out by using as substrate tissue sections obtained at various depths and orientations of the flat-opened uterine horn revealed that the course of growing neurites was greatly influenced by histological features of the underlying tissue section (Figs. 2, 3). On sections of both the longitudinal (Figs. 2a, c, 3a, c) and circular (Figs. 2b, 3b) myometrial layers, neurites preferentially grew following the direction of the main axis of the longitudinally sectioned, smooth muscle cells. Neurites rarely grew perpendicular to this axis (i.e., across the sectioned cell), and on occasions, they turned by up to 90° to adapt their course to the orientation of the main muscle axis (Figs. 2b', 3g). In order to assess quantitatively the extent of this organotypic patterning (i.e., the degree to which the neuritic course adapted to the main axis of the longitudinally sectioned, smooth muscle layers), the diameter ratio (diameter maximum/diameter minimum) and roundness of the neuritic halo were measured by using Image ProPlus software (Fig. 2c, d). Both the diameter ratio and roundness were above 1 (perfect circle=1) in ganglionic explants growing on the longitudinally sectioned, longitudinal myometrial layer, thus reflecting the adaptation of neuritic growth to the main axis of the longitudinal myometrial layer. On transverse sections of the uterine horn, most neurites grew in association with the longitudinally sectioned, muscle cells of the circular myometrial layer (Fig. 3b). Some isolated neurites grew on the cross-sectioned longitudinal muscle layer, forming an irregular network pattern (Fig. 3b, d).

Qualitative microscopic examination of toluidine blue-stained cultures suggested that neurites preferentially grew apposed to smooth muscle cells/bundles (Fig. 3c, g). Some neurites grew along blood vessels (Fig. 3c, arrowhead, h).

Some fibers showed expanded growth cones (Fig. 3c, inset), whereas other presented varicosities. The pattern of nerve growth on myometrial tissue sections resembled that of the endogenous uterine sympathetic innervation in that the predominant orientation was along the main axis of the smooth muscle fibers (Fig. 3e), and many fibers were associated with the vasculature (Fig. 3f).

Treatment of neonatal ganglion explants with mitomycin C reduced, by 62%, the overall density of non-neuronal cells migrating on myometrial sections (DMEM/F12=248 [206–276]; mitomycin C=95 [64–141], $P < 0.03$); methodological details are given below). Reductions in the number of migrating non-neuronal cells had no effect on the pattern and extent of neuritic growth (Figs. 4a, b, see also below).

Neurite outgrowth on myometrial tissue sections from estrogen-treated rat donors

In both neonatal (Fig. 4a, c) and adult (Fig. 5a, b) ganglionic explants, the pattern of neuritic growth on myometrial sections was unaffected by estrogen treatment of the uterine donors. However, in both cases, significant reductions in the extent of neuritic growth were observed. To assess these changes quantitatively (Fig. 4e), the maximum neurite length (MNL) was calculated. To this end, the lengths of the five longest neurites were measured by drawing a straight line from the proximal border of the explant to the distal end of each neurite. In order to control for variability in explant size, the MNL was divided by the mean explant diameter to obtain a normalized growth ratio (neurite growth ratio, NGR). In neonatal ganglionic explants, the MNL was reduced by 37% on myometrial sections of estrogen-treated donors, and the NGR showed a 55% reduction (Fig. 6d, e). The diameter ratio was consistently reduced by 51% (Fig. 2d). In order to assess changes in neurite density (Fig. 4e), the number of neurites crossing a perpendicular line 1000 μm from the proximal border of the explant was counted, and the intercept nerve density was expressed as the number of neurites per millimeter. These studies showed that intercept nerve density was reduced by 85% in neonatal ganglionic explants cultured on myometrial sections of estrogen-treated donors (Fig. 6f).

On control myometrial sections, ganglionic explants from adult ovariectomized rats (Fig. 5a) gave rise to shorter neurites than neonatal ganglia (Fig. 4a). On estrogen-treated myometrial substrates (Fig. 5b), the MNL was reduced by 29% (Fig. 6g), and the NGR declined 40% (Fig. 6h). To assess changes in nerve density, the percentage area occupied by neurites was measured (see Fig. 5c–e). The density of neurites leaving the explant showed a reduction on myometrial sections from estrogen-treated donors, but the difference did not reach statistical significance (Fig. 6i).

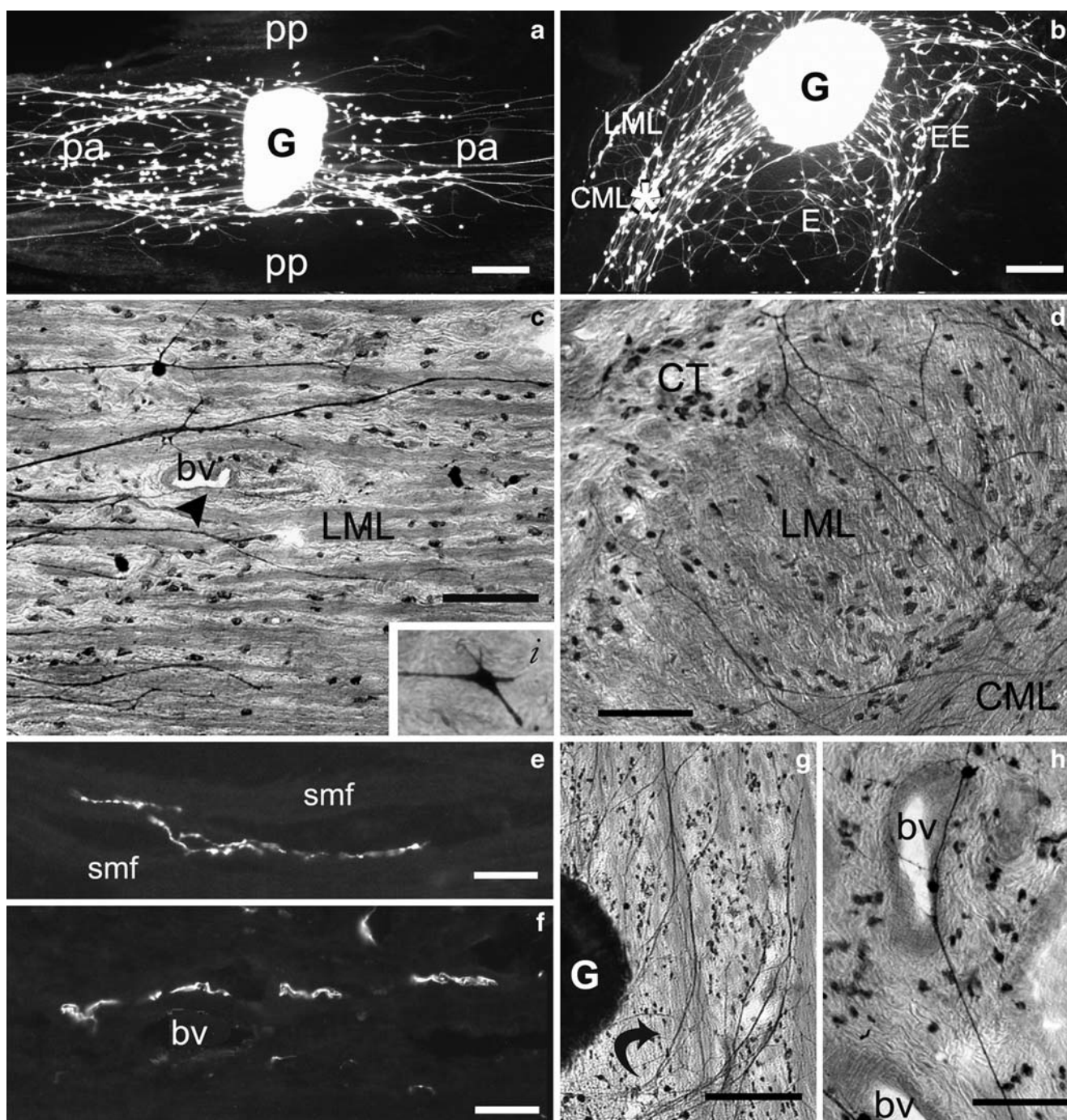


Fig. 3 Pattern of neurite outgrowth on myometrial tissue sections from control ovariectomized rats. Representative fluorescein-labeled neonatal sympathetic ganglion explants (*G*) cultured for 3 days on unfixed uterine tissue sections. **a** Neurites extending on sections of the flat-opened longitudinal myometrial layer followed the parallel (*pa*) orientation of the main axis of the longitudinally sectioned, smooth muscle cells. Note that the myometrial section covers the entire field. However, neurites did not grow perpendicularly (*pp*) to the muscle main axis. In **b**, a transverse section of the uterine horn was used as substrate. Note that most neurites grew paralleling the main axis of the longitudinally-sectioned circular myometrial layer (*star*, *CML*) and comparatively fewer neurites grew toward the transversally sectioned, smooth muscle cells in the longitudinal myometrial layer (*LML*). Some fibers were seen penetrating the endometrium (*E*) and lying in

association with the endometrial epithelium (*EE*). **c, d, g, h** Toluidine blue-stained cultures showing neurite growth mostly associated with myometrial smooth muscle cells and intrauterine blood vessels (*bv*, see *arrowhead* in **c**). *Inset i* in **c** Expanded growth cone. **d** Transverse section of the uterine horn illustrating the orientation of neurites on the transversally sectioned *LML* (*CT* connective tissue in the outer uterine surface). **g** Some neurites (*curved arrow*) turned up to 90° to follow the direction of muscle fibers. **h** Neurite growing in association with the surface of a sectioned blood vessel (*bv*). **e, f** Uterine tissue sections fixed conventionally and stained for tyrosine hydroxylase to reveal the endogenous sympathetic innervation and its association with individual smooth muscle fibers (*smf*) in the longitudinal myometrial layer and intrauterine blood vessels (*bv*). *Bars* 400 μm (**a**), 200 μm (**b–d, g, h**), 25 μm (**e, f**)

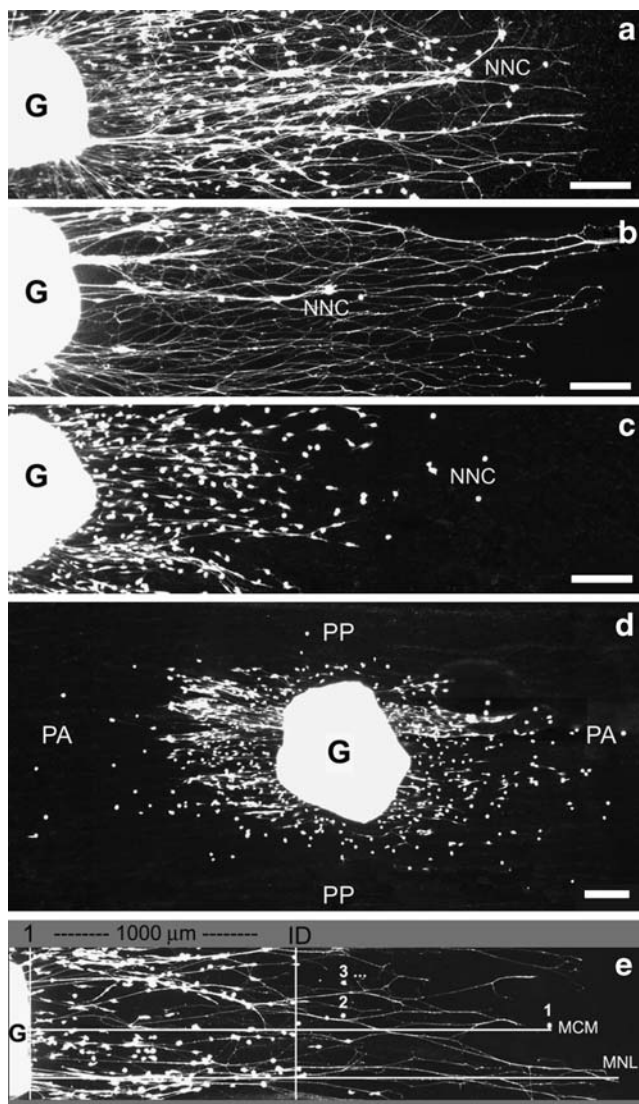


Fig. 4 Neurite outgrowth and non-neuronal cell migration from neonatal sympathetic ganglia on sections of myometrium from control and estrogen-treated rats. Representative images of fluorescein-labeled sympathetic control (a) and mitomycin-C-treated (b) neonatal ganglion explants (G) cultured for 3 days on unfixed tissue sections of the longitudinal myometrial layer of a control ovariectomized adult rat. Neurite outgrowth on myometrial sections was unaffected by the sharp reduction in the number of migrating ganglionic non-neuronal cells (NNC). Neonatal ganglion explants plated on myometrial sections of estrogen-treated rat donors are shown in c, d. Note that neurite growth, but not non-neuronal cell migration, is markedly reduced on sections of estrogenized myometrium. In d, non-neuronal cells preferentially migrate parallel (PA) to the smooth muscle cells long axis, and only a few cells migrate perpendicularly (PP). Bars 200 μm . In the representation of the quantitative morphological analyses (e), the rectangular mask containing the longitudinal myometrial layer was superimposed on the vital dye image, cropped, and then used for quantitative analysis. Only images in which neurites did not reach the edge of the section and did not encounter other tissue structure (i.e., circular myometrial layer, vascular plexus, or endometrium) were employed. Measurements include maximum neurite length (MNL), neurite intercept density (ID) at 1000 μm from the proximal border of the ganglion explant (black 1); maximum non-neuronal cell migration (MCM); non-neuronal cell migration beyond 1000 μm from the ganglion explant proximal border (white 1, 2, 3...)

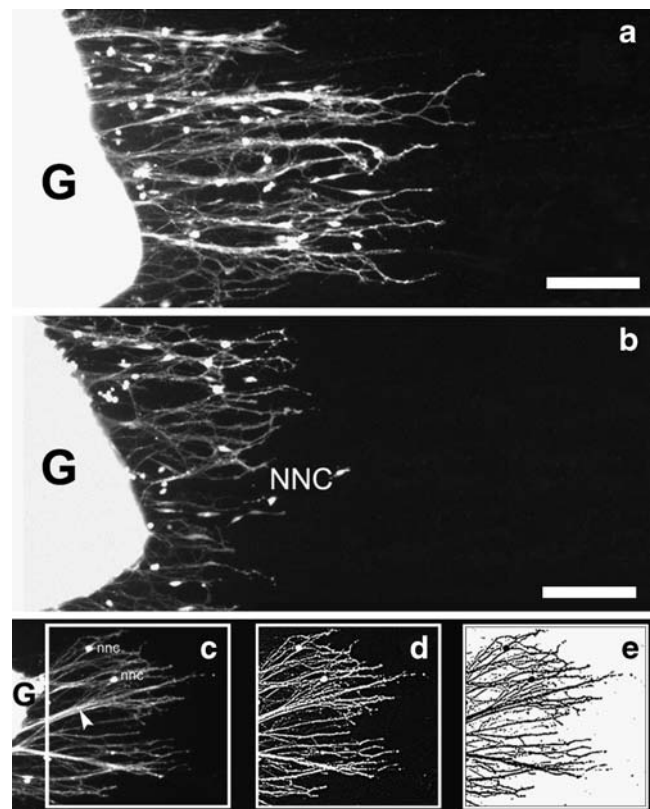


Fig. 5 Neurite outgrowth and non-neuronal cell migration from adult sympathetic ganglia on sections of myometrium from control and estrogen-treated rats. Representative images of fluorescein-labeled adult rat sympathetic ganglion explants plated on sections of the longitudinal myometrial layer of adult ovariectomized rats treated with vehicle (a) or estrogen (b). Note that neurite growth was markedly reduced on sections of estrogenized myometrium. Only a small population of non-neuronal cells (NNC) migrated out of adult ganglionic explants (G). Bars 200 μm . As shown in the representations of the method employed to measure changes in neurite density, a 0.25-mm² square was superimposed on the image of neurites (arrowhead) located close to the explant border (c) and then cropped (nnc non-neuronal cells). Following contrast enhancement (d) by using a Kernels higauss filter (9 \times 9), neurites were isolated by means of the “threshold” function of Image ProPlus software (e), and the resulting nerve area was measured and expressed per square millimeter of tissue section

Non-neuronal cell migration on control and estrogen-treated myometrial tissue sections

On both vehicle- and estrogen-treated myometrial substrates, a large number of non-neuronal cells migrated out from neonatal ganglionic explants (Fig. 4a, c). Like the neurites, non-neuronal cells preferentially followed the orientation of the main axis of the longitudinally sectioned, smooth muscle cells (Figs. 4d, 7a). The extent of non-neuronal cell migration [i.e., maximum cell migration (MCM) and number of cells migrating beyond 1000 μm (NC), Fig. 4e] was unchanged on estrogen-treated myometrial sections (Figs. 4a, c, 7a, b). Non-neuronal cell migration was limited in adult

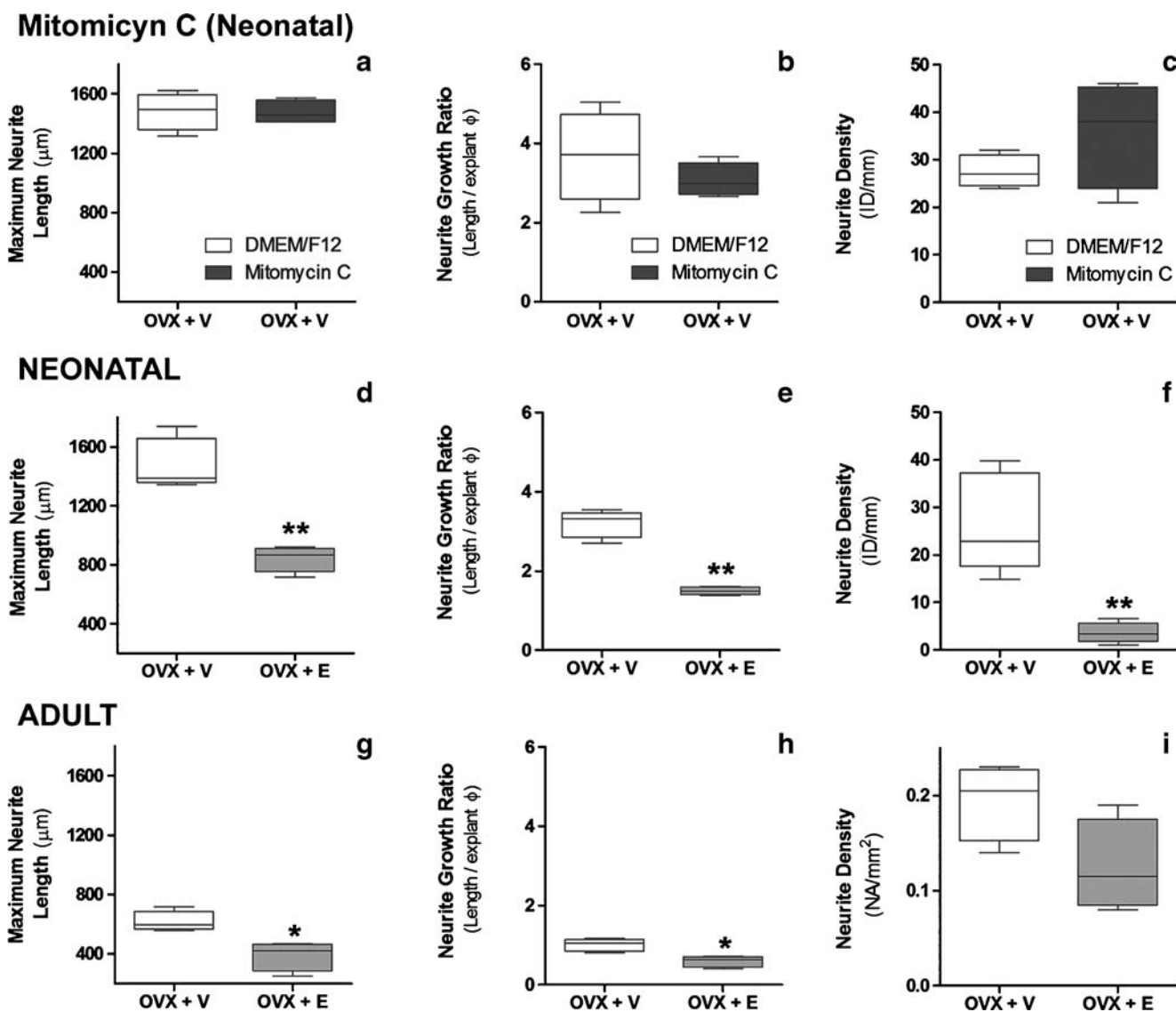


Fig. 6 Quantitative assessment of neurite outgrowth on myometrial sections. Neonatal ganglion explants (a–c) treated with mitomycin C (30 $\mu\text{g/ml}$) or DMEM/F12 (control) plated on cryostat tissue sections of the longitudinal myometrial layer from adult ovariectomized (OVX) rats. Neonatal (d–f) and adult ovariectomized (g–i) ganglion explants plated on cryostat tissue sections of the longitudinal myometrial layer from adult OVX rats were treated with vehicle (OVX+V) or estrogen

(OVX+E). Data pairs were compared by using the Mann-Whitney non-parametric test. Multiple comparisons were avoided because experiments were not conducted simultaneously (ϕ diameter, ID/mm neurite intercept density per millimeter at 1000 μm from proximal ganglion border, NA/mm² neurite area per mm² of muscle section at the ganglion border). *Significant difference ($P=0.03$) compared with control. **Significant difference ($P=0.008$) compared with control

sympathetic ganglia (Fig. 5a, b) and similar on both control and estrogen-treated myometrial substrates (Fig. 7c, d).

Neurite outgrowth and non-neuronal cell migration on endometrial tissue sections from estrogen-treated rat donors

Explants plated on sections of the endometrium from control OVX rats formed radially symmetric halos composed of an intricate meshwork of neurites (Figs. 2e, 8a). This pattern resembled the neuritic halo surrounding explants plated on collagen-coated dishes (Fig. 8c). Neurite outgrowth was reduced on explants growing on endometrial sections of

estrogen-treated rats (Fig. 8b), and this growth was restricted to the basal lamina of endometrial glands (Fig. 8d) and the lining epithelium (Fig. 8e). Similar results were seen with individual sympathetic neurons that occasionally dissociated from explants during the preparation and became attached to the uterine tissue section (Fig. 8f). To assess quantitatively the changes in neuritic extent, we measured the diameter of the neuritic halo, the MNL, and the number of neurites crossing a circular intercepting line located at 1000 μm from the explant (see Fig. 8g, h). These studies showed that, on estrogen-treated endometrial sections, the diameter of the neuritic halo was reduced by 51% (Fig. 9a, b), and the NGR

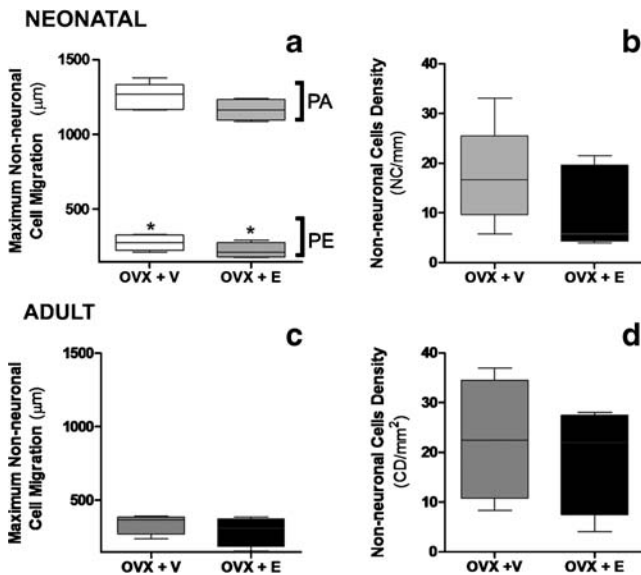


Fig. 7 Non-neuronal cell migration on myometrial sections. Quantitative assessment of non-neuronal cell migration (NC) from superior cervical ganglion explants of neonatal (**a**, **b**) and adult ovariectomized (OVX) rats (**c**, **d**) plated on cryostat tissue sections of the longitudinal myometrial layer from adult OVX rats treated with vehicle (OVX+V control) or estrogen (OVX+E). In neonatal ganglia (**a**), non-neuronal cell migration was measured both parallel (PA) and perpendicular (PE) to the main axis of the longitudinal muscle layer. *Significant difference ($P < 0.05$) between PE and PA of each treatment (Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA test, followed by Dunn's multiple comparison test). In adult ganglia (**d**), non-neuronal cell density (CD) was measured at three different distances from the ganglion explant by superimposing a 0.25-mm^2 stereological grid composed of orthogonally distributed triangular points located at $50\text{-}\mu\text{m}$ intervals. All points overlying non-neuronal cells were counted and averaged, and the cell density was expressed as the number of intercepts per square millimeter. Data pairs were compared by using the Mann-Whitney non-parametric test

was reduced by 48% (Fig. 9c). The intercept density was less on estrogen-treated endometrial sections, but the difference was not statistically significant (Fig. 9d). On sections of control endometrium (Fig. 8a), non-neuronal cells migrated in all directions and did not appear to show any particular pattern. Morphometric studies showed that non-neuronal cell migration on endometrial sections was unaffected by estrogen treatment of uterine tissue donors (Figs. 8b, 9e, f). On these sections, many non-neuronal cells migrated along the basal lamina of the endometrial epithelium and glands, whereas others migrated on the endometrial stroma (Fig. 8b, d, e).

Discussion

Substrate-bound signals contributes to histotypic patterning of myometrial sympathetic nerves

The results presented here show that tissue sections from freshly frozen myometrium from adult ovariectomized

control rats support extensive neurite outgrowth from neonatal sympathetic ganglionic explants. On these sections, neurites do not produce radially symmetric halos, as they form on collagen-coated dishes. Instead, they grow by adapting their course to the orientation of the main axis of the longitudinally sectioned, smooth muscle cells, thus mimicking endogenous innervation. Moreover, on occasions, neurites make sharp turns to follow this particular orientation. Like neonatal neurons, adult sympathetic neurons also produce a histotypic pattern of neuritic growth on myometrial tissue sections. These findings indicate that adult sympathetic neurons retain their ability to recognize cues present in uterine tissue. The maximum neuritic length achieved by adult sympathetic neurons is considerably lower than that of their neonatal counterparts, and adult neurons require higher concentrations of NGF to produce neurites on myometrial tissue sections. Adult sympathetic neurons are known to retain their growth responsiveness to NGF during their adult life (Oriike et al. 2001). However, the requirements for the regenerative growth displayed by adult neurons probably differ from the developmental growth necessities that may be more characteristic of neonatal neurons.

Taken together, these data indicate that adult myometrial smooth muscle target tissues continue to provide signals allowing the organotypic patterning and growth of their sympathetic nerve supply. This is not surprising, because changes in the neuritogenic capacity of the adult uterus are thought to contribute to the estrogen-driven remodeling of sympathetic innervation during the natural estrous cycle and also to allow regeneration of sympathetic nerves following delivery (Brauer 2008). These observations highlight the contribution of substrate-bound signals, because organotypic patterning of neurites occurs without the intervention of any ongoing production of permissive or inhibitory signals by the living tissue. These results are also consistent with the view that growing neurites make choices among different pathways and stress the importance of tissue micro-architecture in determining the pattern of innervation. A similar role for tissue "geometry" in supporting neurite outgrowth has been shown in studies in which sections of brain and spinal cord white matter support parallel but not perpendicular neurite outgrowth (Pettigrew and Crutcher 1999, 2001; Pettigrew et al. 2001; Crutcher et al. 2009).

Ganglionic non-neuronal cells do not contribute to the pattern or extent of neurite outgrowth on myometrial tissue sections

In tissue section cultures employing neonatal ganglionic explants, a considerable number of migrating non-neuronal cells is seen attached to myometrial tissue sections after 3

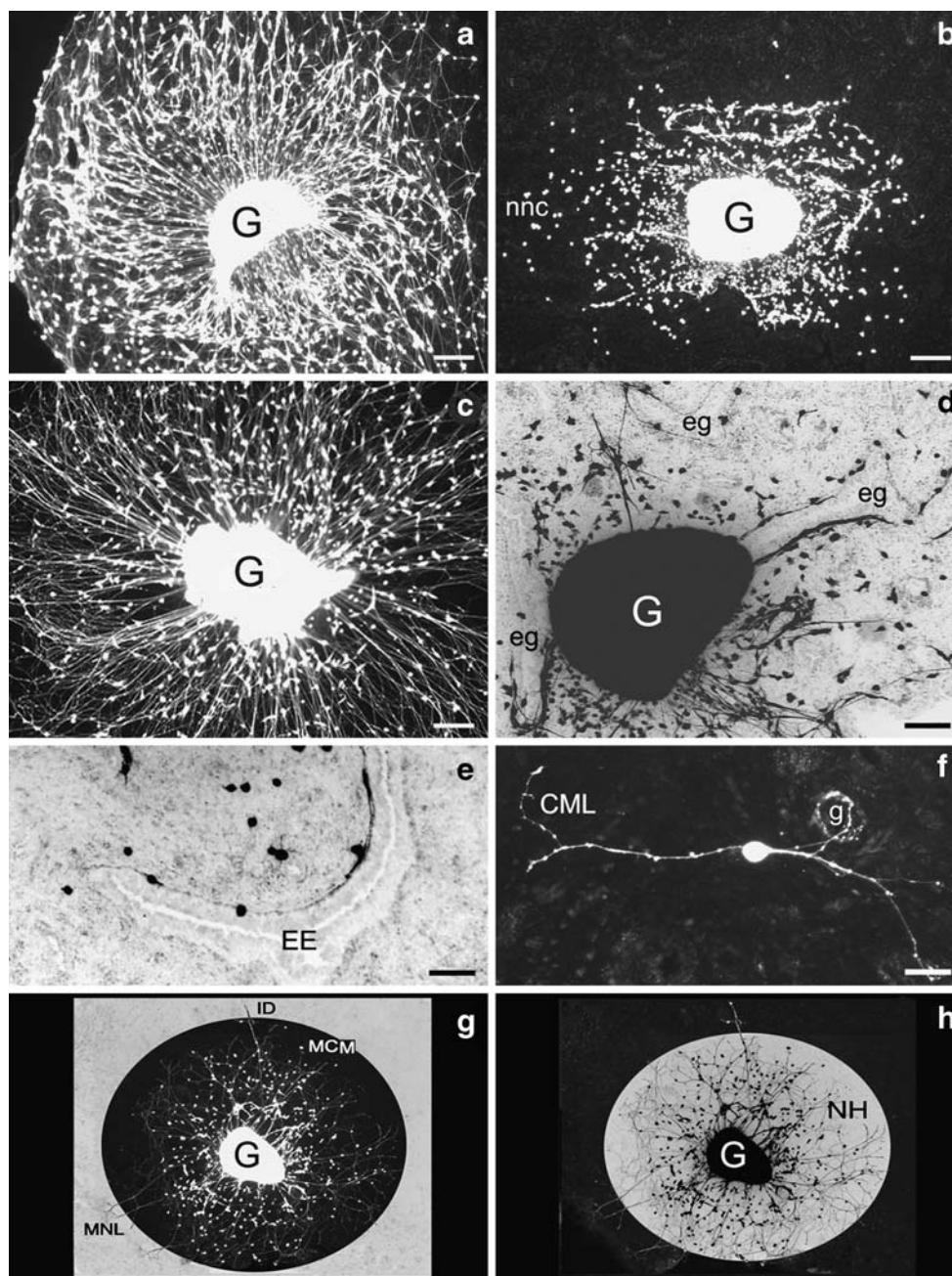


Fig. 8 Neurite outgrowth and non-neuronal cell migration on sections of endometrium. Representative fluorescein-labeled sympathetic neonatal ganglion explants (*G*) cultured for 3 days on unfixed tissue sections of endometrium from adult ovariectomized rats treated with vehicle (**a**) or estrogen (**b**). The pattern of growth on endometrial tissue sections of control rats (**a**) closely resemble the pattern of growth of explants on culture dishes coated with total rat-tail collagen (**c**). Neurite outgrowth, but not non-neuronal cell migration (*nnc* non-neuronal cells), was markedly diminished on endometrial sections of estrogen-treated rats (**b**). In toluidine blue-stained cultures (**d, e**) on endometrial sections of estrogen-treated rats, neurite outgrowth appeared to be largely restricted to the basal lamina of endometrial glands (*eg*) and the endometrial epithelium

(*EE*). In **f**, neurites from a fluorescein-labeled sympathetic neuron surround an endometrial gland (*g*) and turn 90° to follow the direction of smooth muscle cells in a neighboring portion of the circular myometrial layer (*CML*). Bars 200 μm (**a–c**), 150 μm (**d**), 120 μm (**e**), 40 μm (**f**). Representation of quantitative morphological analyses of neurite outgrowth and non-neuronal cell migration on sections of the endometrium is shown in **g, h**. The diameter of the neuritic halo (*NH*) was measured by drawing a circle or ellipse encompassing the end of the vast majority of neurites from which the mean diameter of the ganglion explant (*G*) was subtracted (*ID* neurite intercept density at 1000 μm, *MNL* maximal neurite length, *MCM* maximal non-neuronal cell migration)

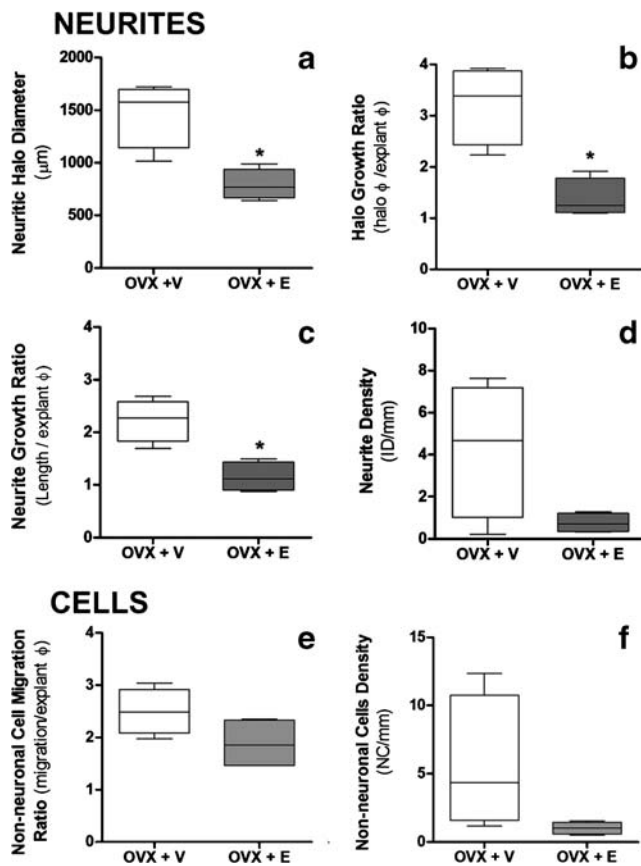


Fig. 9 Neurite outgrowth and non-neuronal cell migration on endometrial substrates. Quantitative assessment of neurite outgrowth (a–d) and non-neuronal cell migration (e, f) from superior cervical ganglion explants plated on endometrial tissue sections from adult ovariectomized rats treated with vehicle (OVX+V control) or estrogen (OVX+E). Data pairs were compared by using the Mann-Whitney non-parametric test (ϕ diameter, ID/mm neurite intercept density per millimeter at 1000 μm from proximal ganglion border, NC/mm number of non-neuronal cells migrating beyond 1000 μm from outer limit of the ganglion explant). *Significant difference ($P=0.03$) compared with OVX+V

days in culture. Although the identity of these non-neuronal cells has not been assessed, a previous scanning electron-microscopic study has shown that, in culture, several types of non-neuronal cells migrate out from neonatal rat SCG, including Schwann cells, other glial cells with a multipolar appearance, connective tissue cells, and macrophages (Hill et al. 1974). A smaller amount of migrating non-neuronal cells is observed in adult sympathetic ganglionic explants, perhaps reflecting their lower mitotic activity and/or reduced responsiveness to signals present in the uterine tissue.

Previous studies have shown that, in vitro, non-neuronal cells (i.e., Schwann cells) contribute to sympathetic neurite outgrowth by synthesizing and secreting factors such as laminin and NGF (Anton et al. 1994). Moreover, such factors might bind to the section and

influence neurite outgrowth (Tuttle and Matthew 1991). Our studies, however, have demonstrated that, in neonatal ganglionic explants, experimental reductions in the number of migrating non-neuronal cells have no impact on the pattern or extent of neuritic growth. Similarly, the naturally reduced number of non-neuronal cells migrating out of adult ganglionic explants does not prevent neurite outgrowth or affect the pattern of neuritic growth on myometrial tissue sections.

Estrogen reduces sympathetic neurite outgrowth on myometrial tissue sections without affecting non-neuronal cell migration

The pattern of neurite growth from both neonatal and adult sympathetic ganglion explants on myometrial tissue sections of estrogen-treated donors is similar to that on control tissue. However, the overall extent of growth is markedly reduced in both cases. These results mimic the inhibitory effects elicited by estrogen both in immature (Chávez-Genaro et al. 2002) and in adult (Zoubina et al. 2001) uterine sympathetic nerves in vivo and suggest that substrate-associated signals contribute to the selective denervation elicited by estrogen in the myometrium. Similarly, anterior eye chamber transplantation studies involving tissues submitted to freeze-thaw cycles before transplantation have shown that poorly innervated cerebral blood vessels from aged rats attract fewer reinnervating nerve fibers from the iris than the normally innervated tissues from young animals (Gavazzi et al. 1996). A reduced neuritic growth occurring on sections of estrogenized myometrium is observed, in spite of the fact that the sympathetic neurons used in this study do not normally innervate the uterus (Vera et al. 1997; Houdeau et al. 1998). This is consistent with previous studies demonstrating that both neonatal and adult SCG are responsive to target-derived diffusible signals produced by the estrogenized myometrium (Krizsan-Agbas and Smith 2002; Krizsan-Agbas et al. 2003, 2008). Moreover, in anterior eye chamber transplant studies, these neurons have been found to mimic the response of native uterine-projecting sympathetic neurons (Brauer et al. 1998, 2000, 2002).

In this study, we have observed that non-neuronal cell migration is influenced by features in the underlying tissue section, and that, like neurites, most cells follow the long axis of the smooth muscle cells. This indicates that both neuronal and non-neuronal cells are influenced by similar cues present in the underlying myometrial tissue. However, non-neuronal cell migration is similar on both control and estrogen-treated substrates, suggesting that non-neuronal cells are less responsive than neurites to estrogen-induced changes in the composition or architecture of the underlying substrate.

Estrogen reduces sympathetic neurite outgrowth on endometrial tissue sections

As adult rat endometrium is poorly innervated by sympathetic nerves (Papka et al. 1985), an unexpected finding of the present investigation is the observation that endometrial sections from control ovariectomized rats support extensive sympathetic neurite outgrowth. Interestingly, the growth of neurites on control endometrial sections takes the form of radially symmetric halos that closely resemble those formed on collagen-coated dishes (without tissue sections). This indicates that neurite growth is not influenced by any particular feature in the underlying endometrial section. However, the possibility that the substantial amount of neurites present on the section masks interactions with particular structures present in the substrate cannot be presently disregarded. The formation of an extensive neuritic halo on control endometrial sections suggests the presence of permissive substrate-associated signals. The presence of collagen type I and type IV and of laminin and fibronectin associated with the endometrial stroma and epithelial/glandular basal membranes (Shynlova et al. 2004) are consistent with this conclusion. However, on the assumption that the endometrium provides a permissive substrate, such permissiveness contrasts with the natural sparseness of endogenous sympathetic nerves in the adult rat endometrium. The lack of significant innervation in the endometrium might be explained by other factors. These may include diffusible inhibitory/chemorepulsive signals, which, in the living tissue, could override the permissiveness provided by the endometrial substrate. In addition, the uneven distribution of NGF observed in the rat myometrium and endometrium *in vivo* (Chalar et al. 2003) could also bias growth of sympathetic nerves toward the myometrium *in vivo*.

Neurite outgrowth, but not non-neuronal cell migration, is markedly diminished on estrogenized endometrial tissue sections. Interestingly, neurite outgrowth is specifically inhibited on the endometrial stroma but continues to occur in association with the basal lamina of endometrial epithelium and glands. These results suggest that, under the influence of estrogen, the endometrial stroma produces inhibitory signals for sympathetic nerves, whereas epithelial basal laminae retain their ability to support neuritic growth. The relatively recent finding of an abnormal presence of sympathetic and other nerves in eutopic endometrium and ectopic endometriotic growths in women with endometriosis (Tokushige et al. 2006, 2007) and in ectopic cysts of rats with experimental endometriosis (Berkley et al. 2004, 2007) have increased the relevance of understanding in detail the mechanisms regulating the innervation of the endometrium and its responses to estrogen. Recent studies have demonstrated that increased levels of NGF and other

trophic molecules contribute to the abnormal innervation observed in eutopic endometrium and ectopic endometriotic growths in women with endometriosis (Anaf et al. 2002; Tokushige et al. 2006). In this context, the present cryoculture results may pose interesting questions about the contribution of substrate-bound signals to the regulation of endometrial innervation under normal and estrogen-associated pathological conditions.

Possible nature of substrate-bound signals contributing to pattern of sympathetic nerves and inhibition of their growth on estrogenized myometrial tissue sections

In our culture studies, we have observed that neurites grow closely associated to myometrial smooth muscle cells. This observation is consistent with previous studies showing that neurites from embryonic chick ciliary ganglia plated on cryostat sections of adult rat kidney and skeletal muscle preferentially grow along the sectioned surfaces of renal tubules and muscle fibers (Covault et al. 1987). The preferential association indicates that growing neurites interact with specific molecules present in the cell membranes and/or surrounding basal lamina. Several components of the extracellular matrix (ECM) and basal lamina have been shown to support and stimulate neurite outgrowth (Hou et al. 2008). In addition, basement membranes serve as reservoirs of several neurotrophic factors, including NGF.

The ECM and basement membranes surrounding myometrial smooth muscle cells contain several adhesion molecules, such as laminin, fibronectin, and collagen (Shynlova et al. 2004). Laminin and fibronectin, when presented as substrata and in tissue section culture experiments, stimulate the outgrowth of various classes of axons (Hynds and Snow 2001). Collagen is an ECM protein widely employed for neural cultures, either as a substrate or forming three-dimensional collagen gels. Interestingly, collagen alignment has been shown to affect the extent of neurite growth. For example, magnetically aligned type I collagen gel has been shown to direct the invasion of neurites and Schwann cells from dorsal root ganglia cultured on the gel surface and, consequently, increases the depth of invasion relative to control collagen gel (highly hydrated collagen matrix). This enhancement has been attributed to the contact guidance response of the growth cones to the aligned collagen fibrils (Dubey et al. 1999). Moreover, magnetically aligned collagen gel filling a collagen nerve guide has been shown to improve peripheral nerve regeneration (Ceballos et al. 1999). In agreement with these concepts, preliminary electron-microscopic studies by our group (Martínez et al. 2009) have shown that, in control ovariectomized rats, collagen fibrils in the ECM surrounding myometrial fibers are highly aligned and

follow the direction of the main axis of the smooth muscle cells (Fig. 10a). This particular collagen alignment might therefore contribute to the particular patterning of growing neurites on myometrial tissue sections (Fig. 10b).

The factors determining the decreased permissiveness of estrogenized myometrium to sympathetic fibers are unknown. In the uterus, major structural and biochemical alterations in the ECM and basal lamina of smooth muscle cells have been shown to occur under the influence of sex hormones (Ross and Klebanoff 1971; Munakata et al. 1984; Cidadão et al. 1990; Borel 1991) and during pregnancy (Nishinaka and Fukuda 1991; Stewart et al. 1995; Slater and Murphy 1999; Shynlova et al. 2004). These alterations in the ECM may therefore affect the receptivity of the uterus to growing axons. In our preliminary electron-microscopic studies, we have observed that, following estrogen treatment of adult OVX rats, the collagen alignment in ECM surrounding the myometrial fibers is different from that in controls. In treated animals, collagen fibrils are mainly oriented perpendicular to the smooth muscle cells long axis (Fig. 10c) and, on occasions, show a random orientation not attributable to the plane of sectioning. Changes in collagen alignment might have a negative impact on the ability of the myometrial sections to support sympathetic neuritic growth. However, the significance of these changes remains to be evaluated. Finally, we should consider that substrate-associated signals might also involve molecules other than those composing the ECM and might include transmembrane and membrane-anchored molecules, plus diffusible factors that, *in vivo*, have been shown to be largely bound to tissues and matrix. Further studies will be required to identify the nature of the substrate-bound signals contributing to the regulated sympathetic neurodegeneration elicited by estrogen in the uterus. The finding that such tissue properties are conserved in tissue section culture method provides an opportunity to study this phenomenon in greater detail.

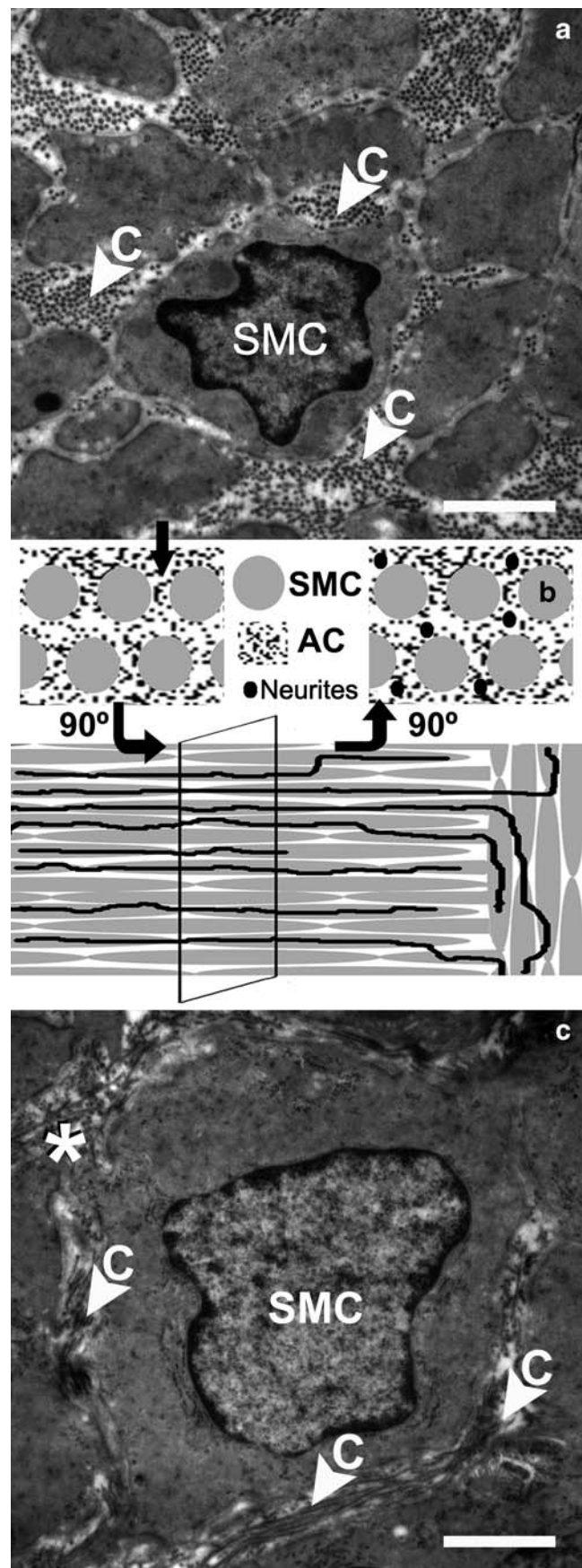


Fig. 10 Alignment of myometrial collagen. Representative conventional transmission electron-microscopic images (glutaraldehyde/osmium tetroxide fixation) of a transverse section of the longitudinal myometrial layer of the rat uterine horn at 3 days following ovariectomy (a) and 10 days following ovariectomy plus estrogen replacement (c). Note that, in controls, collagen fibrils (C) in the extracellular matrix surrounding myometrial smooth muscle cells (SMC) are highly aligned and oriented following the direction of the muscle main axis (represented in b, upper left; AC aligned collagen). This axis is also followed *in vitro* by sympathetic neurites on myometrial tissue sections (represented in b, bottom, upper right). In estrogen-treated animals, collagen fibrils are mainly oriented perpendicular to the smooth muscle cells long axis and, in some regions, show a less aligned distribution (star), which cannot be explained by the plane of sectioning. Bars 2 μm

Acknowledgements Special thanks are extended to Dr. Fernanda Blasina, Lucía Vaamonde, and the staff of the Neurochemistry Department (IIBCE) for their technical assistance and valuable suggestions. The technical support and electron micrographs provided by Gaby Martínez and Patricia Silveira are greatly appreciated. Critical reading of the manuscript by Professor Timothy Cowen and Dr. David Pettigrew is gratefully acknowledged.

References

- Adolfsson PI, Huang I, Berg G, Svensson SPS (2000) Changes in β 2-adrenoceptors expression and in adenylyl cyclase and phosphodiesterase activity in human uterine leiomyomas. *Mol Hum Reprod* 6:835–842
- Akira S, Iwasaki N, Ichikawa M, Mine K, Kuwabara Y, Takeshita T, Tajima H (2009) Successful long-term management of adenomyosis associated with deep thrombosis by low-dose gonadotropin-releasing hormone agonist therapy. *Clin Exp Obstet Gynecol* 36:123–125
- Anaf V, Simon P, Nakadi I, Fay I, Simonart T, Buxant F, Noel JC (2002) Hyperalgesia, nerve infiltration and nerve growth factor expression in deep adenomyotic nodules, peritoneal and ovarian endometriosis. *Hum Reprod* 17:1895–1900
- Anton E, Weskamp G, Reichardt LF, Matthew WD (1994) Nerve growth factor and its low-affinity receptor promotes Schwann cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2795–2799
- Berkley KJ, Dmitrieva N, Curtis KS, Papka RE (2004) Innervation of ectopic endometrium in a rat model of endometriosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11094–11098
- Berkley KJ, McAllister SL, Accius BE, Winnard KP (2007) Endometriosis-induced vaginal hyperalgesia in the rat: effect of oestropause, ovariectomy, and estradiol replacement. *Pain* 132:S150–S159
- Bianchimano P, Richeri A, Blasina F, Vaamonde L, Crutcher K, Brauer MM (2008) Substrate contributes to patterning of uterine sympathetic nerves (abstract). 4th International Meeting of the Latin American Society of Developmental Biology. Buenos Aires, Argentina, p 25
- Borel JP (1991) Uterine collagens. General review. *Rev Fr Gynecol Obstet* 86:715–722
- Brauer MM (2008) Cellular and molecular mechanisms underlying plasticity in uterine sympathetic nerves. *Auton Neurosci* 140:1–16
- Brauer MM, Burnstock G, Thrasivoulou C, Cowen T (1998) In oculo transplants of myometrium from postpartum guinea pigs fail to support sympathetic reinnervation. *J Anat* 193:509–517
- Brauer MM, Chávez R, Llodrá J, Richeri A, Scorza C (2000) Effects of chronic oestrogen treatment are not selective for uterine noradrenaline-containing sympathetic nerves: a transplantation study. *J Anat* 196:347–355
- Brauer MM, Chávez-Genaro R, Richeri A, Viettro L, Frias AI, Burnstock G, Cowen T (2002) The oestrogenized rat myometrium inhibits organotypic sympathetic reinnervation. *Auton Neurosci* 101:13–22
- Chalar C, Richeri A, Viettro L, Chávez-Genaro R, Bianchimano P, Marmol NM, Crutcher K, Burnstock G, Cowen T, Brauer MM (2003) Plasticity in developing rat uterine sensory nerves: the role of NGF and TrkA. *Cell Tissue Res* 314:191–205
- Chávez-Genaro R, Crutcher K, Viettro L, Richeri A, Coirolo N, Burnstock G, Cowen T, Brauer MM (2002) Differential effects of estrogen on developing and mature uterine sympathetic nerves. *Cell Tissue Res* 308:61–73
- Ceballos D, Navarro X, Dubey N, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR, Tranquillo RT (1999) Magnetically aligned collagen gel filling a collagen nerve guide improves peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 158:290–300
- Cidadão AJ, Thorsteinsdóttir S, David-Ferreira JF (1990) Immunocytochemical study of tissue distribution and hormonal control of chondroitin-, dermatan- and keratan sulfates from rodent uterus. *Eur J Cell Biol* 52:105–116
- Covault J, Cunningham JM, Sanes JR (1987) Neurite outgrowth on cryostat tissue sections of innervated and denervated skeletal muscle. *J Cell Biol* 105:2479–2488
- Crutcher KA (1993) Tissue sections as culture substrates: overview and critique. *Hippocampus* 3:157–164
- Crutcher KA, Jayasinghe C, Yun YH, Shanov VN (2009) Progress in the use of aligned carbon nanotubes to support neuronal attachment and directional neurite growth. In: Schulz MJ, Shanov VN (ed) *Nanomedicine materials, devices, and systems*. Artech House, Boston London, pp 187–207
- Damon DH (2006) Vascular endothelial-derived semaphorin 3 inhibits sympathetic axon growth. *Am J Physiol Heart Physiol* 290: H1220–H1225
- Dubey N, Letourneau PC, Tranquillo RT (1999) Guided neurite elongation and Schwann cell invasion into magnetically aligned collagen in simulated peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 158:338–350
- Gavazzi I, Boyle KS, Cowen T (1996) Extracellular matrix molecules influence innervation density in rat cerebral blood vessels. *Brain Res* 734:167–174
- Hill CE, Chamley JH, Burnstock G (1974) Cell surfaces and fibre relationships in sympathetic ganglion cultures: a scanning electron-microscopic study. *J Cell Sci* 14:657–669
- Hou ST, Jiang SX, Smith RA (2008) Permissive and repulsive cues and signaling pathways of axonal outgrowth and regeneration. *Int Rev Cell Mol Biol* 267:125–181
- Houdeau E, Rousseau A, Meusnier C, Prud'homme MJ, Rousseau JP (1998) Sympathetic innervation of the upper and lower regions of the uterus and cervix in the rat has different origins and routes. *J Comp Neurol* 399:403–412
- Hynds DL, Snow DM (2001) Fibronectin and laminin elicit differential behaviors from SH-SY5Y growth cones contacting inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans. *J Neurosci Res* 66:630–642
- Krizsan-Agbas D, Smith PG (2002) Estrogen modulates myometrium-induced sympathetic neurite formation through actions on target and ganglion. *Neuroscience* 114:339–347
- Krizsan-Agbas D, Pedchenko T, Hassan W, Smith PG (2003) Estrogen regulates sympathetic neurite outgrowth by modulating brain-derived neurotrophic factor synthesis and release by the rodent uterus. *Eur J Neurosci* 18:2760–2768
- Krizsan-Agbas D, Pedchenko T, Smith PG (2008) Neurotrimin is an estrogen-regulated determinant of peripheral sympathetic innervation. *J Neurosci Res* 86:3086–3095
- Li GN, Liu J, Hoffman-Kim D (2008) Multi-molecular gradients of permissive and inhibitory cues direct neurite outgrowth. *Ann Biomed Eng* 36:889–904
- Lobos E, Gebhardt C, Kluge A, Spanel-Borowski K (2005) Expression of nerve growth factor (NGF) isoforms in the rat uterus during pregnancy: accumulation of precursor proNGF. *Endocrinology* 146:1922–1929
- Mark K von der, Park J, Bauer S, Schmuki P (2010) Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix. *Cell Tissue Res* 339:131–153
- Martínez G, Silveira P, Bianchimano P, Richeri A, Brauer MM (2009) El estrógeno reduce la capacidad neuritogénica del sustrato uterino. Papel de la geometría del colágeno (abstract). *Sextas Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular, Montevideo, Uruguay*, p 75
- Marzioni D, Tamagnone L, Capparuccia L, Marchini C, Amici A, Todros T, Bischof P, Neidhart S, Grenningloh G, Castellucci M

- (2004) Restricted innervation of uterus and placenta during pregnancy: evidence for a role of the repelling signal semaphorin 3A. *Dev Dyn* 231:839–848
- Medina MG, Lebovic DI (2009) Endometriosis-associated nerve fibers and pain. *Acta Obstet Gynecol Scand* 88:968–975
- Munakata H, Isemura M, Yosizawa Z (1984) Sulfated proteoglycans synthesized in myometrium of the estrogen-treated rabbit. *Tohoku J Exp Med* 144:291–297
- Nishinaka K, Fukuda Y (1991) Changes in extracellular matrix materials in the uterine myometrium of rats during pregnancy and postparturition. *Acta Pathol Jpn* 41:122–132
- Orike N, Thrasivoulou C, Wrigley A, Cowen T (2001) Differential regulation of survival and growth in adult sympathetic neurons: an in vitro study of neurotrophin responsiveness. *J Neurobiol* 47:295–305
- Papka RE, Cotton JP, Traurig HH (1985) Comparative distribution of neuropeptide tyrosine-, vasoactive intestinal polypeptide-, substance P-immunoreactive, acetylcholinesterase-positive and noradrenergic nerves in the reproductive tract of the female rat. *Cell Tissue Res* 242:475–490
- Pettigrew DB, Crutcher KA (1999) White matter of the CNS supports or inhibits neurite outgrowth in vitro depending on geometry. *J Neurosci* 19:8358–8366
- Pettigrew DB, Crutcher KA (2001) Myelin contributes to the parallel orientation of axonal growth on white matter in vitro. *BMC Neurosci* 2:9
- Pettigrew DB, Shockely KP, Crutcher KA (2001) Disruption of spinal cord white matter and sciatic nerve geometry inhibits axonal growth in vitro in the absence of glial scarring. *BMC Neurosci* 2:8
- Quinn M (2007a) Uterine innervation in adenomyosis. *J Obstet Gynaecol* 27:287–291
- Quinn M (2007b) Uterine innervation in fibroids: a qualitative study. *J Obstet Gynaecol* 27:489–492
- Richeri A, Bianchimano P, Mármol NM, Viettro L, Cowen T, Brauer MM (2005) Plasticity in rat uterine sympathetic nerves: the role of TrkA and p75 nerve growth factor receptors. *J Anat* 207:125–134
- Richeri A, Chalar C, Bianchimano P, Greif G, Brauer MM (2008) Estrogen regulation of semaphorin expression in the rat uterus (abstract). *EMBO Workshop Semaphorin Function and Mechanisms of Action*. Abbaye des Vaulx de Cernay, France
- Ross R, Klebanoff SJ (1971) The smooth muscle cell. 1. In vivo synthesis of connective tissue proteins. *J Cell Biol* 50:159–171
- Rydhström H, Walles B, Owman C (1989) Myometrial norepinephrine in human pregnancy—abnormally elevated levels at term related to various disorders leading to Cesarean section. *Am J Reprod Med* 34:901–904
- Shynlova O, Mitchell JA, Tsampalieros A, Langille AL, Lye SJ (2004) Progesterone and gravidity differentially regulate expression of extracellular matrix components in the pregnant rat myometrium. *Biol Reprod* 70:986–992
- Slater M, Murphy CR (1999) Chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans are sequentially expressed in the uterine extracellular matrix during early pregnancy in the rat. *Matrix Biol* 18:125–131
- Snow DM, Smith JD, Gurwell JA (2002) Binding characteristics of chondroitin sulphate proteoglycans and laminin-1, and correlative neurite outgrowth behaviors in standard tissue culture assays. *J Neurobiol* 51:285–301
- Stein K, Ascher-Walsh C (2009) A comprehensive approach to the treatment of uterine leiomyomata. *Mt Sinai J Med* 76:546–556
- Stewart EA, Floor AE, Jain P, Nowak RA (1995) Increased expression of messenger RNA for collagen type I, collagen type II, and fibronectin in myometrium of pregnancy. *Obstet Gynecol* 86:417–422
- Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS (2006) Nerve fibres in peritoneal endometriosis. *Hum Reprod* 21:3001–3007
- Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS (2007) Different types of small nerve fibers in eutopic endometrium and myometrium in women with endometriosis. *Fertil Steril* 88:795–803
- Tuttle R, Matthew WD (1991) An in vitro assay for neurite growth using cryostat sections of nervous tissue as substratum. *J Neurosci Methods* 39:193–202
- Vera PL, Haase EB, Schramm LP (1997) Origins of the sympathetic innervation of the cervical end of the uterus in the rat. *Brain Res* 747:140–143
- Vercellini P, Somigliana E, Viganò P, Abbiati A, Barbara G, Crosignani PG (2009) Endometriosis: current therapies and new pharmacological developments. *Drugs* 69:649–675
- Zoubina EV, Smith PG (2001) Sympathetic hyperinnervation of the uterus in the estrogen receptor alpha knock-out mouse. *Neuroscience* 103:237–244
- Zoubina EV, Fan Q, Smith PG (1998) Variation in uterine innervation during the estrous cycle. *J Comp Neurol* 397:561–571
- Zoubina EV, Mize AL, Alper RH, Smith PG (2001) Acute and chronic oestrogen supplementation decreases uterine sympathetic innervation in ovariectomised adult virgin rats. *Histol Histopathol* 16:989–996