



# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Posgrado en Ciencias Biológicas

Organización tisular del aparato urogenital  
inferior en conejas jóvenes multíparas

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS NATURALES**

P r e s e n t a

Nicte Xelhuantzi Arreguin

Directora  
Dra. Margarita Martínez Gómez

Tlaxcala, Tlax.

Agosto, 2012





# Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Posgrado en Ciencias Biológicas

Organización tisular del aparato urogenital  
inferior en conejas jóvenes multíparas

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS NATURALES**

P r e s e n t a

Nicte Xelhuantzi Arreguin

### **Comité Tutorial**

Directora

Dra. Margarita Martínez Gómez

Tutores

Dr. Jorge Rodríguez Antolín

Dr. Francisco Castelán

Dr. Mario García Lorenzana

Dr. Pablo Pacheco Cabrera

Tlaxcala, Tlax.

Agosto, 2012

La presente tesis se realizó en las instalaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala – Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. En el laboratorio de Fisiología de la Reproducción bajo la dirección de la Dra. Margarita Martínez Gómez.

Se contó con el financiamiento de PAPIIT-UNAM (IN228110-MMG); CONACYT (105882 a MMG) y PROMEP-SEP (UATX-PTC-109 a FC).



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**  
**Secretaría de Investigación Científica y Posgrado**  
**Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta**

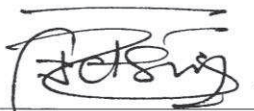


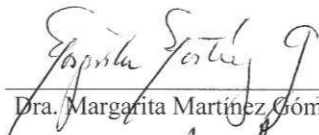
**COORDINACIÓN DEL DOCTORADO**  
**EN CIENCIAS NATURALES**  
**CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA**  
**P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que la estudiante **Nicte Xelhuantzi Arreguin**, realizará para la obtención del grado de **Doctora en Ciencias Naturales**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen profesional correspondiente. El título que llevará es **“Organización tisular del aparato urogenital inferior en conejas jóvenes multíparas”**

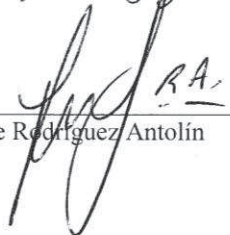
Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
Tlaxcala, Tlax., agosto 6 de 2012

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Francisco Castelán

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Margarita Martínez Gómez

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Estela Cuevas Romero

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Jorge Rodríguez Antolín

  
\_\_\_\_\_  
Dr. René Zempoalteca Ramírez



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



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

## *Agradecimientos*

Al Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, UAT por su apoyo académico durante mi estancia.

A ECOES por la beca de Movilidad Santander-Serfín; CONACYT por la beca de cinco meses otorgada del proyecto 105882 a MMG con número de registro 17459NXA. PAPIIT-UNAM (IN228110-MMG); y al apoyo económico del posgrado del CTBC, UAT.

A mi Directora de tesis Dra. Margarita Martínez Gómez y a mis sinodales Dr. Jorge Rodríguez Antolín, Dr. Francisco Castelán, Dr. Mario García Lorenzana, y al Dr. Pablo Pacheco, por tan acertadas observaciones y sugerencias durante la elaboración de este proyecto.

A la QFB Laura García Rivera y el M en C Iván Bravo Castillo por su asistencia técnica y estadística.

***Agradecimientos a título personal.***

A mi Padre Celestial por haber me dado la oportunidad de lograr una meta más en el gran recorrido de este camino.

A mis padres Adrián Xelhuantzi y B. Cecilia Arreguin por su apoyo incondicional en cada uno de mis pasos. Por soportar tantos malos ratos, prisas y preocupaciones. Gracias por su paciencia, amor y enseñanzas. Por su amor y cuidado a mis peques, estén seguros que si no estuvieran a mi lado no hubiera llegado tan lejos.

A mi hermano por su apoyo incondicional y por alentarme a seguir adelante.

A mi habibi por apoyarme y alentarme en este sueño y por estar con migo incondicionalmente, gracias por tú amor y paciencia en los días difíciles, chuscos y felices.

A mis peques Iván y Samuel por acompañarme y esperarme con amor en todo este tiempo.

A la Dra. Margarita Martínez por sus múltiples observaciones y apoyo para lograr este proyecto. Pero sobre todo por ayudarme avanzar en mi formación personal y académica.

A los Drs. Francisco y Jorge por su apoyo, tiempo y correcciones al realizar este proyecto.

Al Dr. Lorenzana por compartir con migo su gusto por el maravilloso mundo de la histología durante todo este tiempo de conocernos.

A mis nuevos amigos y compañeros del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta por sus comentarios durante los seminarios que fortalecieron este proyecto.

## RESUMEN

La fisiología femenina requiere de la coordinada participación del aparato urogenital, musculatura (pélvica y perineal), e inervación somática y autonómica, que permiten la expresión de procesos reproductivos y la micción. En mujeres diversos factores de riesgo como la edad, multiparidad, número de partos, trauma de parto y la gestación se han asociado con cambios estructurales en la musculatura e inervación periuretral y del piso pélvico. De igual manera dichos cambios estructurales se relacionan con prolapsos viscerales y fallas en los mecanismos de continencia urinaria y fecal. En modelos animales como la rata se ha reportado que el efecto mecánico de la simulación del trauma de parto y el parto, inducen cambios estructurales en el esfínter externo de la uretra y en la pared uretral, no obstante, se descarta la participación del componente hormonal. Considerando que el aparato urogenital y su inervación autonómica no solo se exponen al efecto mecánico de la distensión vaginal durante la expulsión de la cría. Sino que también existe un control hormonal que regula la experiencia reproductiva de una hembra múltipara. El presente proyecto describe en hembras múltiparas la respuesta tisular en el conducto urogenital y su inervación autonómica. Considerando que en condiciones naturales una hembra múltipara ha tenido varias cópulas, gestaciones, partos, lactancias. Nuestros resultados muestran que la multiparidad induce cambios permanentes al reducir la actividad celular del epitelio vaginal, proporción de musculatura (lisa y estriada); colágeno y espesor de la pared del conducto urogenital. En los ganglios paravaginales promueve menor número de neuronas y fascículos nerviosos en los ganglios paravaginales. Estos cambios estructurales en la pared del conducto urogenital inferior e inervación autonómica de la en conejas pueden relacionarse con la presencia de prolapsos de órganos pélvicos y cambios transitorios o permanentes en la micción en mujeres múltiparas. Por lo que nuestros resultados sustentan la hipótesis de que la estructura del aparato urogenital e inervación autonómica son sensibles al efecto mecánico del parto y al efecto hormonal que promueve la gestación, el parto y la lactancia. Efectos característicos de la multiparidad que vencen la plasticidad del canal urogenital y su inervación autonómica.



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Micción y reproducción femenina	7
1.2 Anatomía del aparato urogenital femenino	10
1.2.1 Genitales	10
1.2.2 Órganos urinarios	11
1.3 Inervación del aparato urogenital	13
1.3.1 Vías parasimpáticas sacras	14
1.3.2 Vías simpáticas torácico lumbares	15
1.3.3 Vías eferentes somáticas	15
1.3.4 Inervación vaginal	16
2. ANTECEDENTES	17
2.1 Sensibilidad hormonal	17
2.2 Factores de riesgo	20
2.2.1 Modelos animales	21
2.2.2 La coneja como modelo de estudio	23
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVO GENERAL	27
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
7. METODOLOGÍA	28
7.1 Disección	29
7.2 Histología	29
7.3 Análisis del material	30
7.4 Inervación autonómica paravaginal	31
7.4.1 Histoquímica: Acetilcolinesterasa	32
7.4.2 Inmunohistoquímica	32
7.5 Análisis estadístico	33
8. RESULTADOS	34
8.1 Organización tisular	36

8.1.1	Región uretra distal (UD)	36
8.1.2	Vagina pélvica antes de la desembocadura de la uretra (V1)	42
8.1.3	Vagina pélvica después de la desembocadura de la uretra (V2)	49
8.2	Inervación paravaginal	54
9.	DISCUSIÓN	65
10.	CONCLUSIÓN	70
11.	PERSPECTIVAS	71
12.	REFERENCIAS	72
13.	PUBLICACIONES	84

## 1. INTRODUCCIÓN

La expresión de conductas no reproductivas y reproductivas como la expulsión de orina en diferentes formas y las asociadas a la cópula y el parto, requieren de la coordinada participación del aparato urogenital, musculatura estriada (pélvica y perineal) y su inervación (autonómica y sensorial). El aparato urogenital femenino comprende dos grupos de órganos, los urinarios y los genitales. Los órganos urinarios elaboran, almacenan y eliminan el principal líquido excretado, la orina. Los órganos genitales participan en funciones reproductoras como la cópula y el parto. Algunas especies como la mujer y la rata hembra presentan de forma independiente los conductos urinario y reproductor. Sin embargo, en la mayoría de las especies como por ejemplo la hiena, la gata, la vaca, la perra y la coneja, la uretra desemboca en la vagina a nivel del seno urogenital a partir del cual se forma un sólo conducto que cumple con funciones urinarias y reproductivas.

En mujeres se han relacionado factores de riesgo como la edad, la gestación, el trauma del parto, el número de partos y la menopausia con alteraciones estructurales de la uretra, musculatura del piso pélvico y en su inervación sensorial. Dichas alteraciones se han asociado con daños patológicos como prolapsos viscerales y fallas en los mecanismos de continencia fecal y urinaria (Schüssler y cols. 1994). En mujeres multíparas o menopáusicas las alteraciones en la micción se relacionan con síntomas como pérdidas involuntarias de orina (incontinencia urinaria) al realizar algún esfuerzo como reír, toser o estornudar (Abrams y cols. 2002, Robles 2006, Rocha y cols. 2007). La incontinencia urinaria tienen una prevalencia del 8.5% al 75 % dependiendo de la raza, número de partos y edad. Además es de dos a cuatro veces más común en mujeres que en hombres (Robles 2006).

### 1.1 Micción y reproducción femenina.

La micción es un proceso fisiológico que involucra dos fases fundamentales: la continencia o almacenamiento de orina en la vejiga y la expulsión de la orina a través de la uretra.

La *continencia urinaria* se mantiene por el cierre pasivo de la luz uretral debido a la tensión superficial, tono de la musculatura lisa, la contracción refleja de la musculatura estriada peri uretral y la transmisión de la presión intraabdominal (DeLancey 1988, Elbadawi 1996). En mujeres se ha descrito que el incremento en la presión intraabdominal al realizar

esfuerzos como el reír, estornudar o cargar objetos pesados, genera un aumento considerable en la presión vesical y uretral; a su vez, dicho incremento activa la musculatura del piso pélvico evitando la salida involuntaria de orina a través de la uretra (Klutke y Siegel 1995, Elbadawi 1996, Mostwin 2001).

La *expulsión de orina* es un proceso que tiene como finalidad eliminar sustancias previamente filtradas por el riñón, así como la regulación de líquidos y electrolitos corporales (sodio, potasio, magnesio y calcio), manteniendo el equilibrio ácido-básico (Ganong 2000). El vaciamiento de la vejiga ocurre cuando ésta ha alcanzado su máximo límite de llenado y se contrae, permitiendo que la orina fluya a través de la uretra. El aumento de la presión intravesical se incrementa gradualmente conforme se llena la vejiga (Ganong 2000).

En hembras de mamíferos las hormonas esteroideas ováricas son moduladores de las funciones reproductivas. La vagina es el principal órgano involucrado en la respuesta sexual que se caracteriza por un aumento del flujo sanguíneo genital, sensación y lubricación vaginal que preparan a la hembra para la cópula. Durante la cópula se depositan el semen en el canal vaginal lo más cercano posible al cérvix. Después de la inseminación los espermatozoides se transportan de manera retrograda a través del tracto reproductivo, donde algunos de ellos son fagocitados por leucocitos. Los espermatozoides restantes atraviesan el cérvix, donde se eliminan los espermatozoides con anomalías y no móviles. De tal manera que entren al oviducto solo espermatozoides viables que serán capacitados por el flujo de la mucosa del oviducto. El óvulo se mueve mediante actividad muscular y ciliar del oviducto. Allí encuentra con los espermatozoides que han ascendido a través del útero. En todos los mamíferos la fecundación se lleva a cabo de manera interna. En algunas especies como la vaca, oveja, coneja, primates, perra y gata el eyaculado del macho no llega al cérvix uterino, si no que es depositado en la vagina craneal (Senger 2003). A diferencia de lo que ocurre en especies como los cerdos, caballos y camélidos, donde el semen es depositado directamente en el cérvix, o es lanzado en chorros durante la cópula a través del canal cervical como ocurre en la yegua. El grado en que los espermatozoides se pierden en el tracto reproductivo femenino depende de la naturaleza física del eyaculado y del lugar de deposición seminal. En algunas especies, el plasma seminal contiene proteínas coagulantes que generan tapones conspicuos en el canal

vaginal que previenen la entrada de nuevos espermatozoides. En el ratón y la rata por ejemplo se forma un sólido tapón en la apertura vaginal que es visible después de la cópula.

La gestación es un proceso relativamente largo de aproximadamente 280 días en humanos, que implica una serie de adecuaciones maternas que le permiten proveer de nutrientes y protección al feto durante su desarrollo. El éxito de la gestación puede ser limitado por factores de riesgo como la edad de la madre, el consumo de alcohol y tabaco, embarazos múltiples, obesidad, hemorragias, embarazos consecutivos, talla de la madre y el estado nutricional de la madre. El cuerpo materno sufre una serie de adaptaciones fisiológicas durante los trimestres que dura la gestación para lograr: a) Mantener un ambiente favorable que promueva el desarrollo fetal; b) Prepara el cuerpo de la madre para el parto; y c) Prepara a la madre para el período de lactancia (Senger 2003). El parto es un periodo breve del ciclo reproductor, pero de gran relevancia para la sobrevivencia de la madre y las crías. Se presenta en la hembra gestante a término y se caracteriza por contracciones de la musculatura abdominal y del útero asociadas con la dilatación cervical, que permiten la expulsión de la(s) cría(s) y placenta(s) (Tresguerres 1992), venciendo la resistencia ofrecida por el cuello uterino y la fricción creada en el canal del parto durante el paso del feto. En las últimas semanas de la gestación, el peso y el tamaño del feto incrementan considerablemente. Por lo que, aumenta la presión intraabdominal y distiende la musculatura adyacente a las vísceras pélvicas, rompiendo algunas de sus fibras musculares y nerviosas. Cuando el cuello del útero se dilata totalmente, la fuerza más importante en la expulsión del feto es la presión intraabdominal materna generada por la contracción de músculos abdominales en forma simultánea con esfuerzos respiratorios forzados (Hellman y cols. 1975, Cunningham y cols. 1998). Durante la fase de expulsión del feto, los músculos, fascias y nervios del piso pélvico son expuestos a la distensión por la cabeza del producto hasta la apertura máxima del canal del parto (Figura 1). Esta distensión propicia un decremento en la contracción de la musculatura estriada del piso pélvico, daños en la inervación y en las fascias (Shüssler y cols. 1994).

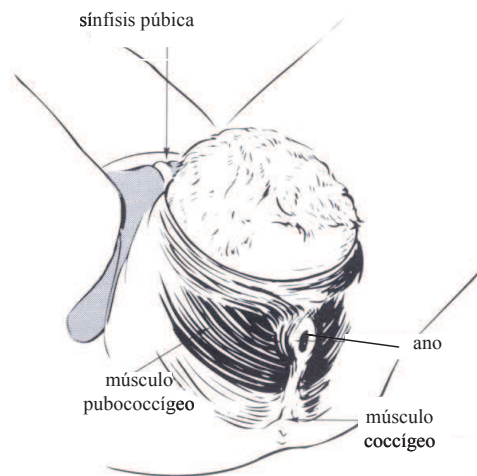


Figura 1. Esquema de la región perineal que ilustra la distensión de las fibras de musculatura estriada adyacente a la apertura vaginal durante la expulsión de la cría (modificada de Schüssler y cols. 1994).

## 1.2 Anatomía del aparato urogenital femenino

El aparato urogenital femenino (AUF) comprende los genitales y órganos urinarios, por su estrecha relación anatómica y origen embrionario. Los genitales son los responsables de garantizar la reproducción. Por su parte, los órganos urinarios constituyen un conjunto de órganos responsables de la eliminación de los residuos metabólicos sulfurados y nitrogenados en la orina.

### 1.2.1 Genitales

Los genitales se dividen en dos grupos internos y externos. Los genitales internos se localizan en las cavidades pélvica y abdominal, comprenden: ovarios, trompas uterinas, útero y vagina. Los externos se localizan en la región perineal e incluyen el monte de Venus, los labios menores, labios mayores, glándulas (vestibulares y parauretrales de Skene's) y el clítoris en la mujer (Quiroz 2004).

La vagina es el receptáculo del pene durante la cópula por lo que la respuesta fisiológica femenina depende de la regulación neuronal vaginal y de la relajación del músculo liso que promueve el flujo sanguíneo y de fluidos vaginales, lubricando la luz vaginal, para facilitar la penetración del pene (Giraldi y cols. 2002). La vagina es un conducto musculo membranoso que se extiende desde el cuello uterino a la vulva, se sitúa por delante del recto,

por detrás de la vejiga y por debajo del cuello uterino. La superficie interna es rugosa, por la presencia de pliegues longitudinales y transversales, formados por cúmulos de tejido elástico que permite al órgano distenderse (Quiroz 2004). Histológicamente, la vagina está constituida por una capa externa formada por tejido conjuntivo; una capa muscular de musculatura lisa y una mucosa de epitelio plano estratificado (Giraldi y cols. 2002, Resplande y cols. 2002, Geneser 2000).

### **1.2.2 Órganos urinarios**

El aparato urinario se aloja en las cavidades abdominal y pélvica. La uretra corre junto a la vagina en las hembras de primates y roedores, sin embargo en la mayoría de las hembras de mamíferos la uretra desemboca directamente en la vagina formando el conducto urogenital que cumple con funciones reproductivas y no reproductivas.

El aparato urinario se divide en superior e inferior. El superior está conformado por riñones y uréteres. Y el inferior por vejiga y uretra. La vejiga está formada por el cuerpo, lugar donde se almacena la orina, y el cuello en forma de embudo que se conecta con la uretra y cuya apertura se localiza por delante y arriba de la apertura vaginal en la mujer (Carr 1998, Geneser 2000) y la rata hembra (Olds y Olds 1979). La uretra es un tubo fibromuscular en el que se distinguen tres capas de la luz hacia la periferia, una mucosa elástica con abundantes pliegues; una submucosa bien desarrollada con un plexo arteriovenoso que cumple un papel importante durante el cierre uretral; por último una muscular constituida por una subcapa interna de fibras longitudinales y una externa de fibras circulares que se condensan y originan un esfínter de fibras lisas, en relación con las fibras estriadas que constituyen el esfínter estriado de la uretra (Huisman 1983, Praud y cols. 2003, Quiroz 2004).

Otras especies como la hiena (Cunha y cols. 2003), la gata (Crouch y Lackey 1969), la perra (Dyce y cols. 1999) y la coneja (Popesko y cols. 1990) sólo tienen un orificio de salida, los aparatos genital y urinario están conectados por la desembocadura de la uretra en la vagina en un punto denominado seno urogenital que cumple con funciones reproductivas como la cópula y el parto y no reproductivas como expulsión de orina (Wake 1992, Figura 2).

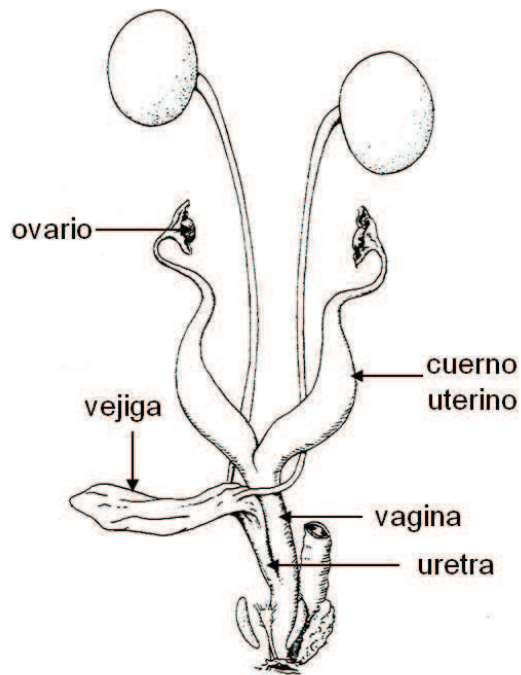


Figura 2. Esquema que ilustra la desembocadura de la uretra en el seno urogenital, formando el conducto urogenital.

El aparato urogenital femenino tiene como sustrato anatómico las áreas pélvica y perineal. Un componente importante del soporte mecánico de dichas regiones es la musculatura estriada, la cual, se ha propuesto que juega un papel importante en la fisiología de la micción, así como en la ejecución de procesos como el parto (Shafik 1993). Por ejemplo, en la coneja el último tercio vaginal está rodeado por desarrollados músculos estriados, cuya contracción muscular es probable coadyuve en la brevedad con que se realiza la cópula y el parto, así también, se ha propuesto que la actividad coordinada de tales músculos facilite la expulsión urinaria en cuatro formas diferentes: chorro, roció, goteo y chisquete (Martínez-Gómez y cols. 2004).



### 1.3 Inervación del aparato urogenital

La respuesta fisiológica del aparato urogenital femenino depende de la regulación neural autonómica. El plexo pélvico desempeña un papel importante en la regulación autonómica de vísceras pélvicas, que incluyen órganos genitales y urinarios. El plexo pélvico está formado por una red de ramas de los nervios sacros parasimpáticos (n. pélvico), n. torácico lumbares simpáticos (n. hipogástrico) y n. sacros somáticos (n. pudendo), así como ganglios inmersos en la red (de Groat 2006, Figura 3). No obstante, la estructura anatómica del plexo pélvico varía dependiendo de la especie. En la mujer, coneja, gata y perra, el plexo forma una densa red de ramas nerviosas y gran número de ganglios incorporados en la red (Langley y Anderson 1896, Li Ming-Zi y Masuko 2001, Imai y cols. 2006), a diferencia de lo que ocurre en el conejillo de indias y la rata donde se restringe a un ganglio de mayor tamaño llamado ganglio pélvico mayor o paracervical (Hondeaun y cols. 1995). Los ganglios pélvicos son mixtos, ya que son ganglios simpáticos-parasimpáticos y proveen la mayor inervación autonómica a los órganos urogenitales (Wanigasekara y cols. 2003).

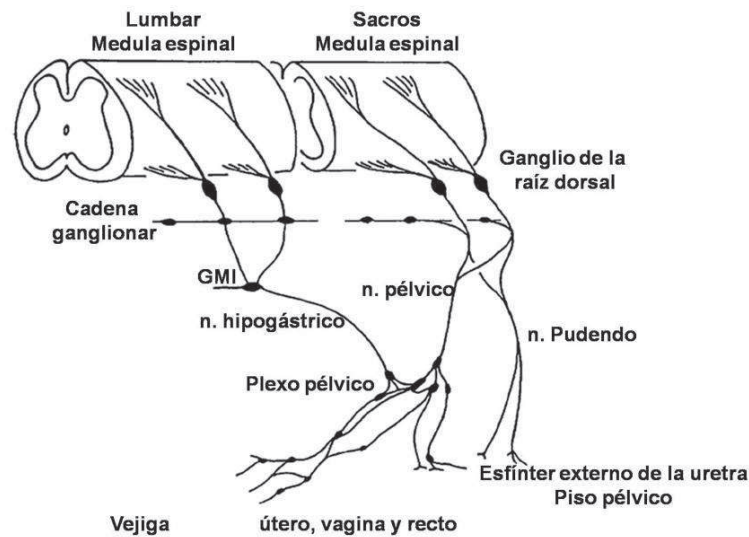


Figura 3. Esquema que ilustra la estructura del plexo pélvico. (Modificado de Groat 2006).

Los ganglios pélvicos proveen la mayoría de las conexiones nerviosas autonómicas a la vejiga, intestino grueso y órganos reproductores (Keast 2006). La inervación vaginal

autonómica se completa con la de los ganglios adosados a la pared vaginal como los paracervicales (Houdeau y cols. 1995) y los paravaginales (Owman y Sjöberg 1966). Por lo que alteraciones en la inervación de este conducto podrían generar trastornos en la fisiología reproductiva y en la micción femenina. En mujeres patologías del aparato urogenital como prolapsos viscerales e incontinencia urinaria se han relacionado con alteraciones estructurales en la inervación del piso pélvico. La incontinencia urinaria se ha asociado con varios factores de riesgo, entre ellos la edad, la multiparidad, la gestación, la deficiencia hormonal, la obesidad y la tos crónica (Bernstein 1997, Hunskaar y cols. 2002).

Procesos como el almacenamiento y eliminación de la orina dependen de la coordinada actividad de la musculatura lisa y estriada en las dos unidades fundamentales del tracto urinario: un reservorio (vejiga) y una salida formada por el cuello de la vejiga, uretra y musculatura estriada del esfínter externo de la uretra (de Groat 2006). La coordinada actividad de estos órganos está regulada por un complejo control neural que se localiza en el cerebro, médula espinal y ganglios periféricos (Fowler y cols. 2008). El almacenamiento o expulsión de orina requiere de la compleja interacción entre vías eferentes somáticas (nervio pudendo) y autonómicas simpáticas (nervio hipogástrico y cadena simpática) y parasimpáticas (nervio pélvico), que viajan a través del plexo pélvico. Las vías simpáticas surgen en los segmentos torácico lumbares de la médula espinal, mientras que las vías parasimpáticas y somáticas se originan en los segmentos sacros de la médula espinal. Las vías aferentes viajan a través de la sinapsis del nervio pudendo en la médula espinal con fibras que llegan hasta el puente de Varolio y o al tálamo (Fowler y cols. 2008).

### **1.3.1 Vías parasimpáticas sacras**

La vía parasimpática sacra provee el mayor impulso excitatorio a la vejiga. Las neuronas pre ganglionares colinérgicas se ubican en la región intermedio lateral de la médula espinal y sus axones viajan a través del nervio pélvico hacia las células ganglionares inmersas en el plexo pélvico y en la pared vesical (Kelly 2007). La transmisión en los ganglios de la pared vesical es mediada por mecanismos colinérgicos nicotínicos, que pueden ser modulados por la activación de receptores muscarínicos, adrenérgicos, purinérgicos y peptídicos (de Groat 2006). Las células ganglionares parasimpáticas liberan acetilcolina (ACh) y noradrenalina que

excitan la musculatura lisa de la vejiga y vagina. La transmisión excitatoria colinérgica en la vejiga es mediada por receptores muscarínicos que son bloqueados por atropina (Andersson y Arner 2004). El impulso inhibitorio de la musculatura lisa uretral es mediado por la liberación de óxido nítrico (NO) por los nervios parasimpáticos (Andersson y Arner 2004; de Groat 2006). Las neuronas postganglionares que inervan a la vejiga contienen neuropeptidos como la vasopresina intestinal polipeptídica (VIP) y el neuropeptido Y (NPY) (Keast y de Groat 1989).

### **1.3.2 Vías simpáticas torácico lumbares**

Las vías simpáticas se originan en los segmentos lumbosacros de la médula espinal, cadena ganglionar y en el ganglio mesentérico inferior (de Groat 2006). Los impulsos de la cadena ganglionar viajan hacia la vejiga por medio de nervios pélvicos, mientras que fibras de los segmentos lumbares y del ganglio mesentérico inferior viajan a través del nervio hipogástrico. Las vías eferentes simpáticas en el hipogástrico y nervios pélvicos obtienen efectos similares en la vejiga. La respuesta vesical consiste: en el relajamiento vesical a través de la inhibición del músculo detrusor vía  $\beta$ -adrenoreceptores; la excitación de la musculatura de cuello vesical y uretra a través de  $\alpha_1$ -adrenoreceptores (Andersson y Arner 2004, de Groat 2006). La inhibición adrenérgica en la transmisión de los ganglios en la vejiga favorece el almacenamiento de la orina cuando la actividad de los nervios parasimpáticos es baja, pero éstos no interfieren durante el vaciamiento cuando la actividad de los nervios parasimpáticos es alta.

### **1.3.3 Vías eferentes somáticas**

La inervación eferente somática de la musculatura estriada uretral se origina en la región ventro lateral de la sustancia gris de la médula espinal (núcleo Onuf's). El axón de las motoneuronas del esfínter externo de la uretra viaja por el nervio pudendo. Excitan a la musculatura estriada del esfínter vía la liberación de acetilcolina, con la estimulación de receptores nicotínicos.

La sensación de llenado de la vejiga viaja a la médula espinal a través del nervio pélvico e hipogástrico. Mientras, el impulso sensorial del cuello de la vejiga y de la uretra se lleva por los nervios pudendo e hipogástrico. Los componentes aferentes de estos nervios

consisten de axones mielinizados (A $\delta$ ) y amielinizados. Las fibras A $\delta$  transmiten la información sobre el llenado vesical y responden a la distensión pasiva y contracción activa. Las fibras amielínicas son insensibles al llenado vesical bajo condiciones fisiológicas normales, pero responden principalmente ante estímulos nocivos de irritación química. Los somas de las fibras A $\delta$  y amielínicas se ubican en el ganglio de la raíz dorsal, en los segmentos espinales S2-S4 y T11-L12 cuyos axones hacen sinapsis con interneuronas involucradas en los reflejos espinales y con neuronas cuyas proyecciones llegan a centros superiores del cerebro involucrados en el control vesical (Fowler y cols. 2008).

#### **1.3.4 Inervación vaginal**

La respuesta sexual femenina promueve la relajación de la musculatura lisa permitiendo el incremento del flujo sanguíneo, la vaso-congestión y secreción de fluidos hacia el lumen vaginal (Giraldi y cols. 2002). En la hembra, el plexo pélvico se caracteriza por neuronas postganglionares simpáticas cortas (noradrenergicas) en ganglios pre- y paravertebrales. Las neuronas noradrenergicas contribuyen a la inervación de órganos reproductivos. La inervación vaginal deriva del plexo pélvico, de ramas del nervio esplácnico y la parte inferior está regulada por el nervio pudendo. Sin embargo el número de terminales nerviosas puede variar dependiendo de la región vaginal (Song y cols. 2009). En mujeres se identificaron células ganglionares simpáticas extramurales en las ramas laterales de los nervios hipogástrico, pélvico, esplácnico pélvico y plexo pélvico que corren a través del tejido conectivo de la pared ventral y lateral de la vagina (paracolpium). En contraste con el concepto clásico de la estructura del plexo pélvico, en la mujer se observa una distribución difusa en la pelvis de ganglios simpáticos y parasimpáticos a diferencia de ganglios grandes (Imai y cols. 2006).

En la gata y la coneja en el plexo pélvico se reconocen filamentos nerviosos que llegan al ganglio uterino, del cual emergen filamentos que corren junto a la arteria vaginal superior hasta los uréteres, cuernos uterinos y el segmento vaginal superior. En el segmento vaginal pélvico se aprecia en el borde dorso-lateral de la pared vaginal un plexo ganglionar inmerso en la red de filamentos nerviosos. Finalmente cercano al último segmento de la vagina solo se aprecia una red de filamentos. El plexo vaginal está formado por ramas sacras del nervio pélvico y ramas lumbares del nervio hipogástrico (Langley y Anderson 1896).

El nervio pudendo se distribuye en la pared de la vagina distal, clítoris y labios menores. Tres de las seis ramas que forman al nervio pudendo llegan a la vagina de manera ipsilateral. Las ramas nerviosas del plexo uterovaginal se ramifican sobre la porción inferior de la vagina (Song y cols. 2009). En mujeres el flujo sanguíneo y lubricación vaginal están modulados por un péptido llamado intestinal vasoactivo (VIP), y su efecto disminuye durante la menopausia (McKenna 2002). En ratas se ha propuesto que la inervación vaginal contiene nervios adrenérgicos, colinérgicos, así como moduladores no-adrenérgicos y no-colinérgicos (NANC)-moduladores/ transmisiones. Muchos nervios contienen más de un neurotransmisor, por ejemplo; óxido nítrico sintetasa (NOS), polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), transportador vesical de acetilcolina (VACHT) y adenil ciclasa pituitaria, polipeptido ciclasa activa (PACAP). Lo cual sugiere que la liberación de estos neurotransmisores modulan la actividad de la musculatura vaginal. Por ejemplo, la L-arginina/sistema NO, no solo juega un papel importante en la regulación del tono de la musculatura lisa vaginal; sino que también afecta el flujo sanguíneo (Giraldi y cols. 2002).

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Sensibilidad hormonal**

La fisiología vaginal es modulada por hormonas reproductivas como los estrógenos. Los estrógenos inducen la proliferación de células epiteliales y el flujo sanguíneo en la pared vaginal (Buchana y cols. 1998). El tejido vaginal presenta abundantes receptores de estrógeno (Mowa y cols. 2000), por lo que la disminución de los niveles de estrógenos en la posmenopausia puede contribuir en la disfunción vaginal, privando las células diana de soporte trófico (Ting y cols. 2004). En mamíferos la vagina está inervada por fibras nerviosas sensoriales, vías parasimpáticas y simpáticas. Los nervios sensoriales y táctiles están presentes dentro del tejido de la dermis y del tejido conjuntivo. Las fibras autonómicas simpáticas y parasimpáticas inervan el músculo liso y la vasculatura vaginal (Giraldi y cols. 2002). Estos nervios juegan un papel importante en la regulación de la sensibilidad vaginal, en la regulación del flujo sanguíneo, secreciones y el tono de la pared vaginal (Berley y cols. 1993, Giuliano y cols. 2002, Munarriz y cols. 2003).

El plexo pélvico muestra una notable sensibilidad a andrógenos y estrógenos, lo que repercute en el desarrollo de estructuras que permiten el dimorfismo sexual, y proporcionan una serie de mecanismos por los cuales la plasticidad de las neuronas pueden modificarse durante la pubertad y la edad adulta (Keast 2006). Estudios inmunohistoquímicos y con trazador retrogrado del ganglio pélvico mayor proponen que las neuronas proyectan sus terminales hacia el colon en su región distal, vejiga y órganos reproductores. Además, existen diferencias y similitudes en el contenido químico de los cuerpos celulares y las terminales nerviosas asociadas a estas neuronas (Keast y de Groat, 1989).

En el tracto urinario también se han reportado abundantes receptores de estrógenos, en particular en la musculatura lisa y el urotelio (Zoubina y Smith 2003). Los estrógenos pueden incrementar el espesor del urotelio y modular la actividad contráctil del músculo liso uretral por el incremento en el número de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos y sensitivos, lo cual regula el tono esfintérico (Levin y cols. 1980). Si bien estos efectos deben mejorar los síntomas de la incontinencia por estrés, estudios epidemiológicos recientes muestran que la terapia de remplazo de estrógenos no muestra beneficios consistentes. Es posible que los estrógenos ejerzan acciones opuestas en otros sitios (Griebing y Nygaard 1997, Zoubina y Smith 2003). En mujeres los ovarios producen la mayoría de los estrógenos circundantes y cuando la función ovárica disminuye, se reducen drásticamente los niveles de estrógenos durante la menopausia. Los estrógenos regulan la actividad epitelial, el espesor y elasticidad de las capas de la pared vaginal (Suckling y cols. 2006). Así, cambios fisiológicos durante la menopausia se relacionan con atrofia de tejidos del tracto urogenital por la deficiencia de estrógenos (Smith 2010). La estimulación del nervio hipogástrico promueve la retención de la orina por la contracción tónica de musculatura lisa del trigono y uretra proximal (Taki y cols. 1999), por lo que factores que alteren la inervación simpática podrían influir en la continencia.

En el útero de roedores se ha propuesto que los estrógenos promueven la supresión de la formación de neuritas y degradación axonal de nervios simpáticos (Zoubina y cols. 2001). La posibilidad de que la función urinaria pueda dañarse se apoya en las observaciones en las que la inervación simpática vesical se reduce en hembras gestantes por los niveles de estrógenos (Zoubina y cols. 2001), además de que la administración de estrógenos reduce la concentración uretral de norepinefrina (Qayyum y cols. 1989).

La uretra proximal de la rata está inervada por un gran número de neuronas que se alojan en la cadena simpática a nivel de T13 a L4 así como de una pequeña contribución de los ganglios pre vertebrales, en particular del ganglio suprarrenal. Cerca del 30% de estas neuronas expresan receptores a estrógenos, por lo que la inervación simpática uretral es un blanco potencial para los estrógenos gonadales. Las variaciones en los niveles de estrógenos durante la menopausia, o como consecuencia del reemplazo de estrógenos, pueden afectar la función del esfínter uretral no solo por tener una acción directa en la musculatura y el urotelino, sino por acciones directas en las neuronas simpáticas (Zoubina y Smith 2003).

En ratas hembras se ha mostrado el ganglio pélvico mayor (MPG) que se ubica de manera lateral a la vagina, presenta diferente número de neuronas en ratas sexualmente maduras. Estudios recientes sugieren que el crecimiento de neuronas adrenérgicas y colinérgicas en el MPG es regulado por niveles de estrógenos. En particular sugieren que el déficit de estrógenos reduce el tamaño del soma de las neuronas en el MPG y que el reemplazo de estrógenos incrementa el tamaño del soma, especialmente el de las neuronas adrenérgicas (Yamaguchi 1998, Purves-Tyson y cols. 2007).

Los estrógenos también regulan la inervación periférica de los órganos reproductivos (Papka y Mowa 2004). En ratas se han identificado receptores de estrógenos vías simpáticas, parasimpáticas y en las proyecciones de las neuronas sensoriales del tracto reproductivo (Zoubina y Smith 2002, Papka y Mowa 2004). Por ejemplo: Un elevado nivel de estrógenos se ha asociado con un incremento de genes relacionados con la inervación en glándulas mamarias (Blacklock y Smith 2004), así como con cambios en los nervios simpáticos del útero (Zoubina y cols. 2001). Por ello es muy probable que los estrógenos modulen la inervación vaginal. Ting y colaboradores (2004) proponen que las hormonas reproductivas además de regular al tejido vaginal también regulan su inervación, lo cual implica que los estrógenos modulan la neuro-plasticidad vaginal. La disfunción vaginal durante la menopausia podría así relacionarse con cambios en la inervación. El incremento de terminales simpáticas en ratas ovariectomizadas puede favorecer la vasoconstricción y sequedad vaginal, mientras que la proliferación de axones sensoriales pueden contribuir a la percepción de dolor, ardor y comezón asociados a la menopausia (Ting y cols. 2004).

## 2.2 Factores de riesgo

En mujeres, alteraciones estructurales del piso pélvico y del tracto urogenital como prolapsos viscerales, se han relacionado con factores de riesgo como la gestación, trauma de parto, edad y deficiencia hormonal. Algunos autores refieren que la obesidad, raza y el fumar pueden también contribuir en los cambios estructurales y funcionales de la uretra y vagina (Tapp y cols. 1988, Skoner y cols. 1994). Durante la gestación la producción de orina se eleva un 25% como resultado del incremento de la perfusión renal y la velocidad de la filtración glomerular. En general se ha propuesto que en este periodo existe un decremento en la producción de la hormona anti diurética (Tooze-Hobson y Cutner 2001). En modelos animales al evaluar el efecto de la gestación sobre la musculatura de la vejiga proponen que la gestación reduce el tono vesical e incrementa la capacidad vesical (Langworth y Brack 1939). Estudios en humanos refieren que existe una disminución en el tono muscular de la vejiga durante el tercer trimestre de gestación y una reducción de la presión intravesical para cualquier volumen vesical. Además que seis semanas postparto el tono vesical se recupera (Tooze-Hobson y Cutner 2001). Sin embargo existen reportes de que algunas mujeres presentan un decremento en la capacidad vesical a pesar de haber recuperado el tono vesical seis meses postparto.

La frecuencia de orinar es uno de los síntomas presentes durante la gestación. Muchas mujeres reportan un incremento en la frecuencia de orinar durante el primer trimestre. Existen reportes de que de un grupo de 400 mujeres el 59.5% experimenta una mayor frecuencia de orinar durante las primeras etapas de la gestación; un 61% en la mitad de la gestación y un 81% al final de la gestación (Tooze-Hobson y Cutner 2001).

La gestación y el parto afectan el piso pélvico por: el incremento de la depresión intra-abdominal, traumatismo directo que inducen daños en el tejido conectivo y nervioso. El entrenamiento muscular del piso pélvico y la dieta balanceada durante la gestación e incluso después del parto pueden reducir la incidencia de incontinencia urinaria a largo plazo (Aukee y Tihtonen 2010). La incontinencia urinaria (IU) es una condición común entre las mujeres. Su etiología es multifactorial, pero la gestación y el parto suelen ser de los principales factores de riesgo, especialmente entre las mujeres jóvenes y de mediana edad (Chiarelli y Brown 1999). Una masa corporal elevada también es un factor de riesgo establecido para la IU. Cabe destacar que la ganancia de peso durante los primeros seis meses de gestación contribuye



significativamente en el desarrollo de IU durante y después de la gestación (D'Alfonso y cols. 2006). Sin embargo se ha reportado que existe una reducción de IU en mujeres obesas cuando pierden peso (Subak y cols. 2009).

En mujeres se ha propuesto que los músculos, nervios, ligamentos y otros órganos del área pélvica pueden ser comprimidos o dañados especialmente si se prolonga la segunda fase del parto o la expulsión de la cría. Durante el parto el piso pélvico es expuesto directamente a la compresión del feto y a la fuerza de expulsión materna afectando los mecanismos de continencia urinaria (Schüssler y cols. 1994, Meyer y cols. 1998). El posible daño en el esfínter externo de la uretra, la musculatura estriada del piso pélvico y su inervación pueden ser un factor considerable para desencadenar la pérdida involuntaria de orina durante el aumento de la presión intrabdominal al realizar algún esfuerzo como toser, reír, así como, para que existan prolapsos viscerales (Allen y cols. 1990, Hale y cols. 1999, Pan y cols. 2009).

### **2.2.1 Modelos animales**

Con el fin de conocer el probable efecto de los factores de riesgo sobre los mecanismos de continencia urinaria, en la rata hembra se han realizado estudios anatómicos, histológicos y fisiológicos del AUI (Cannon y cols. 2002, Kamo y cols. 2003). Estudios que evalúan el efecto del trauma de parto sobre los mecanismos de continencia urinaria reportan que al simular un parto distócico en ratas hembras, la mayoría de éstas presentan incontinencia urinaria, ya que al estornudar se apreciaron gotas de solución salina teñida en la apertura uretral. Además las ratas incontinentes presentaron menor número de fibras musculares lisas y estriadas en la pared uretral vs las continentales (Lin y cols. 1998). También observaron que al simular el trauma de parto más ovariectomía presentaron menor proporción de fibras musculares lisas del cuello vesical, pared uretral y en el esfínter externo uretral vs las ratas vírgenes (Sievert y cols. 2001). Siguiendo con este mismo modelo de simulación del trauma de parto en ratas adultas Damaser y cols. (2005) proponen que la distensión vaginal que ocurre durante el trauma de parto disminuye el flujo sanguíneo y genera hipoxia en vejiga, uretra y vagina.

Rocha y cols. (2007a/b) proponen que en la uretra la gestación y cesárea no inducen cambios en la proporción de músculo liso, colágeno y elastina. A diferencia del parto vaginal

y la simulación del trauma de parto que generan menor proporción de fibras musculares y nerviosas y un incremento de colágeno y elastina en la pared uretral.

Estudios que pretenden evaluar el efecto de la distensión vaginal y cambios en la inervación del piso pélvico (nervio pudendo) sugieren que al existir daños en la inervación durante la distensión vaginal se altera la fisiología uretral (Pan y cols. 2009). Sin embargo en ratas se ha propuesto que durante la gestación existen cambios estructurales en las fibras de musculatura lisa ya que disminuyen significativamente las caveolas del sarcolema en fibras musculares lisas de vejiga y uretra. Además, sugieren que los cambios en las caveolas y en las proteínas de membrana como la caveolin 1 juegan un papel importante en alteraciones funcionales asociadas con la gestación y después del parto (Bakircioglu y cols. 2000).

En 1990 Snooks y colaboradores demostraron que existe una denervación parcial de los músculos del piso pélvico, en particular del nervio pudendo en mujeres con fallas en los mecanismos de continencia urinaria, posiblemente asociado con una segunda fase del parto prolongada. Cabe destacar que las evidencias electrofisiológicas de la denervación persisten cinco años después del parto (Allen y cols. 1990, Snooks y cols. 1990, Handa y cols. 1996, Lien y cols. 2005). Estudios posteriores reportan que el trauma que sufre el nervio pudendo durante el parto incrementa su latencia después del parto pero no durante la gestación. Sugiriendo que la compresión durante el parto es la principal causa del trauma (Sultan y cols. 1994, Tetzschner y cols. 1997).

En mujeres alteraciones en la fisiología vaginal y uretra se asocia con daños en el nervio pudendo, musculatura periuretral y del piso pélvico registrados después del parto vaginal (Snook y cols. 1984). No obstante, los mecanismos precisos por los cuales el parto promueve lesiones en la inervación del piso pélvico siguen siendo poco conocidos. Estudios en ratas proponen que la gestación y la cesárea no inducen alteraciones en la proporción de fibras nerviosas, colágeno, musculatura y colágeno de la uretra. El parto y la simulación del parto vaginal decrecen el número de fibras nerviosas, musculares (Rocha y cols. 2007). Sin embargo, en mujeres se propone que la gestación, el parto y niveles hormonales son determinantes en las alteraciones de la fisiología vaginal y uretral.

Considerando que la experiencia reproductiva de una hembra implica la cópula, gestación, parto y el efecto de los ambientes hormonales que regulan estos procesos,

pretendemos desarrollar un modelo que nos permita conocer la influencia de la multiparidad en la anatomía fina del aparato urogenital inferior y en el control nervioso autónomo de la continencia urinaria.

### **2.2.2 La coneja como modelo de estudio**

La coneja es un animal de laboratorio útil para estudiar la posible relación de factores de riesgo con cambios estructurales en la organización tisular del conducto urogenital. La coneja presenta un conducto urogenital sostenido por músculos estriados de la región pélvica (coccígeo, iliococcígeo y pubococcígeo, obturador externo e interno) y perineal (constrictor vestibular, isquiocavernoso y bulboesponjoso). De acuerdo a su posición anatómica podemos dividir al conducto vaginal en tres regiones: abdominal, pélvica y perineal (Martínez-Gómez y cols. 1997, Cruz y cols. 2002, Figura 4). Esta regionalización es análoga a la ya descrita por otros autores donde se divide al conducto vaginal en anterior, media y posterior (Al-Hijji y cols. 2000, Giraldi y cols. 2002, Oh y cols. 2003). La región abdominal se ubica en la cavidad abdominal y se relaciona con la vejiga y el doble cérvix; la pélvica se encuentra alojada en la cavidad pélvica y es el sitio en el cual la uretra distal desemboca en el seno urogenital rodeado por un plexo venoso; la región perineal o porción protuida se relaciona con la musculatura estriada perineal y con las glándulas inguinales y prepuciales (Martínez-Gómez y cols. 1997).

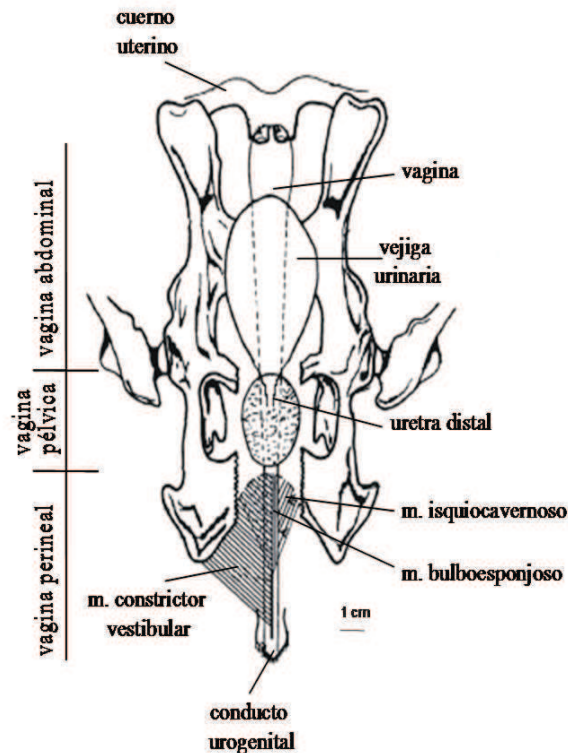


Figura 4. Esquema que ilustra las características anatómicas del aparato urogenital inferior en la coneja. Modificado de Martínez-Gómez y cols. 1997.

En nuestro laboratorio hemos descrito en conejas vírgenes que: 1) presenta cuatro diferentes patrones conductuales de expulsar la orina, chorro, chisguete, goteo y rocío (Corona 2005); 2) su función urinaria (Corona-Quintanilla y cols. 2008), 3) la proporción de fibras musculares rápidas y lentas en músculos pélvicos y perineales asociados con la expresión de procesos fisiológicos como la micción (Fajardo y cols. 2007); 4) el conducto urogenital presenta las cuatro capas típicas de un órgano tubular (mucosa, submucosa, muscular y externa), y que el conducto urogenital presenta una regionalización tisular antes y después de la desembocadura de la uretra en conducto vaginal (Rodríguez-Antolín y cols. 2009).

En conejas multíparas (*vs* las nulíparas) se ha observado que: 1) orinan con mayor frecuencia en forma de goteo (Corona 2005); 2) existen diferencias significativas en algunos patrones urodinámicos como la presión umbral, la presión máxima y el volumen residual (Mendoza 2006); 3) se reduce el área transversal de las fibras de los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso (Fajardo y cols. 2007); 4) existe una mezcla de la submucosa y capa

muscular en la pared uretral y vaginal, 6) hay una reducción del espesor total de la pared del aparato urogenital inferior (Bravo 2006, Xelhuantzi 2006). Es de hacer notar que en el último tercio del conducto urogenital de las hembras multíparas, solo se observa una reducción en la capa epitelial (Bravo 2006). Aunque hay evidencia de cambios debidos a la multiparidad, no se ha discriminado qué elementos del aparato urogenital o de su inervación autonómica se afectan específicamente.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La fisiología femenina requiere de la coordinada participación del aparato urogenital, musculatura estriada (pélvica y perineal), y de la regulación nerviosa somática y autonómica, que permiten la expresión de procesos reproductivos y de la micción.

Considerando que la experiencia reproductiva de una hembra implica claras ventajas en su adecuación, cabe resaltar que también implica ciertas desventajas para la fisiología y anatomía de la hembra relacionadas con el sustrato anatómico de la reproducción y micción. En mujeres adultas se ha mostrado una correlación positiva entre patologías como la incontinencia urinaria y el número de partos vaginales, sugiriendo que el daño uretral y la musculatura estriada pélvica y perineal es irreversible (Delgado y cols. 1971, Thom y cols. 1997). El desarrollo y la persistencia de la incontinencia urinaria por esfuerzo en mujeres multíparas sugiere que el efecto del parto es acumulativo e irreversible (Foldspang y cols. 1992). Las mujeres de cualquier edad tienen un 8.5% de probabilidad de ser incontinentes. Sin embargo, se han reportado en mujeres de 45 a 54 años con más de cuatro partos vaginales problemas de incontinencia urinaria por una inherente debilidad en los mecanismos esfintéricos en la uretra (Bakircioglu y cols. 2000).

Sin embargo, a la fecha no existen estudios que relacionen las alteraciones histológicas del conducto urogenital femenino con la multiparidad. En modelos animales como la rata se ha reportado que el efecto mecánico de la simulación del trauma de parto y el parto, inducen cambios estructurales en el esfínter externo de la uretra y en la pared uretral, no obstante, se descarta la participación del componente hormonal en la regulación de estos cambios estructurales. En nuestro laboratorio hemos observado en conejas multíparas (vs vírgenes) cambios en: 1) la frecuencia de expresión de patrones conductuales de expulsión de orina; 2)

la función urinaria; 3) el área de las fibras de músculos como el pubococcígeo y bulboesponjoso; 4) la organización tisular de la pared del conducto urogenital. A pesar de ello, aún no sabemos cuál es la respuesta de los componentes tisulares del conducto urogenital inferior y de su inervación autonómica en hembras múltiparas.

El aparato urogenital y su inervación autonómica no solo se exponen al efecto mecánico de la distensión vaginal durante la expulsión de la cría, sino que también existe un control hormonal que regula la experiencia reproductiva de una hembra múltipara. Es importante generar un modelo animal que nos permita evaluar el efecto de la multiparidad sobre el sustrato anatómico de la reproducción y la micción que involucre efectos mecánicos durante la cópula y el parto, como los hormonales que regulan procesos como la cópula, gestación, parto y lactancia.

El presente proyecto pretende describir en hembras múltiparas la respuesta tisular en el conducto urogenital y su inervación autonómica. Considera que en condiciones naturales una hembra múltipara ha tenido varias cópulas, gestaciones, partos, lactancias que requieren una regulación hormonal diferente, ello constituye su experiencia reproductiva integral que pudiera tener efectos permanentes.

#### **4. HIPÓTESIS**

- La multiparidad modifica la organización tisular e inervación autonómica de la pared del aparato urogenital inferior de la coneja.
- El efecto de la multiparidad sobre la organización tisular de la pared e inervación autonómica del aparato urogenital inferior de la coneja es permanente.

## **5. OBJETIVO GENERAL**

- Describir el efecto de la multiparidad sobre los tejidos (epitelial, conectivo, muscular) e inervación autonómica de la pared del aparato urogenital inferior femenino.
- Determinar si el efecto de la multiparidad sobre los tejidos (epitelial, conectivo, muscular) e inervación autonómica del aparato urogenital inferior femenino son permanentes.

## 6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En conejas adultas (12 y 18 meses) vírgenes y multíparas

1. Describir la organización de los tejidos epitelial, conectivo, muscular que componen la pared de la uretra distal y vagina pélvica.
2. Describir las características estereológicas del tejido epitelial, conectivo, muscular que componen la pared de la uretra distal y vagina pélvica.
  - 2.1 Determinar el espesor de las capas (epitelial, intermedia y externa) de la pared de la pared uretral y vaginal.
  - 2.2 Determinar la proporción de colágeno, musculatura (lisa y estriada) y vasos sanguíneos en la capa intermedia y externa de la pared uretral y vaginal.
3. Describir la innervación del aparato urogenital a nivel de la desembocadura de la uretra en el conducto vaginal.

En los ganglios paravaginales:

- 3.1 Determinar el número y área que ocupan los ganglios paravaginales.
- 3.2 Determinar el número y área de las neuronas.
- 3.3 Determinar el número y área de los fascículos nerviosos cercanos a los ganglios paravaginales.

## 7. METODOLOGÍA

Se utilizaron conejas adultas (N=32) de la raza chinchilla (*Oryctolagus cuniculus*) de 12 a 18 meses de edad, alojadas en jaulas individuales de acero inoxidable de 50x60x40 cm, con alimento Purina y agua *ad libitum* y en condiciones de bioterio ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ); ciclo 16:8 h de luz: oscuridad.

Las conejas fueron divididas en los siguientes grupos:

Conejas de 12 meses de edad.

Grupo Control: conejas vírgenes (V-12; n=11).

Grupo Multíparas: conejas con cuatro partos consecutivos (M-12; n=9).



Conejas de 18 meses de edad.

Grupo Control: conejas vírgenes (V-18; n=6).

Grupo Multíparas: conejas con cuatro partos consecutivos (M-18; n=6).

Para adquirir la condición de multiparidad se aparearon las hembras en las siguientes 24 horas posparto hasta cumplir cuatro partos consecutivos. El grupo M-12 se sacrificó veinte días posparto y el grupo M-18 seis meses después del cuarto parto para determinar si el efecto de la multiparidad es permanente.

### **7.1 Disección**

Las conejas se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico vía intraperitoneal (20 mg/Kg peso, i.p.). Posteriormente se realizó una incisión sobre la línea media, desde la cavidad abdominal hasta la vagina perineal. Los músculos abdominales y tejido adiposo del área fueron removidos. Después se seccionaron y extrajeron los huesos isquion y pubis, así como los músculos obturadores externo e interno, ligando venas y arterias que irrigan al plexo venoso para evitar hemorragias severas, hasta disecar y remover el aparato urogenital inferior completo.

### **7.2 Histología**

El aparato urogenital inferior de los cuatro grupos se sumergió en una solución de fijador de Bouin Duboscq por 12 horas, posteriormente se delimitaron las tres regiones de interés: UD uretra distal, V1 vagina pélvica antes de la desembocadura de la uretra en la vagina y V2 vagina pélvica posterior a la desembocadura de la uretra en la vagina (Figura 5AB; Rodríguez-Antolín y cols. 2009). Las tres regiones se sumergieron en la misma solución hasta cumplir 24 horas de fijación para deshidratarlas con alcohol etílico en concentraciones ascendentes (70, 80, 96 y 100%), aclararlas en xileno, infiltrarlas e incluirlas en paraplast X-tra, para obtener cortes transversales de 7  $\mu$ m con un micrótomo Leica RM 2135.

Los cortes obtenidos se colectaron en portaobjetos formando series paralelas. Que fueron teñidos con tinciones de rutina como: 1) Hematoxilina-Eosina para caracterizar histológicamente los componentes tisulares de la pared de las regiones de interés, 2) Azul de

Alcian a pH de 2.5 para determinar actividad en las células epiteliales; 3) PAS para determinar tipo de secreción epitelial; 4) Tricrómica de Masson para determinar aspectos histomorfométricos de la capa intermedia y externa de la pared del aparato urogenital inferior, como: En la capa intermedia y externa la proporción de fibras de colágeno, musculatura (lisa y estriada) y vasos sanguíneos. En los ganglios paravaginales el número de ganglios, neuronas y fascículos nerviosos, así como el área que ocupan los ganglios y nervios y área del soma.

### **7.3 Análisis del material**

En todos los grupos se analizaron por individuo diez cortes por región en los puntos equiparables tres-nueve en sentido de las manecillas del reloj (Rodríguez y cols. 2009). Donde los puntos *tres-nueve* se relaciona a los laterales del conducto (ver Figura 5C). Para el análisis de: el espesor de las capas epitelial, intermedia y externa se utilizaron campos a 400 aumentos totales. En la capa intermedia y externa, así como, en los ganglios paravaginales se utilizaron por individuo 20 campos de 330 x 210  $\mu\text{m}^2$  a 100, 200 y 400 aumentos totales por región para medir la proporción de musculatura (lisa y estriada), colágeno y vasos sanguíneos, así como, el número de ganglios, neuronas y fascículos nerviosos, y área que representan los ganglios y nervios por campo, con la ayuda del programa de análisis de imágenes AxioVision Rel 4.6 (Zeiss Software Inc).

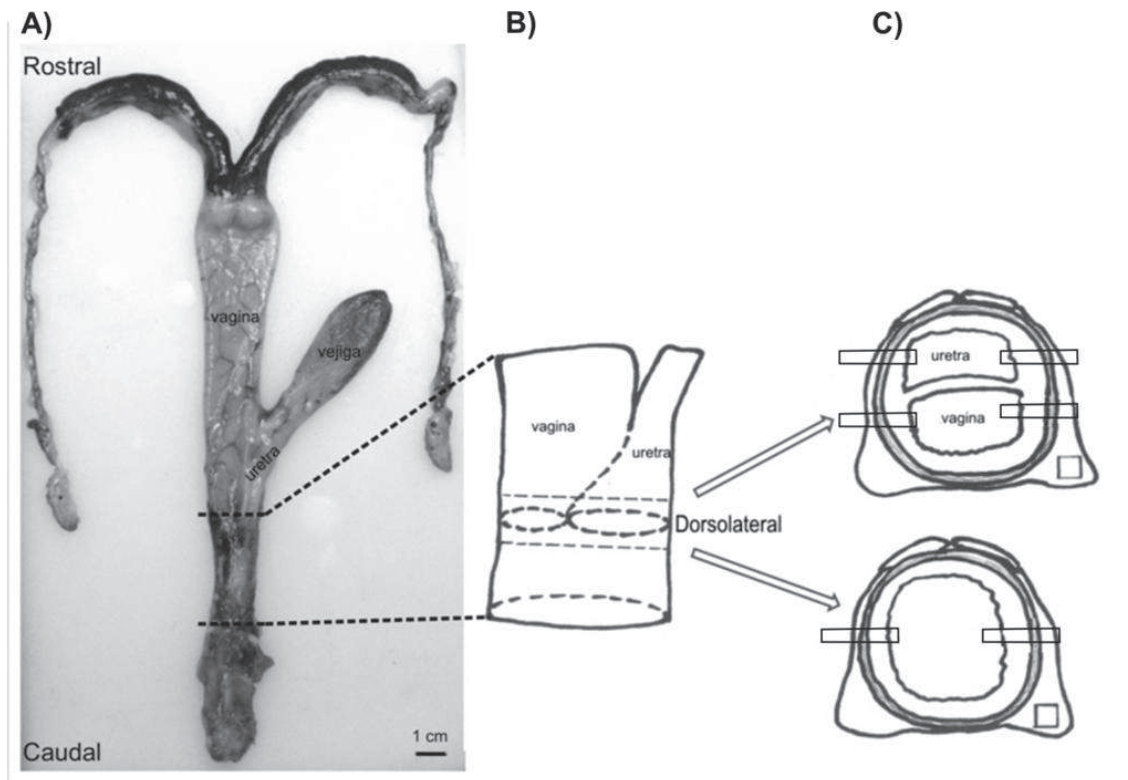


Figura 5. A) Fotografía del aparato reproductor de una coneja V-12; B) Esquema del conducto urogenital donde se ilustran las regiones de interés; C) Esquemas de cortes transversales de UD, V1 y V2 donde se ilustra los sitios de muestreo.

#### 7.4 Inervación autonómica paravaginal

En el seguimiento de la inervación vaginal a nivel de la desembocadura de la uretra en el canal vaginal se utilizaron conejas vírgenes de doce meses de edad (V-12; n=2). Todos los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico vía intraperitoneal (20 mg/Kg peso, i.p). Las conejas fueron fijadas en posición decúbito lateral, para hacer una incisión paralela a la columna vertebral a nivel de los segmentos sacros, para ubicar y seguir los nervios espinales S2 y S3. Los cuales, previamente Martínez y cols. (1997) proponen que inervan a la vagina, vejiga y uretra. Con la ayuda de un microscopio de disección Nikon SMZ-2T se identificaron los nervios pudiendo, pélvico e hipogástrico.

#### **7.4.1 Histoquímica: Acetilcolinesterasa**

El aparato urogenital inferior de conejas V-12 (n=3) fue extraído y fijado en Formalina neutra estabilizada al 10% por 24 horas. Posteriormente de la vagina pélvica se obtuvo la pared vaginal dorsolateral a nivel de la desembocadura de la uretra, para sumergirlo en una solución crioprotectora de sacarosa del 10 al 30% durante tres días (con cambios de 24 hrs).

Se obtuvieron cortes por congelación en un Criostato LEICA CM 1850, con dirección longitudinal de lado derecho y para sagitales del lado izquierdo del canal vaginal, en series paralelas con un espesor de 14  $\mu\text{m}$ . Los cortes se lavaron con PB (3 lavados de 5 min.) e incubaron con una solución de acetylthiocholine iodide minimum 98% TLC SIGMA por una hora y media. Posteriormente se lavaron con PB (tres lavados de 5 min), se deshidrataron en alcohol etílico en concentración ascendente y aclararon en xileno para montarlos con medio de montaje (Cytoseal 60).

En los cortes longitudinales del lado derecho se estimó el volumen de los ganglios paravaginales mediante el método de cavalieri.

#### **7.4.2 Inmunohistoquímica**

Para determinar la sensibilidad hormonal de los tejidos del aparato urogenital se marcaron los dos subtipos de receptores a estrógenos (alfa y beta). En los ganglios paravaginales con la finalidad de determinar la naturaleza química de las células se marco la enzima tirosina hidroxilasa (TH; enzima que participa en la síntesis de adrenalina, marcador de neuronas simpáticas), y la enzima colina-acetil transferasa (ChAT; que participa en la síntesis de acetilcolina; marcador de neuronas parasimpáticas). Y con el fin de reconocer la identidad neuronal de las células inmunoreactivas anti-TH y anti-ChAT se identificó un anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina III (Tuj1) específico de neuronas.

Se utilizaron cortes transversales (7  $\mu\text{m}$ ) obtenidos en un micrótopo Leica (RM2135). Los cuales se desparafinaron con xileno e hidrataron en alcoholes en concentración descendente. Para recuperar los antígenos las laminillas se colocaron en citrato de sodio 10 mM con un pH 6 a 4 °C (por una noche para Tuj 1, TH, y ChAT y 3 noches para receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$ ). Posteriormente se sometieron a microondas por 5 min a 90 °C. Después se hicieron tres lavados con PBS (10 minutos c/u). Con el fin de bloquear las peroxidasas

endógenas, los cortes se incubaron con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en PBS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  7.6 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  2.66 Mm y  $\text{NaCl}$  0.15M, pH 7.4) durante 30 min. Los cortes fueron lavados (2 lavados con PBS y 1 con PBS-triton; 10 min c/u). El bloqueo de uniones inespecíficas se hizo con una solución de suero normal al 5% (de cabra (NGS) para Tuj 1, TH y receptores de estrógenos y suero de burro para ChAT) en PBS/triton por 1 h. El anticuerpo primario: anti-beta tubulin III from Abcam, ab 14545, Abcam, 1:2000); anti-ChAT (ChAT; MAB 305, Millipore; 1:2000); anti-TH (TH; ab111; Abcam, 1:250); anti-receptores de estrógenos subtipos alfa ( $\text{ER}\alpha$ ; NB 120-19349, Novus Biologicals, 1:250); y beta ( $\text{ER}\beta$ ; NR200-305, Novus, Biologicals; 1:250) fueron incubados en una cámara húmeda a 4 °C una noche (tres noches los receptores de estrógenos). Después del anticuerpo primario, los tejidos fueron lavados e incubados con el segundo anticuerpo (1:200; anti-IgG de ratón hecho en cabra y biotilado, para Tuj 1, TH y receptores de estrógenos; 1:2000 anti donkey para ChAT) en una cámara húmeda por 2 h a temperatura ambiente y lavados en PBS. El complejo ABC (avidin-biotin-horseradish peroxidase; ABC) fue aplicado por 1 h en cámara húmeda. Después de dos lavados con PBS/triton y un lavado con PBS (10 min c/u), la diaminobenzidina fue preparada de acuerdo a las instrucciones del kit (Vector SK-4100), para usarla por 5 a 20 min para la visualización de células inmunoreactivas. La reacción se detuvo haciendo varios lavados con PBS 0.1 M. Al término de la inmunohistoquímica los cortes fueron deshidratados en alcoholes de 60, 80, 96 y 100%, aclarados con una solución de etanol-xileno y xileno. Las preparaciones fueron cubiertas con medio de montaje (Cytoseal 60).

### **7.5 Análisis estadístico**

Se utilizó un análisis de varianza bifactorial anidado con un nivel de significancia a una  $p=0.05$  para determinar diferencias en el espesor (capas y de la pared), proporción (colágeno, musculatura y vasos sanguíneos), así como, el número y área (ganglios, fascículos nerviosos y neuronas) entre grupos. Se consideraron para el diseño dos factores independientes condición (vírgenes y multíparas) y edad (doce y dieciocho meses) de efectos fijos, un factor anidado (hembras) en la interacción entre condición y edad para evitar el efecto de las pseudo-réplicas y como variable de respuesta espesor de las capas y de la pared ( $\mu\text{m}$ ), proporción y área ( $\mu\text{m}^2$ ),

así como el número de ganglios, neuronas y fascículos nerviosos (Zar 1999, Quinn y Keough 2002).

El análisis se hizo con la ayuda de los programas de cómputo JMP versión 3.2.2 y Graph Pad Prism 5. En todos los casos se graficaron medias  $\pm$  error estándar.

## 8. RESULTADOS

El peso de las conejas disminuye considerablemente en las M-12 como consecuencia de la multiparidad. Sin embargo a pesar de cierta recuperación en las M-18. Su peso es menor al de las hembras V-18. En la longitud de la vagina pélvica no se aprecian diferencias significativas entre condiciones. En el número de las crías durante los cuatro partos no observamos diferencias, pero el peso fue mayor en las M-18 (ver tabla 1).

(media $\pm$ e.e)	V-12 (n=6)	M-12 (n=6)	V-18 (n=6)	M-18 (n=6)
<b>Peso (Kg)</b>	4.03 $\pm$ 0.21a	3.831 $\pm$ 0.30a	4.983 $\pm$ 0.12b	4.42 $\pm$ 0.12c
<b>Longitud (cm)</b>	3.59 $\pm$ 0.19	3.08 $\pm$ 0.31	3.34 $\pm$ 0.11	3.44 $\pm$ 0.14
<b>Núm. Crías</b>	-----	7 2 -10	-----	7 2 -11
<b>Peso crías (grs)</b>	-----	52.26 23 -108	-----	60.64 * 38 – 88 g

Tabla 1. Peso y Número de crías. Se representan la media  $\pm$  error estándar. Las letras representan diferencias significativas  $p=0.05$  con una ANOVA con una prueba post hoc de Tukey Kramer. El asterisco representa diferencias a  $p=0.05$  con una t Studen.

En las conejas vírgenes las paredes de la vagina pélvica y uretra distal se compone de cuatro capas, de luz hacia la periferia; la mucosa (epitelio, más lámina propia), la submucosa, la capa de músculo liso, y la externa (de fibra estriada, más tejido conectivo). Las conejas múltiparas mostraron una mezcla de los componentes de la lámina propia, submucosa y capa muscular por lo que sólo se delimitan tres capas: la epitelial, intermedia (formado por lámina propia, submucosa y la capa de músculo liso), y la externa.

Debido a que tres conejas del grupo de las múltiparas murieron por una fuerte hemorragia después de sufrir de prolapso de los cuernos útero y la vagina en el cuarto parto (Figura 6), el número de animales en este grupo se redujo a seis por cada uno (M-12 y M-18).



Figura 6. Fotomicrografías que muestran prolapso de los cuernos uterinos en el canal vaginal después del cuarto parto.

## 8.1 Organización tisular

### 8.1.1 Región Uretra distal (UD)

En conejas Virgen de doce meses (V-12)

La uretra es un tubo fibromuscular delimitada de la luz hacia la periferia por: La **mucosa** formada por pliegues transversales de epitelio estratificado plano con escasa secreción de mucinas sulfatadas, por debajo del epitelio se ubica la lámina propia de tejido conectivo denso irregular acidófilo (Figura 7/a); La **submucosa** constituida de tejido conectivo fibroso acidófilo, abundantes capilares, vénulas y arteriolas; La **muscular** de pequeños paquetes de fibras musculares lisas. Estos paquetes de musculatura están mezclados con fibras de colágeno y elastina en dirección aleatoria), entre los paquetes musculares se observaron vénulas y arteriolas (Figura 7/b); Por último, la **capa externa** de tejido conectivo denso irregular, un desarrollado plexo venoso, así como, de una fina capa de musculatura estriada cuyas fibras se orientan de forma circular (Figura 7/c).

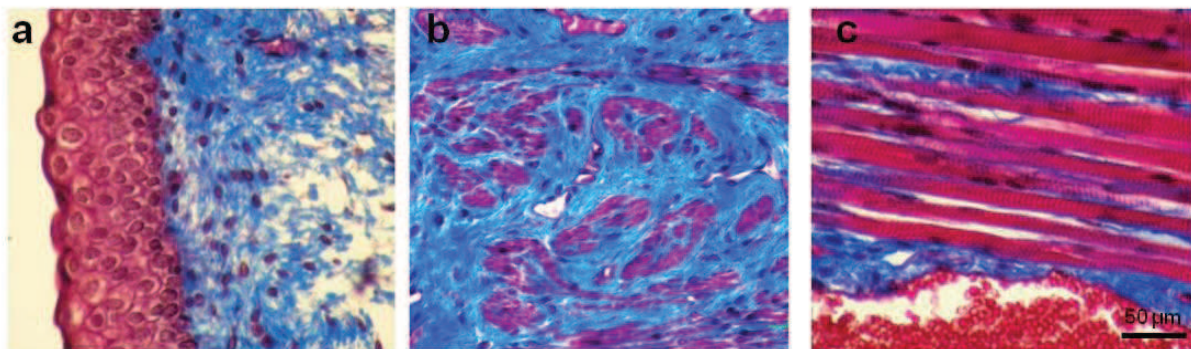


Figura 7. Fotomicrografías de la pared uretral de una coneja virgen. a) Mucosa; b) muscular y c) externa. Teñidas con Tricrómica de Masson a 400X aumentos originales.

En conejas Multíparas veinte días postparto (M-12).

En este grupo **la mucosa** forma pliegues poco pronunciados, con epitelio estratificado plano de menor número de estratos celulares y citoplasma reducido (Figura 8/a). Dado que la lámina propia y las capas **submucosa** y **muscular** presentaron una mezcla de sus componentes tisulares, se agruparon en una sola capa que de ahora en adelante llamaremos capa **intermedia**, constituida por tejido conectivo fibroso, abundantes capilares, vénulas, arteriolas y paquetes de musculatura lisa dispersos orientados de forma circular y longitudinal (Figura



8/b). Además en esta capa se aprecia una infiltración de leucocitos, neutrofilos y macrófagos como respuesta a un proceso inflamatorio; Por último, la **capa externa** constituida de la misma forma que las vírgenes, pero con hipertrofia en las fibras de musculatura estriada (Figura 8/c).

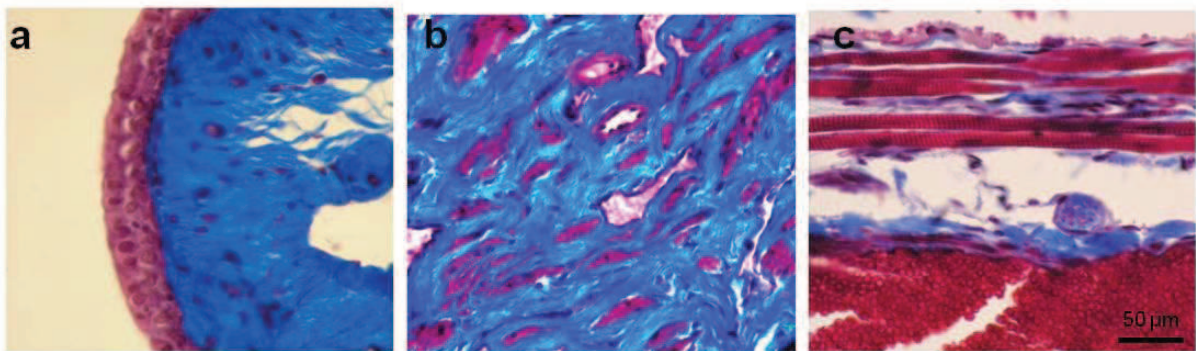


Figura 8. Fotomicrografías de la pared uretral de una coneja múltipara. a) Mucosa; b) intermedia y c) externa. Teñidas con Tricrómica de Masson a 400X aumentos originales.

Las conejas V-18 y las M-18) presentan la misma organización en tres capas (epitelial, intermedia y externa) de la pared uretral que las conejas M-12. El análisis estereológico de la **capa epitelial** mostro que en la capa epitelial de UD se observa como el número de estratos celulares se recupera sin importar la condición (Figura 9 y 10). Por lo que sólo M-12 presenta menor espesor de la capa epitelial. El espesor de las capas mostro que a pesar de existir una reducción en las M-12 esta se recupera seis meses después en las M-18 ( $F=18.3125$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ). La capa intermedia disminuye significativamente en las conejas de dieciocho meses ( $F=24.0468$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ). La capa externa disminuye en las M-12, pero se recupera seis meses después en las M-18 ( $F=36.8446$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ). En el espesor total de la pared uretral solo disminuye en las M-12 pero se recupera seis meses después en las M-18 ( $F=32.2093$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ; Figura 10).

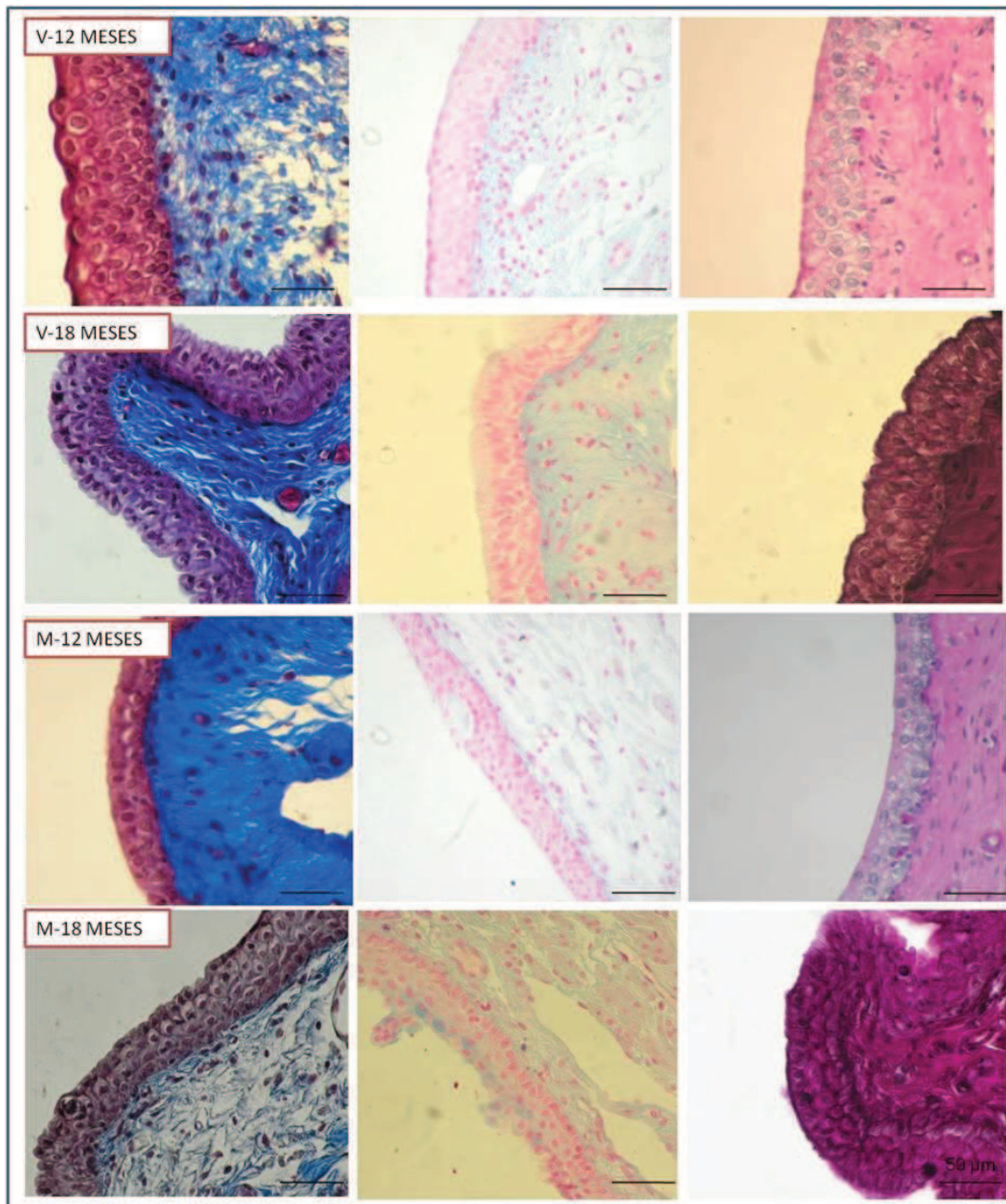


Figura 9. Fotomicrografías de la mucosa de UD, V2. Donde se aprecia la actividad epitelial. Teñidas con Tricrómica de Masson, Azul de Alcian a pH de 2.5 y PAS, a 400X aumentos originales.

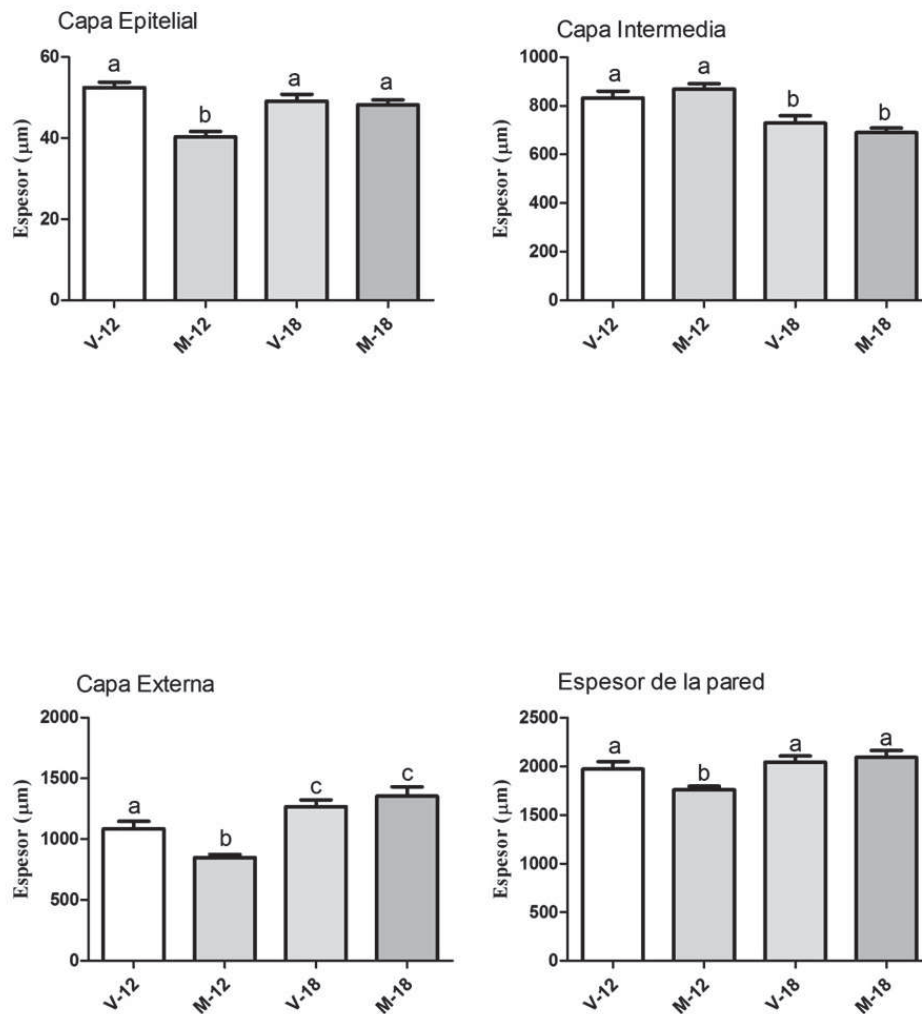


Figura 10. Gráficas que ilustran el espesor de las capas epitelial, intermedia y externa, así como de la pared uretral. Las barras representan la media y las líneas los error estándar. Las letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.0001$ ).

En la capa intermedia se observa como la multiparidad reduce significativamente la proporción de musculatura lisa, y que a pesar de existir cierta recuperación no es suficiente para igualar a V-18 ( $F=40.9994$ ;  $P < 0.0001$ ;  $N=24$ ), y el colágeno incrementa en las M-12 y conejas de dieciocho meses ( $F=28.0256$ ;  $P < 0.0001$ ;  $N=24$ ). Además de un incremento significativo en proporción de sinusoides en la capa intermedia en las conejas V-18 y M-18 ( $F=67.7624$ ;  $P < 0.0001$ ;  $N=24$ ; Figura 11).

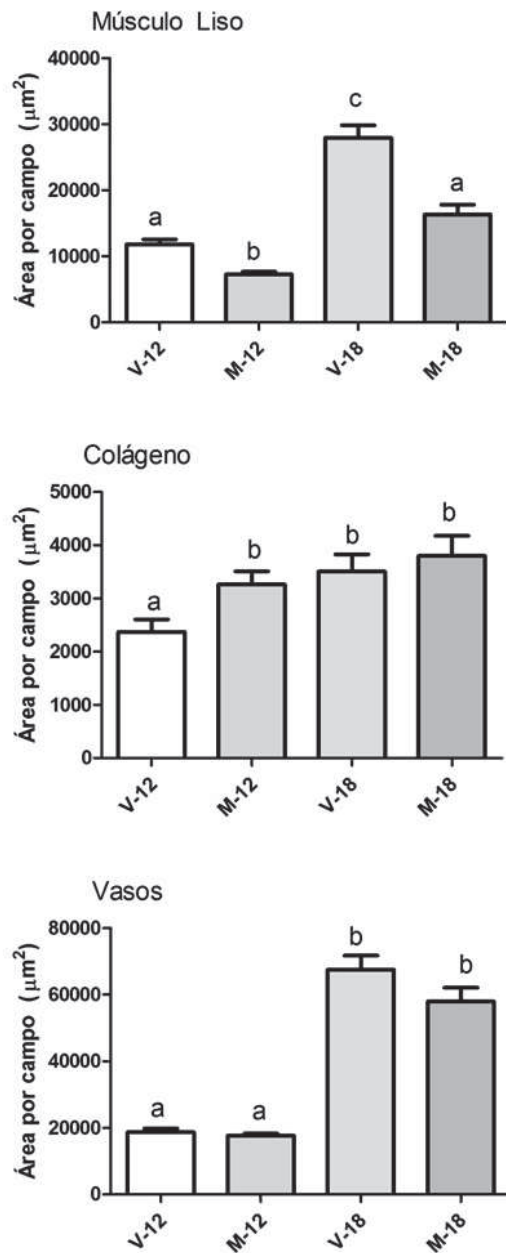


Figura 11. Gráficas de la concentración de musculatura lisa, colágeno y vasos sanguíneos en la capa intermedia. Las barras representan la media y las líneas los error estándar. Las letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.0001$ ).

En la capa externa se aprecia que veinte días postparto disminuye significativamente la musculatura estriada y que a pesar de que existe cierta recuperación en la proporción de musculatura ésta no es igual a la de las conejas V-18 ( $F=129.2438$ ;  $P < 0.0001$ ;  $N=24$ ). La

proporción de colágeno es mayor en hembras de dieciocho meses ( $F=33.3293$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ). Pero existe un incremento significativo del plexo venoso en las V-18 y sobre todo en las M18 ( $F=80.3735$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ; Figura 12).

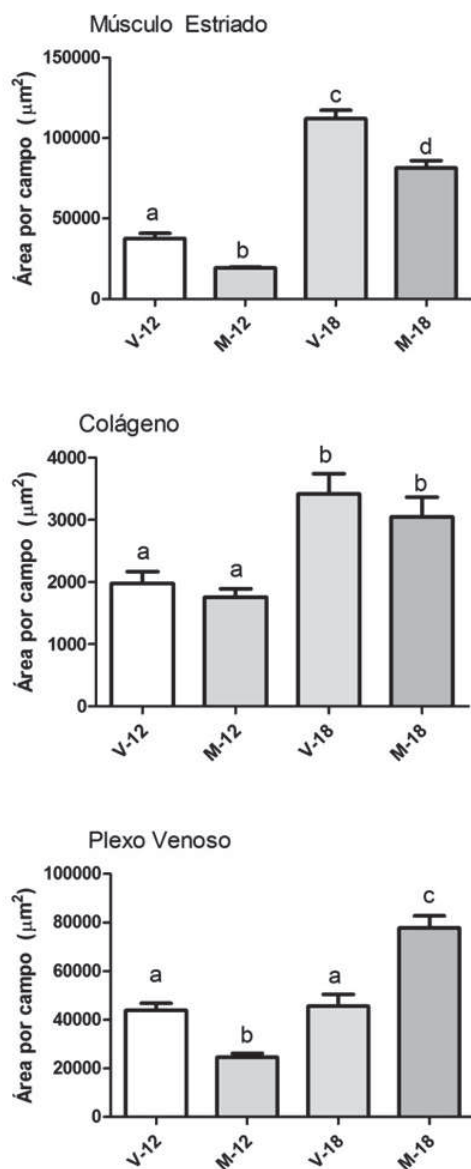


Figura 12. Gráficas de la concentración de musculatura estriada, colágeno y plexo venoso en la capa externa. Las barras representan la media y las líneas los error estándar. Las letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p<0.0001$ ).

### 8.1.2 Vagina pélvica antes de la desembocadura de la uretra (V1)

En conejas Virgen de doce meses (V-12).

La pared de V1 presenta una **mucosa** con pliegues transversales de epitelio pseudoestratificado cilíndrico con actividad secretora diferencial (Figura 13/a). En el estrato epitelial se aprecian células caliciformes intercaladas. En la porción apical de las células se aprecia distendida por las gotas de mucina no sulfatadas (75% hidratos de carbono y 25% de proteínas) que al ser vertidas a la luz vaginal captan el agua y forman el moco característico de la secreción vaginal. Además de células con secreción serosa rica en glucógeno. También observamos un marcaje positivo a receptores de estrógenos de los dos subtipos ( $\alpha$  y  $\beta$ ), lo cual nos sugiere su sensibilidad estrógena. En la base del epitelio se identificó la lámina propia compuesta de tejido conectivo denso irregular acidófilo; una **submucosa** de tejido conectivo fibroso acidófilo, abundantes capilares, vénulas, venas y arteriolas; así como una **muscular** de pequeños paquetes de fibras de músculo liso entremezcladas (circulares y longitudinales) con fibras de tejido conectivo, vasos, vénulas y arteriolas (Figura 13/b); Por último, una capa externa formada por un plexo venoso intercalado con una fina capa de musculatura estriada y fibras de colágeno (Figura 13/c).

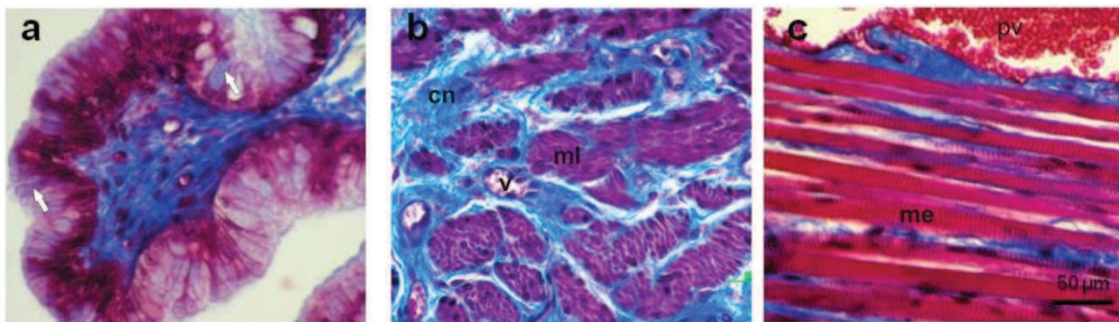


Figura 13. Fotomicrografías de la pared vaginal de una coneja virgen. a) Mucosa; b) muscular y c) externa. Teñidas con Tricrómica de Masson a 400X aumentos originales. (flechas) células caliciformes; (cn) colágeno; (ml) músculo liso;(v) vasos sanguíneos; (me) músculo estriado; (pv) plexo venoso.

En conejas Multíparas veinte días postparto (M-12).

A diferencia de las conejas V-12, en la pared vaginal anterior a la desembocadura de la uretra en la vagina (V1), la **mucosa** forma pequeños pliegues transversales y está constituida de epitelio pseudoestratificado cilíndrico con escaso citoplasma, con una evidente reducción en la actividad epitelial (Figura 14/a). El límite entre la lámina propia y las capas submucosa y muscular es confuso, pues se aprecia una mezcla entre sus componentes celulares, los cuales constituyen lo que hemos denominado capa **intermedia**, en la que se observó menor proporción de musculatura lisa, así como un incremento de tejido conectivo (Figura 14/b).

En la capa intermedia se aprecia infiltración de leucocitos, neutrófilos y macrófagos como respuesta a un proceso inflamatorio. Por último en la **capa externa** se aprecian fibras musculares con hipertrofia ya que las células musculares aumentaron significativamente su diámetro (Figura 14/c).

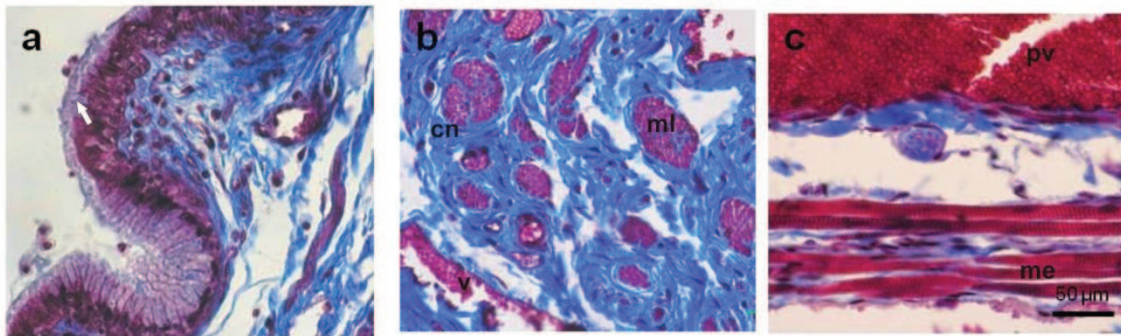


Figura 14. Fotomicrografías de la pared vaginal de una coneja múltipara. a) Mucosa; b) intermedia y c) externa. Teñidas con Trirómica de Masson a 400X aumentos originales. (flechas) células caliciformes; (cn) colágeno; (ml) músculo liso;(v) vasos sanguíneos; (me) músculo estriado; (pv) plexo venoso.

Las conejas vírgenes de 18 meses (V-18) y las conejas múltiparas de 18 meses (M-18) presentan la misma organización en tres capas (epitelial, intermedia y externa) de la pared vaginal antes de la desembocadura de la uretra en el canal vaginal (V1) que las conejas M-12. Sin embargo en la capa epitelial se observa una reducción significativa en la actividad epitelial en las conejas M-12, la cual se recupera en las M-18, así como un incremento en el marcaje de receptores de estrógenos del subtipo  $\beta$ , (Figura 15 y 16).

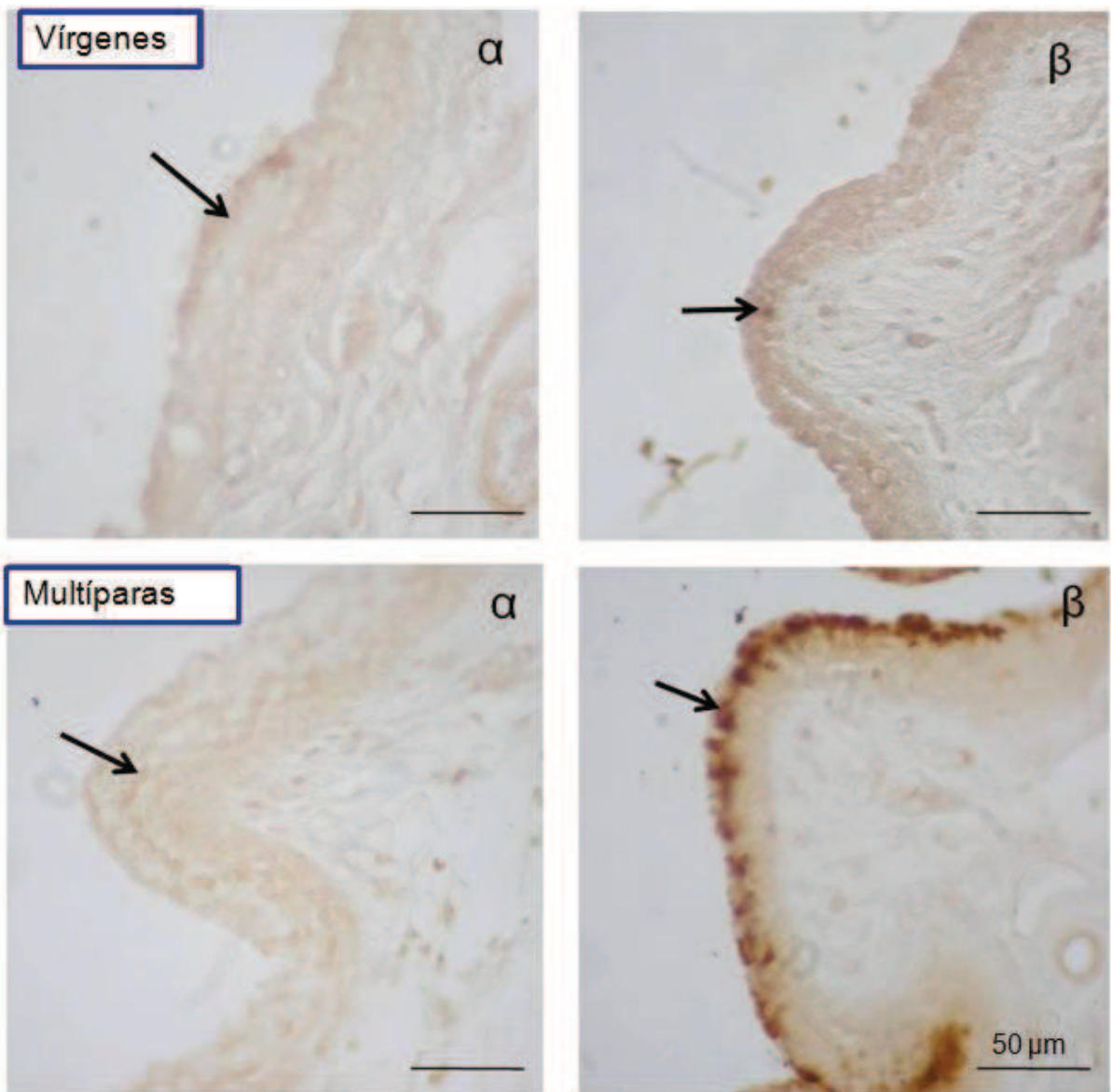


Figura 15. Fotomicrografías de la capa epitelial. Anti- receptores de estrógenos de los subtipos  $\alpha$  y  $\beta$  a 400X aumentos originales. (flechas) células con marcaje positivo.



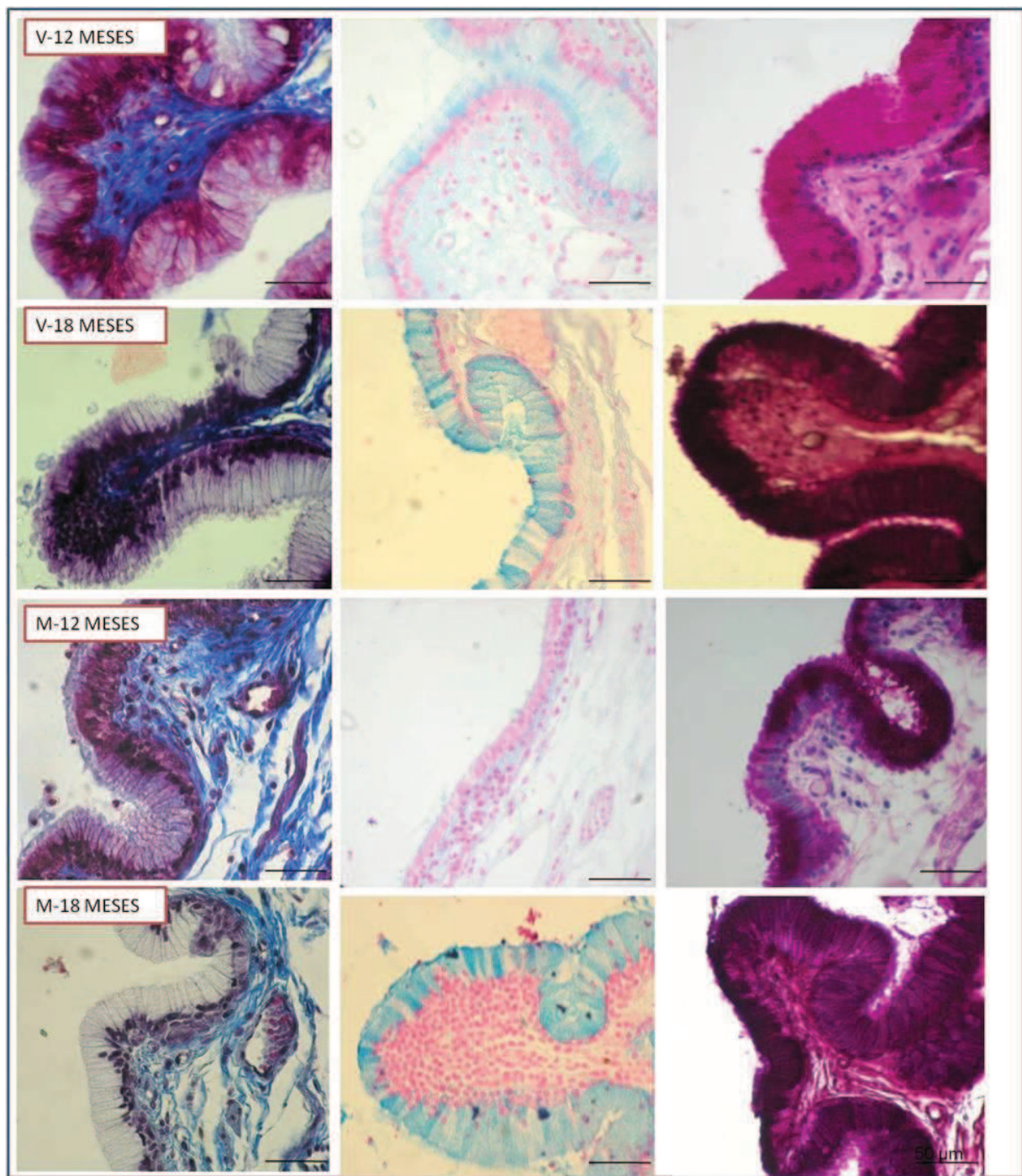


Figura 16. Fotomicrografías de la mucosa de V1. Donde se aprecia la actividad epitelial. Teñidas con Tricrómica de Masson, Azul de Alcian a pH de 2.5 y PAS, a 400X aumentos originales.

En el espesor de las capas se aprecia que la capa epitelial disminuye considerablemente en las M-12 y a pesar de cierta recuperación en las M-18 no es suficiente para igualar a las V-18 ( $F=18.7057$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ). En la capa intermedia existe un incremento de su espesor

en las V-18 ( $F=42.9625$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ). En la capa externa disminuye significativamente en las M-12 y a pesar de existir cierta recuperación en las M-18 ( $F=47.4175$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ), el espesor de la pared es menor en las conejas múltiparas ( $F=47.4544$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ; Figura 17).

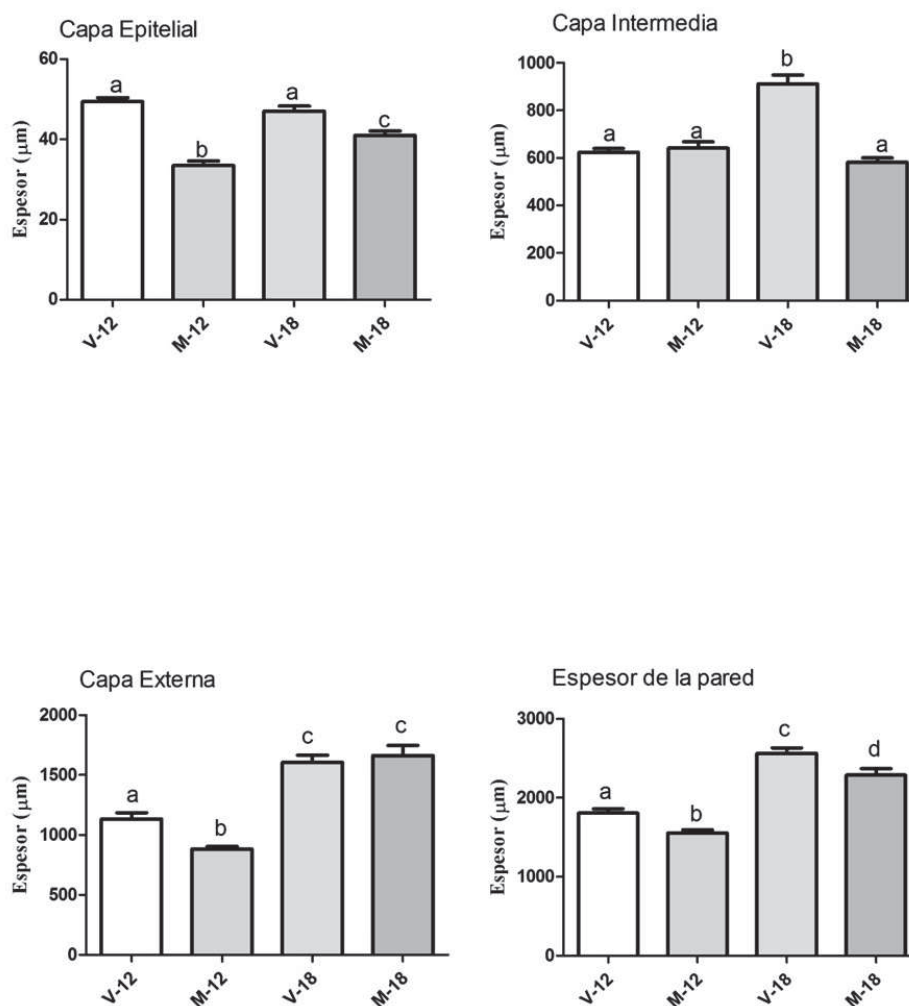


Figura 17. Gráficas que ilustran el espesor de las capas epitelial, intermedia y externa, así como de la pared vaginal. Las barras representan la media y las líneas los error estándar. Las letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p<0.0001$ ).

En la capa intermedia se aprecia una reducción significativa de la proporción de musculatura lisa en M-12. Sin embargo a pesar de existir una recuperación de musculatura lisa seis meses después del último parto ésta es menor a la de las conejas V-18 ( $F=59.4304$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ). En la proporción de colágeno no hay diferencias entre M-12 y V-12, pero a

pesar de incrementar en M-18 no es suficiente para igualar a V-18 ( $F=55.84$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ). En la capa intermedia se observa un incremento significativo en la presencia de sinusoides inmersos en la capa en las conejas V-18 y M-18 ( $F=87.4842$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ; Figura 18).

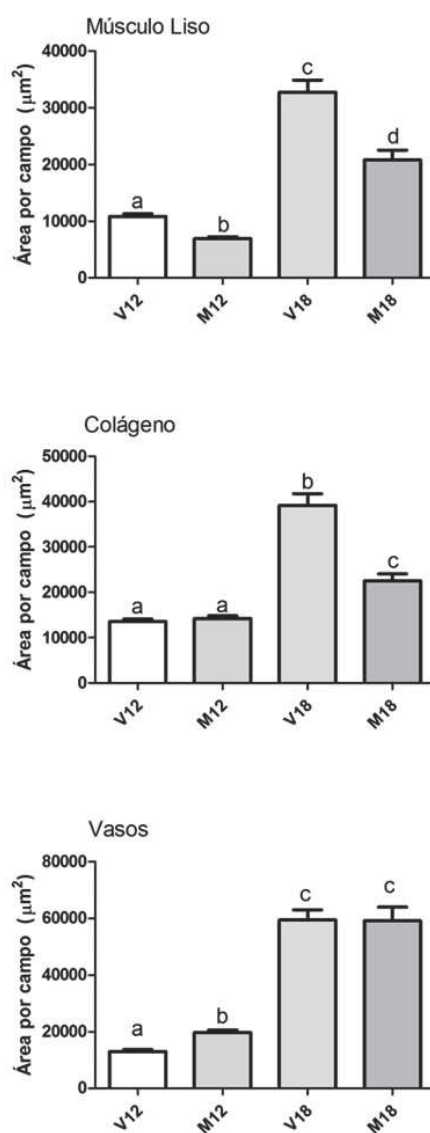


Figura 18. Gráficas de la proporción de musculatura lisa, colágeno y vasos sanguíneos en la capa intermedia. Las barras representan la media y las líneas los error estándar. Las letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p<0.0001$ ).

En la capa externa se aprecia una disminución significativa de la proporción de musculatura estriada en las conejas M-12, a pesar de existir cierta recuperación de la

musculatura estriada ésta no es igual a la de las V-18 seis meses después ( $F=171.7134$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ). La proporción de colágeno disminuye con la multiparidad y a pesar de existir cierta recuperación no es igual a V-18 ( $F=40.3388$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ). La proporción del plexo venoso se incrementa considerablemente con la edad en las conejas V-18 y M-18 ( $F=56.9232$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ; Figura 19).

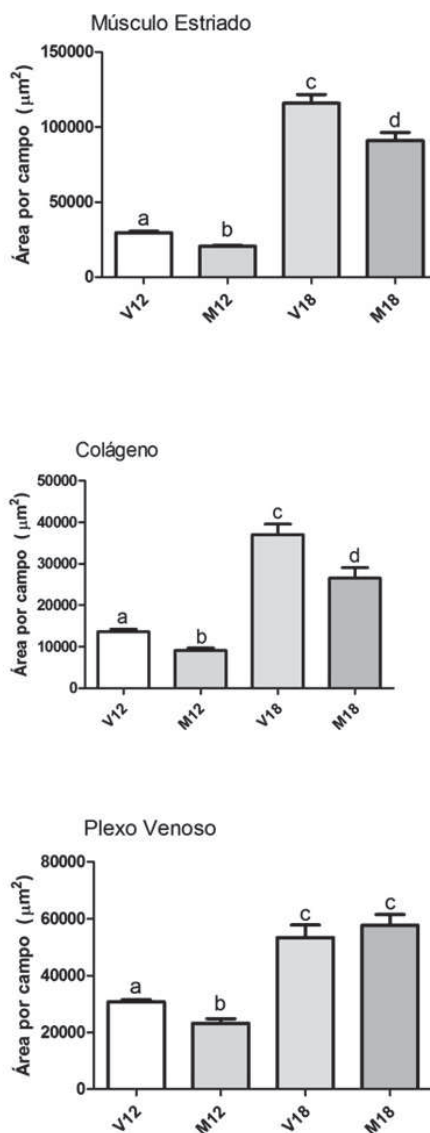


Figura 19. Gráficas de la proporción de musculatura estriada, colágeno y plexo venoso en la capa externa. Las barras representan la media y las líneas los error estándar. Las letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p<0.0001$ ).

### 8.1.3 Vagina pélvica después de la desembocadura de la uretra (V2)

En conejas Virgen de doce meses (V-12).

La **mucosa** forma abundantes pliegues de epitelio estratificado cubico igual al de DU, con actividad secretora diferencial al igual que V1 y una lámina propia de tejido conectivo denso irregular (Figura 20). La organización de las siguientes capas fue igual que para V1.

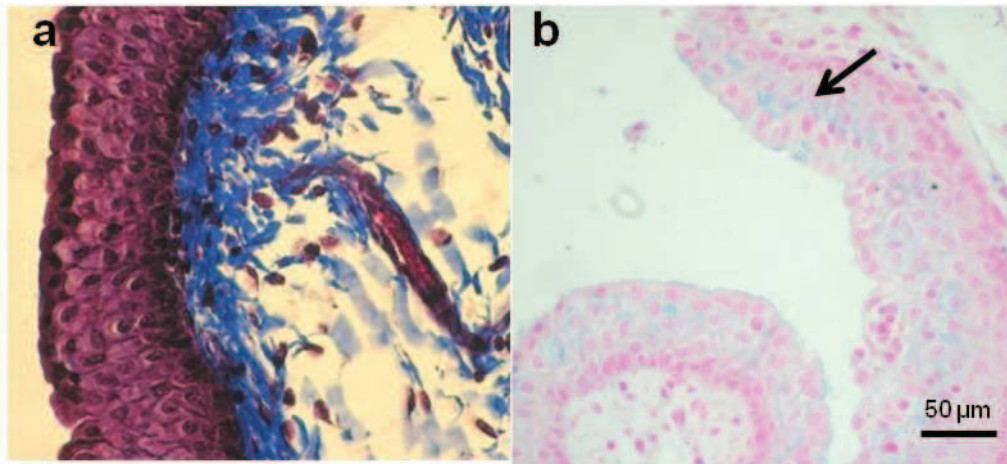


Figura 20. Fotomicrografías de la mucosa de V2 de una coneja virgen. a) Teñida con Tricrómica de Masson y b) Azul de Alcian a pH de 2.5, a 400X aumentos originales. Las flechas indican el sitio de secreción.

En conejas M-12, V-18 y M-18.

En la **mucosa** se identificó un epitelio estratificado cubico con pliegues poco pronunciados, cuyas células presentan citoplasma reducido y menor número de estratos, así como una evidente reducción en la actividad epitelial (Figura 21). La organización de las siguientes capas fue la misma que para la V1 en las hembras múltiparas.

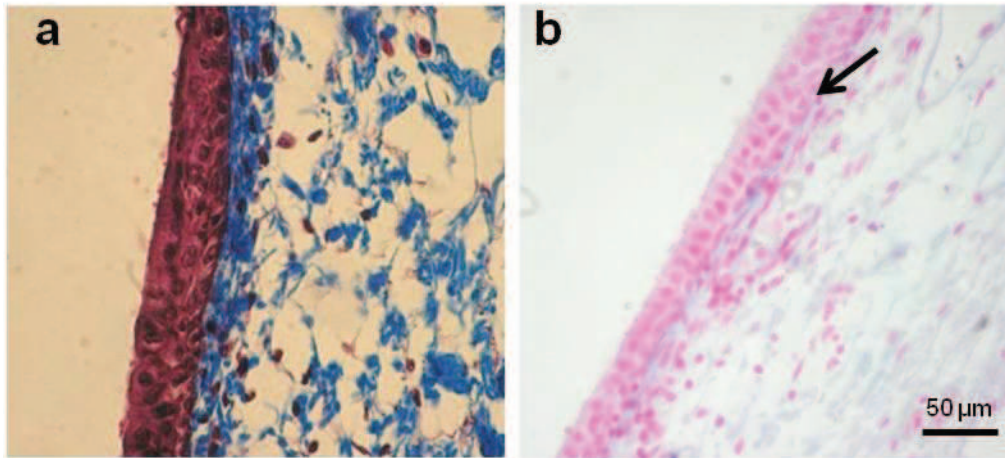


Figura 21. Fotomicrografías de la mucosa de V2 de una coneja múltipara. a) Teñida con Tricrómica de Masson y b) Azul de Alcian a pH de 2.5, a 400X aumentos originales. Las flechas indican el sitio de secreción.

En el espesor de las capas de la pared se aprecia que la capa epitelial disminuye en las M-12, pero se recupera en las M-18 ( $F=27.2905$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ). En la capa intermedia existe un incremento temporal en las M-12 ya que disminuye seis meses después en las M-18 ( $F=21.7453$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ). La capa externa tiende a disminuir en las M-12, y esta se intensifica seis meses después en las M-18 ( $F=26.6871$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ). Por lo que solo el espesor total de la pared disminuye en las M-18 ( $F=20.5978$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ; Figura 22).

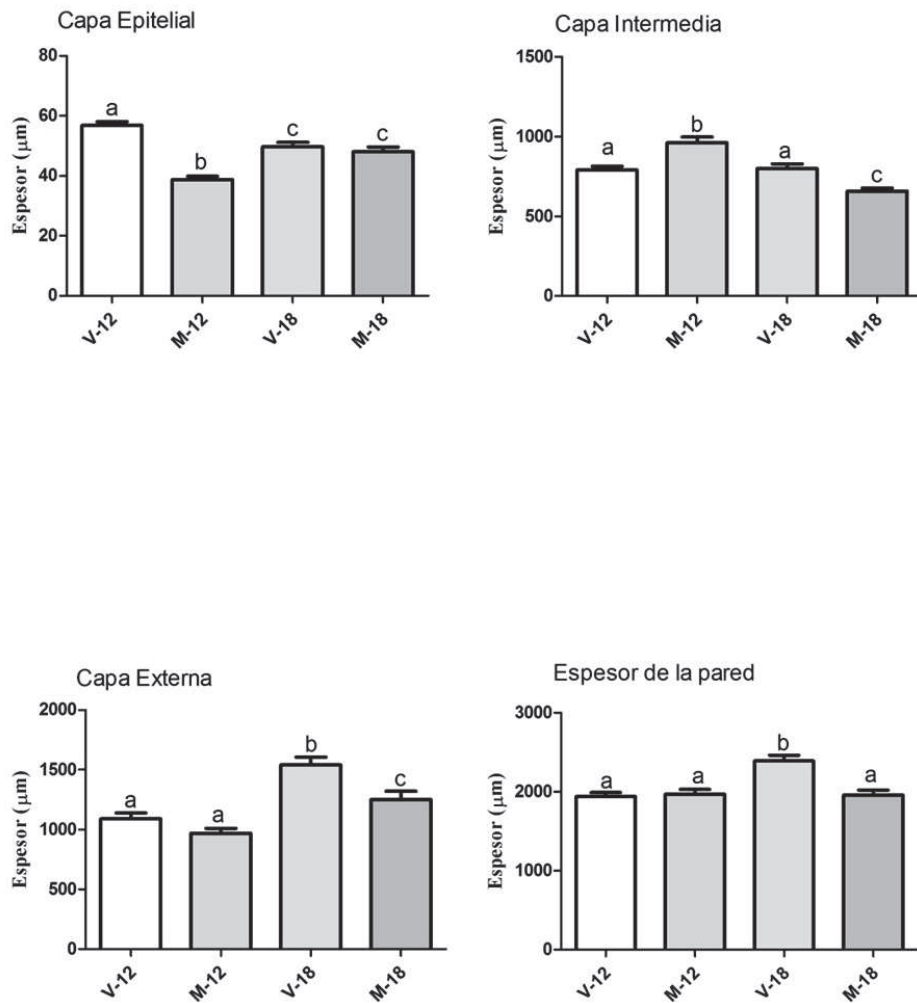


Figura 22. Gráficas que ilustran el espesor de las capas epitelial, intermedia y externa, así como de la pared vaginal. Las barras representan la media y las líneas los error estándar. Las letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.0001$ ).

En la capa intermedia se aprecia que la proporción de musculatura lisa disminuye significativamente en las conejas M-12, pero que se recupera seis meses después ( $F=71.8187$ ;  $P < 0.0001$ ;  $N=24$ ). La proporción de colágeno incrementa en las conejas de dieciocho meses ( $F=55.0436$ ;  $P < 0.0001$ ;  $N=24$ ). Pero la proporción de sinusoides inmersas en la capa intermedia disminuye significativamente veinte días después del parto M-12 e incrementa en las conejas V-18 y M-18 ( $F=73.9277$ ;  $P < 0.0001$ ;  $N=24$ ; Figura 23).

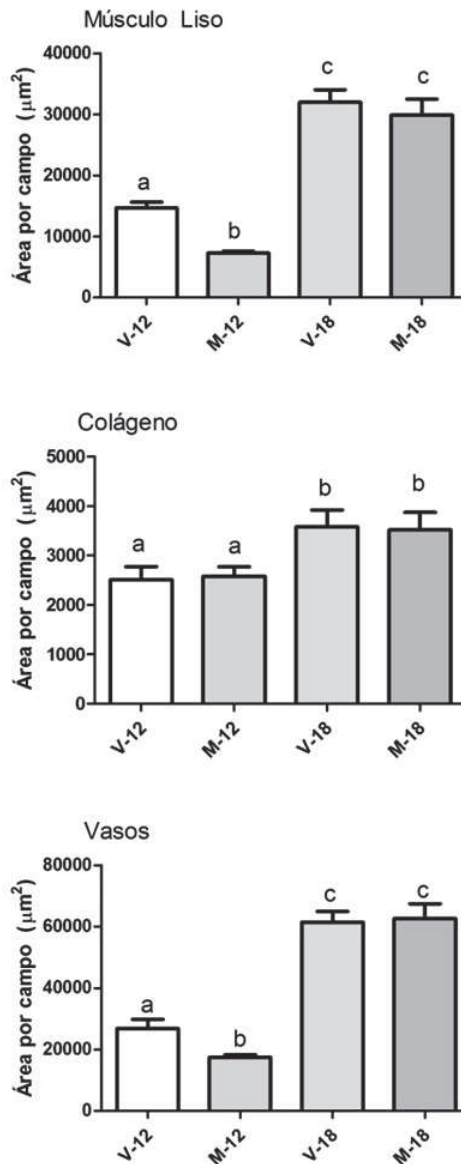


Figura 23. Gráficas de la concentración de musculatura lisa, colágeno y vasos sanguíneos en la capa intermedia. Las barras representan la media y las líneas los error estándar. Las letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.0001$ ).

En la capa externa observamos que la proporción de musculatura estriada disminuye significativamente con la multiparidad en las conejas M-12 y M-18 ( $F=106.0483$ ;  $P < 0.0001$ ;  $N=24$ ). La proporción de colágeno incrementa significativamente en las conejas M-12, V-18 y M-18 ( $F=22.5666$ ;  $P < 0.0001$ ;  $N=24$ ). El plexo venoso disminuye en las M-12, pero incrementa en las V-18 y M-18 ( $F=43.2433$ ;  $P < 0.0001$ ;  $N=24$ ; Figura 24).



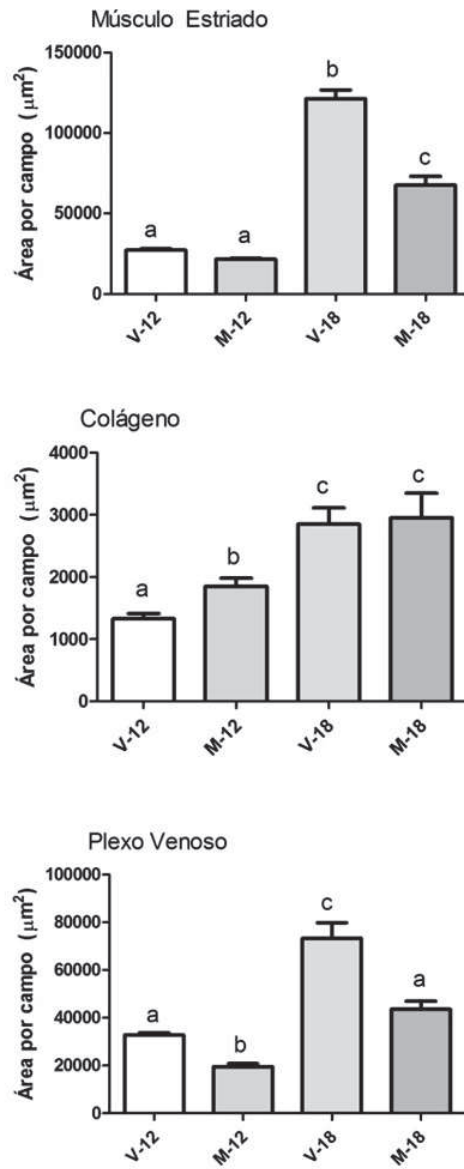


Figura 24. Gráficas de la concentración de musculatura estriada, colágeno y plexo venoso en la capa externa. Las barras representan la media y las líneas los error estándar. Las letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.0001$ ).

## 8.2 Inervación paravaginal

El aparato urogenital inferior de la coneja esta inervado por el plexo pélvico, el cual está formado por entrecruzamientos del nervio pélvico, hipogástrico y pudendo. En la región pélvica del canal vaginal justo a nivel de la desembocadura de la uretra en la vagina se adosan al tejido vaginal formaciones ganglionares de tamaño y forma irregular cuyas prolongaciones posiblemente crucen los dos últimos tercios del canal vaginal y asciendan sobre la uretra hasta la vejiga (Figura 25). La histoquímica de acetilcolinesterasa en las secciones longitudinales reveló de 2 a 4 ganglios interconectados e inmersos en el tejido conectivo paravaginal en las paredes dorsolaterales de la vagina pélvica.

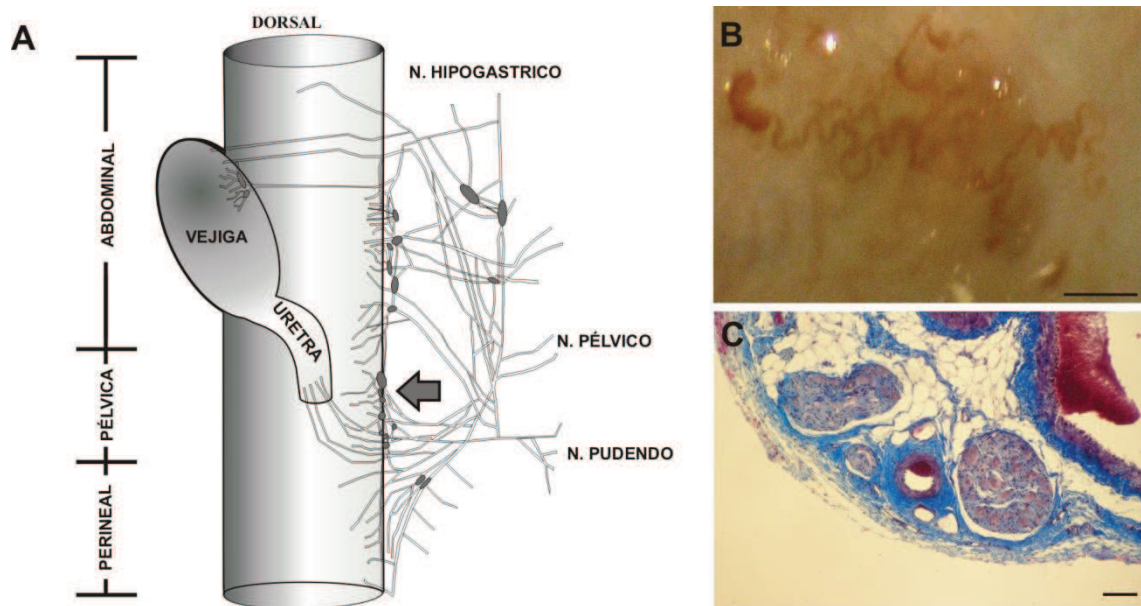


Figura 25. A) Esquema que ilustra la inervación vaginal a nivel de la desembocadura de la uretra en la vagina. B) Fotomicrografía de los ganglios paravaginales inmersos en el tejido conectivo paravaginal. Acetilcolinesterasa, Barra representa 1000 micras. C) Fotomicrografía de las neuronas inmersas en los ganglios paravaginales. Tricrómica de Masson; Barra representa 100 micras.

En los cortes longitudinales de la región pélvica del conducto vaginal observamos ganglios adosados en la pared dorsolateral de la vagina, que se concentran a nivel de la desembocadura de la uretra. Lo cual nos sugiere que las prolongaciones de estos ganglios posiblemente participen en la regulación de la fisiología vaginal (Figura 26). El volumen

estimado de los ganglios va de 1736229.76 a 6497148.84  $\mu\text{m}^3$  ó 0.00173823 a 0.00649715  $\text{mm}^3$ . El número de neuronas oscila entre las 362 a las 731 en total por individuo.

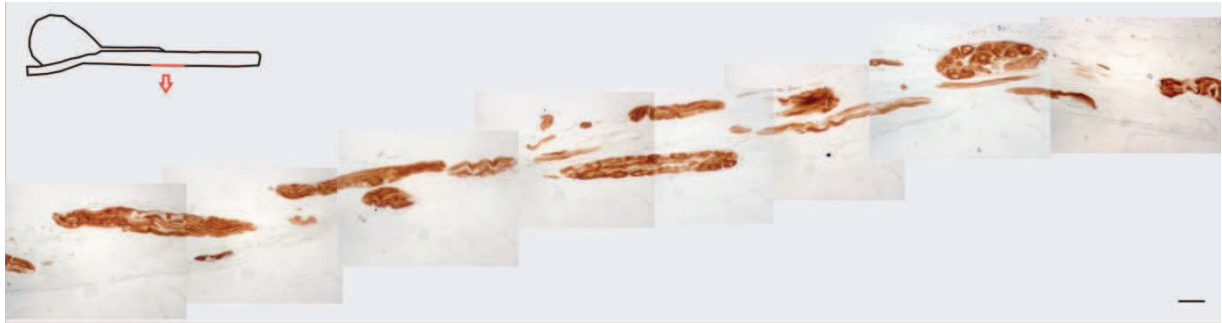


Figura 26. Fotomicrografías de los ganglios paravaginales a nivel de la desembocadura de la uretra en el canal vaginal. Acetilcolinesterasa; A aumentos originales 100X; la Barra representa 100 micras.

En la pared dorsolateral de la vagina se adosan formaciones ganglionares delimitadas por una cápsula de tejido conectivo denso comparable y continuo con el epineuro de los nervios. En el interior se aprecia la matriz extracelular que rodea numerosos somas homogéneos en su forma, así como, sus prolongaciones dendríticas y axón. Entremezclados con los somas se aprecian pequeños núcleos cuboides de las células satélites, algunas fibras de colágeno y escasos capilares. En la periferia de la capa externa se aprecian diversos fascículos nerviosos. Los ganglios paravaginales son sensibles a estrógenos y de naturaleza mixta ya que presentan neuronas inmunorreactivas a anti-TH (adrenérgicas) y anti-ChAT (colinérgicas) y también en la pared dorsal se localizan fascículos nerviosos adrenérgicos y colinérgicos (Figura 27).

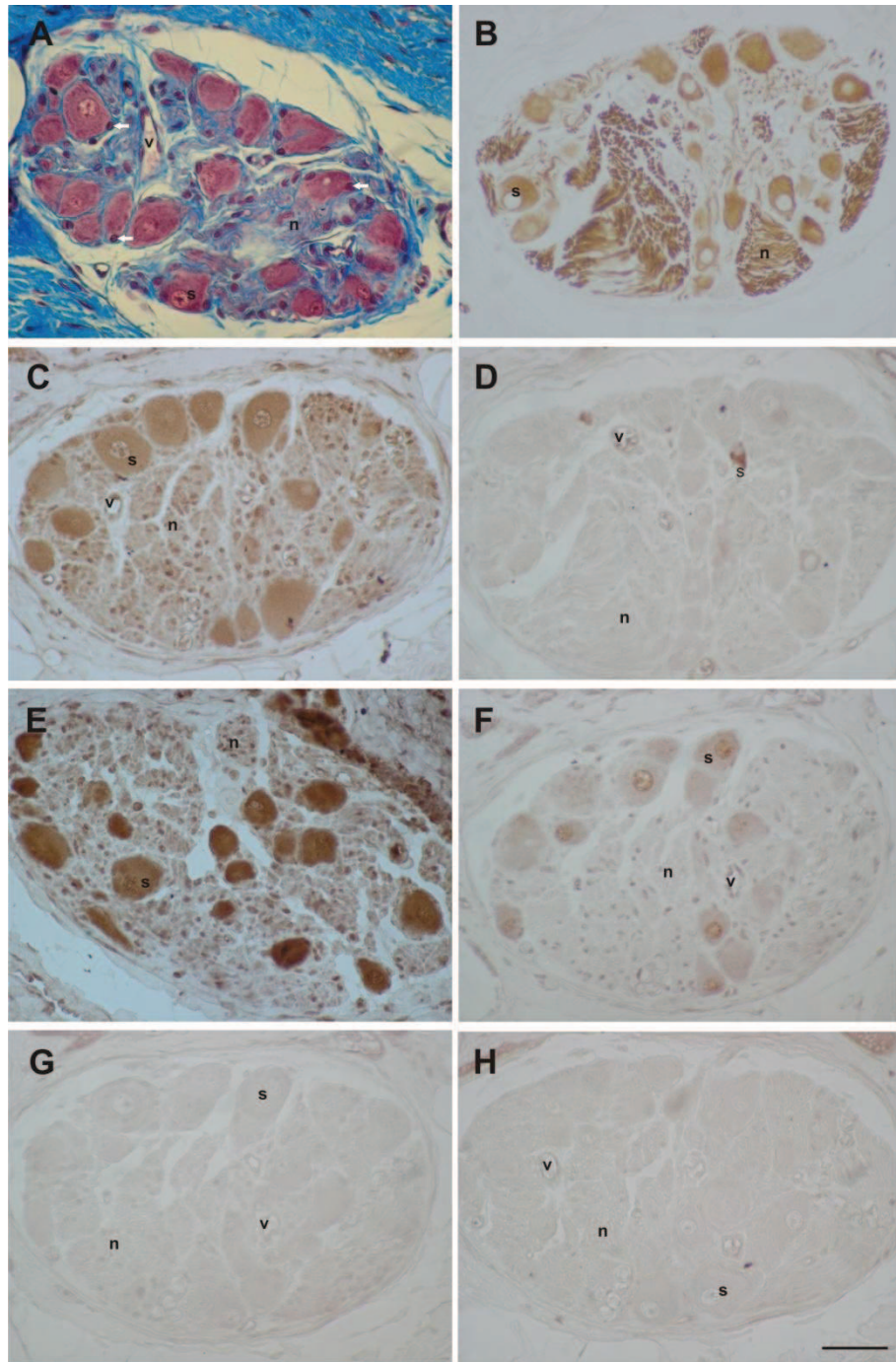


Figura 27. Fotomicrografías de los ganglios paravaginales de conejas vírgenes. Ganglios delimitados por su capsula. A) Teñida con tricrómica de Masson; inmunohistoquímicas B) anti-Tuj 1; C) anti-ChAT; D) anti-TH; D) anti receptores de estrógenos de tipo alfa; E) anti receptores de estrógenos de tipo beta. F) control negativo anti-Tuj, TH y receptores de estrógenos; G) control negativo ChAT y A 400X aumentos originales; Barra indica 50 micras. (s) neuronas; (v) vasos sanguíneos; (n) fascículos nerviosos; flechas células satélite.

En conejas multíparas veinte días posparto (M-12)

En la pared dorsolateral de la vagina se adosan formaciones ganglionares, a diferencia de las conejas vírgenes de 12 meses (V-12) presentan una cápsula más delgada por lo que tienen una apariencia laxa. También, existe un incremento en la infiltración de la matriz extracelular que rodea al conjunto de somas con sus prolongaciones dendríticas y axón, entremezclados con escasos núcleos de las células satélites, fibras de colágeno y capilares, así como un incremento considerable en la proporción de fibroblastos (Figura 28).

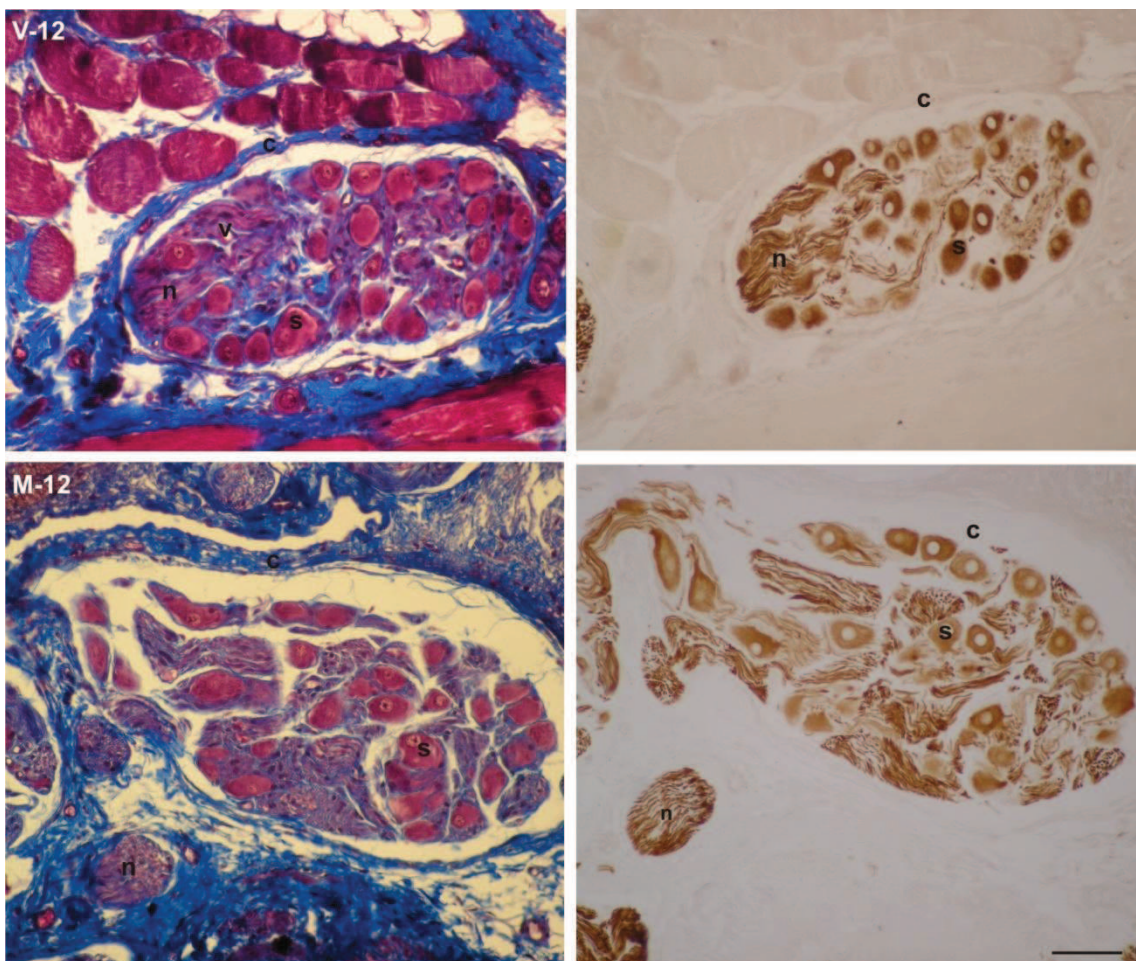


Figura 28. Fotomicrografías de los ganglios paravaginales de conejas multíparas. Teñidas con Tricrómica de Masson; inmunohistoquímica anti-Tuj 1 Barra representa 200 $\mu$ m. A 200X aumentos originales. (s) somas; (n) fascículos nerviosos; (c) cápsula; (v) vasos sanguíneos.

En conejas de 18 meses

En las conejas vírgenes de dieciocho mese de edad (V-18) y en las multíparas seis meses después del último parto (M-18) los ganglios paravaginales presentan las mismas características que las conejas V-12. Sin embargo, en las M-18 ya no se aprecia la infiltración de fibroblastos como resultado de un proceso inflamatorio veinte días después del último parto (Figura 29 y 30).

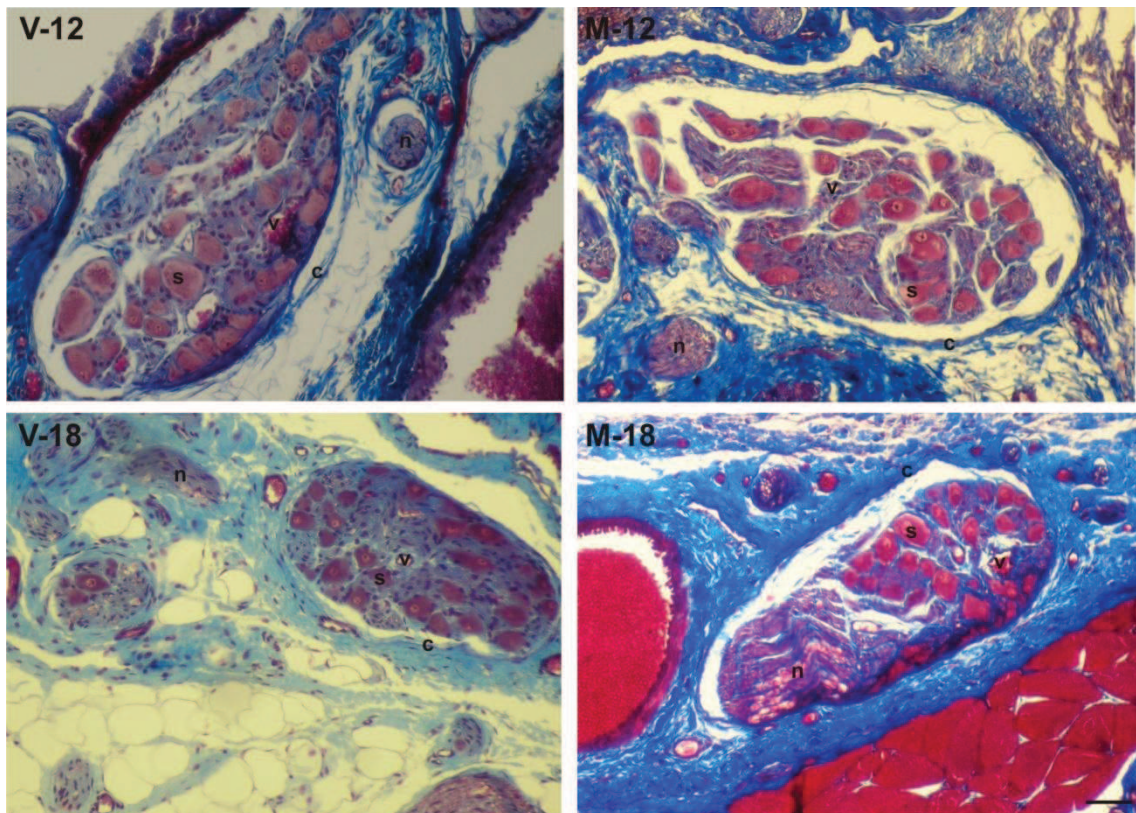


Figura 29. Fotomicrografías de los ganglios paravaginales en conejas de doce y dieciocho meses de edad. Teñidas con Tricrómica de Masson. Donde se aprecia la forma irregular de los ganglios y la reorganización de los ganglios en las conejas Multíparas seis meses después del último parto M18. Barra representa 200 $\mu$ m; (s) soma; (n) fascículos nervios; (c) cápsula; (v) vasos sanguíneos.

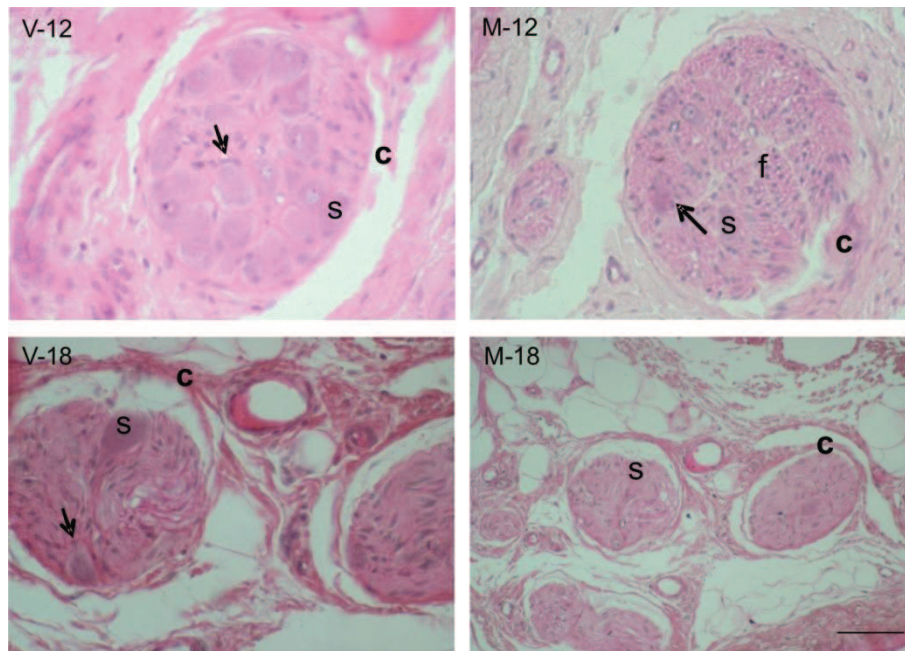


Figura 30. Fotomicrografías de los ganglios paravaginales en conejas de doce y dieciocho meses de edad. Teñidas con Hematoxilina eosina. Donde se aprecia la infiltración de fibroblastos en los ganglios de las M-12. Barra representa 100 $\mu$ m; (s) soma; (n) fascículos nervios; (c) cápsula; (v) vasos sanguíneos; flechas células satélite.

El número de ganglios inmersos en el tejido conectivo paravaginal disminuye significativamente en las conejas V-12 y a pesar de existir una reorganización en la M-18 no iguala el número de ganglios con V-18 ( $F=6.8807$ ,  $P<0.0001$ ,  $N=24$ ). Sin embargo el área ganglionar por campo es mayor en las M-12 y V-18 ( $F=10.6825$ ,  $P<0.0001$ ,  $N=24$ ; Figura 31).

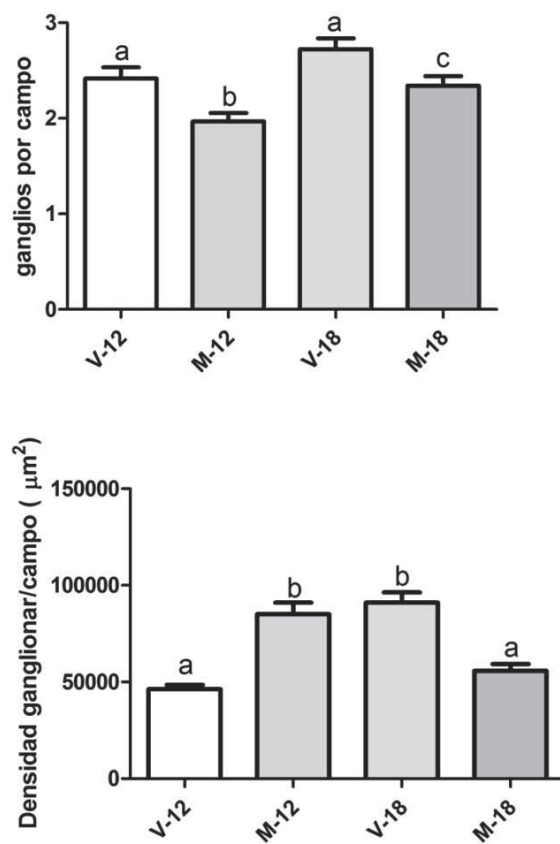


Figura 31. Gráfica que ilustra el número y densidad ganglionar inmersos en el tejido conectivo paravaginal. Se graficaron las medias  $\pm$  error estándar. Las letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.0001$ ).

El número de neuromas disminuye con la multiparidad ( $F=7.8178$ ;  $P < 0.0001$ ;  $N=24$ ). Sin embargo, no existen diferencias en el área del soma entre M-12, V-18 y M-18 ( $F=10.4513$ ;  $P < 0.0001$ ;  $N=24$ ; Figura 32 y 33).



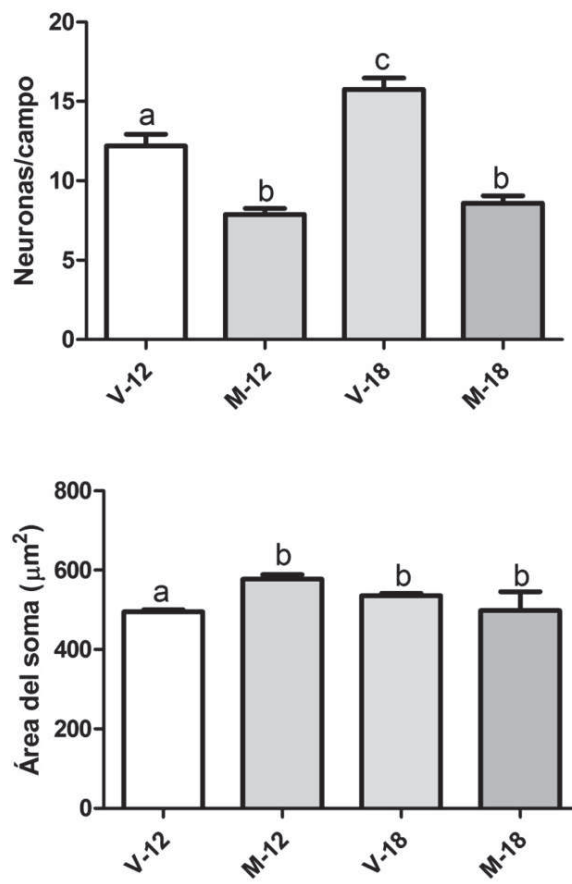


Figura 32. Gráficas que ilustran la disminución del número de neuronas en conejas múltiparas y las variaciones del área del soma en función de la condición. Las letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.0001$ ).

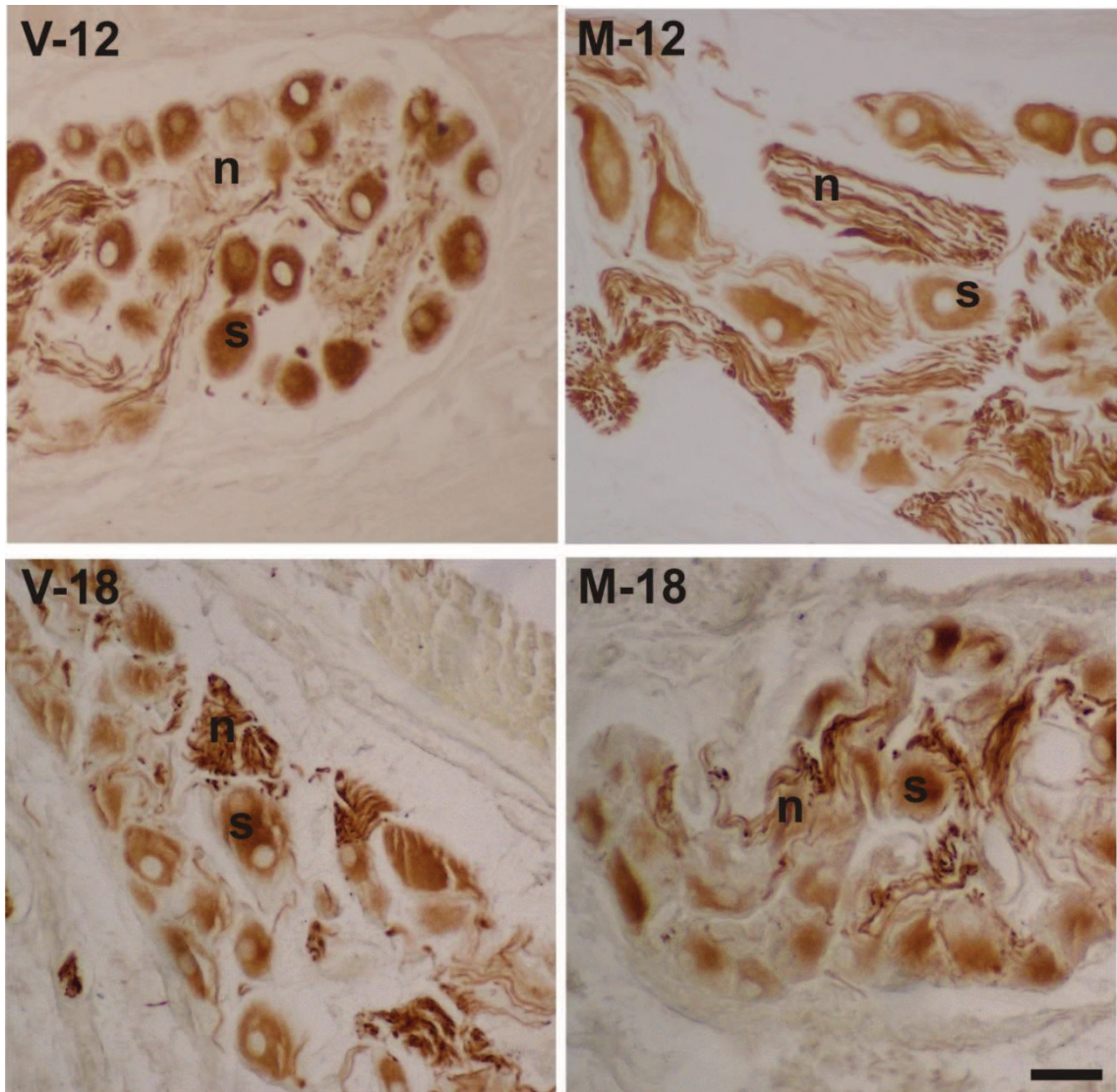


Figura 33. Fotomicrografías de los ganglios paravaginales donde el área del soma; Anti- Tuj; la barra representa 100 micras.(s) soma; (n) fascículos nerviosos.

En el tejido conectivo paravaginal de la pared dorsolateral del conducto vaginal a nivel de la desembocadura de la uretra. Se aprecian fascículos nerviosos cercanos a los ganglios paravaginales. Los cuales posiblemente inerven la pared uretral y vaginal. Los fascículos nerviosos se encuentran rodeados por el epineuro y en las conejas M-12 se observa una apariencia laxa e irregular, posiblemente como consecuencia del último parto ya que seis meses después de organización compacta se reestructura (Figura 34).

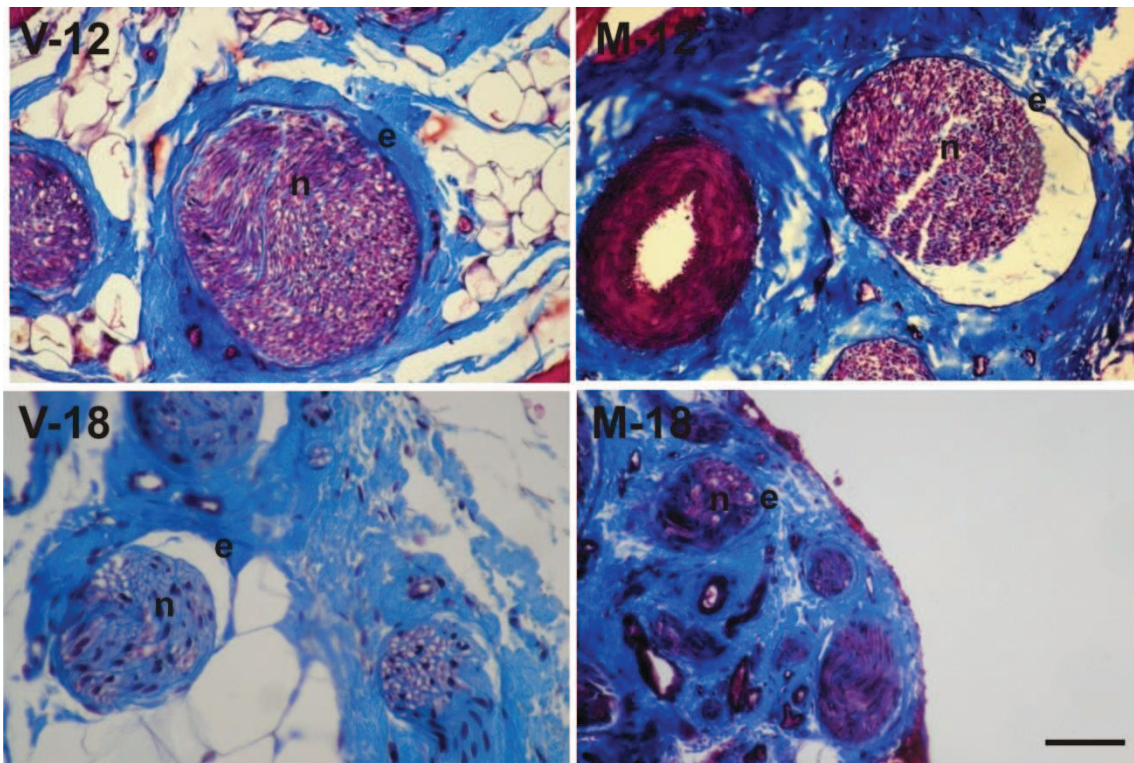


Figura 34. Fotomicrografías de los fascículos nerviosos inmersos en el tejido paravaginal. Donde se ilustra la forma irregular de los mismos y la forma laxa del epineuro en las M12. Teñidas con Tricrómica de Masson. (n) fascículos nerviosos; (e) epineuro.

El número de fascículos nerviosos disminuye en las conejas de dieciocho meses ( $F= 6.0860$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ), pero el área nerviosa incrementa en las M-12 por la deformación del epineuro, sin embargo en las M-18 se reestructura la forma de los nervios y se compacta por lo que el área disminuye significativamente ( $F=16.1237$ ;  $P<0.0001$ ;  $N=24$ ; Figura 35).

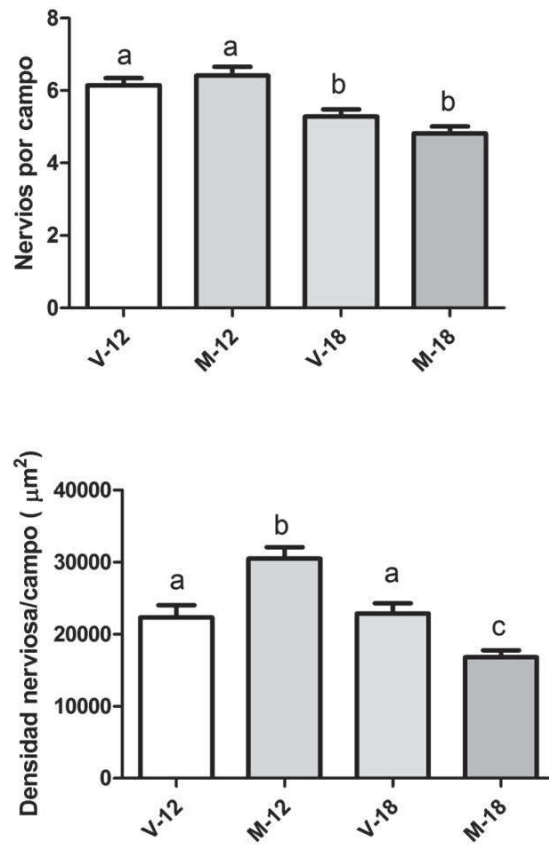


Figura 35. Gráficas que ilustran el número y densidad nerviosa inmersa en el tejido conectivo paravaginal. Se graficaron medias  $\pm$  error estándar. Las letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.0001$ ).

## 9. DISCUSIÓN

En este estudio mostramos que el efecto de la multiparidad sobre la organización tisular de la pared e inervación autonómica del aparato urogenital inferior de la coneja es permanente. Los cambios anatómicos y fisiológicos del aparato urogenital durante eventos reproductivos como la cópula, la gestación y el parto influyen en la función uretral y vaginal. En mujeres se han asociado factores como la gestación, el parto y el número de partos con prolapsos viscerales y daños en los mecanismos de continencia urinaria. Por ejemplo, durante la gestación se ha reportado que un 59.5% de las mujeres experimenta mayor frecuencia de orinar durante el primer trimestre, un 61% en la mitad de la gestación y hasta un 81% al final de la gestación (Tooze-Hobson P y Cutner 2001). En mujeres primíparas se ha observado que el 32% presenta incontinencia urinaria durante la gestación y un 7 % la desarrolla después del parto debido a una prolongada fase de expulsión del producto (Viktrup y cols. 1992). Además se propone que la retención vaginal está íntimamente asociada con la circunferencia de la cabeza del feto y su peso. Ya que mujeres con retención vaginal durante el parto presentan mayor daño en las estructuras del piso pélvico (Allen y cols. 1990, Snooks y cols. 1990, Handa y cols. 1996). En modelos animales con simulación del trauma de parto refieren que el efecto es el mismo que una prolongada fase de expulsión (Lin y cols. 1998, Rocha a/b y cols. 2007).

Otro factor importante en la modulación de la fisiología del aparato urogenital es la multiparidad, la cual se ha propuesto tiene un efecto acumulativo sobre la función neuromuscular del piso pélvico, además se postula que la exposición repetida al trauma durante cada parto vaginal podría promover disfunciones uretrales (Tapp y cols. 1988, Allen y cols. 1990). El trauma del parto puede afectar los mecanismos de continencia al generar daños en la inervación de la musculatura pélvica y periuretral. El daño en las fibras nerviosas se asocia directamente con la compresión de los nervios durante la expulsión del feto, induciendo parcial denervación del área y consecuentemente disfunciones de los mecanismos de continencia (Snooks y cols. 1984, 1985 y 1990, Allen y cols. 1990).

El parto vaginal en mujeres nulíparas fue relacionado con parcial denervación del piso pélvico. Debido a que existen evidencias de reinervación seis meses después del parto en un 80% de las mujeres. Sin embargo en mujeres que sufrieron cesárea los registros electromiográficos demostraron que no existen cambios en los mecanismos de continencia

(Allen y cols. 1990). En modelos animales se ha reportado que la cesárea no altera el número de fibras nerviosas en la pared uretral y que solo aquellos animales que fueron sometidos al parto vaginal presentan una disminución de las fibras nerviosas (Rocha y cols. 2007). Estos cambios degenerativos en los nervios del piso pélvico y musculatura periuretral proponen que el trauma del parto induce cambios en la fisiología de la musculatura del piso pélvico, vesical y uretral, induciendo incontinencia urinaria.

Al igual que la inervación paravaginal, el canal vaginal y la uretra se exponen continuamente a la compresión directa del feto y a las fluctuaciones hormonales durante la multiparidad, por lo que el canal vaginal y uretral tiene que reorganizarse ante la presión de estos factores mecánicos y hormonales. Nuestros resultados muestran como en conejas múltiparas se reorganiza la pared uretral y vaginal, ya que, a diferencia de las conejas vírgenes, presentan una mezcla de los componentes de la submucosa y muscular. También altera la actividad epitelial se reduce la proporción de musculatura lisa, aumento de colágeno (aunque no es equiparable con el de las vírgenes), y se reduce el espesor total de la pared. Todo ello concuerda con el daño estructural en tejidos de la pared uretral y vaginal asociados con la simulación del trauma de parto (Lin y cols. 1998, Sievert y cols. 2001/2004, Resplande y cols. 2002, Rocha y cols. 2007 a/b, Pan y cols. 2009) debido al efecto mecánico que se ejerce sobre estructuras del área pélvica y perineal durante el paso de las crías. Sin embargo, todos estos estudios proponen que solo existe un efecto mecánico y descartan un efecto hormonal, a pesar de que se conoce que los niveles de estrógenos previos al parto promueven un mecanismo de remodelación (Kim y cols. 2004, Pessina y cols. 2006), que incluyen la reducción en la densidad de colágeno al inicio de la gestación, cambios en el fenotipo de las células de músculo liso (Daucher y cols. 2007), así como un incremento en el área de la submucosa de la vagina, al inicio y final de la gestación (Rahn y cols. 2008). Debido a que los estrógenos incrementan el espesor de la musculatura vaginal, es probable que esta hormona sea un promotor del tamaño de la submucosa sobre capa muscular al final de la gestación (Pessina y cols. 2006). En ratas se ha demostrado que la administración de estrógenos invierte la atrofia muscular asociada con la ovariectomía (Liao y Smith 2011). No obstante la administración crónica de estrógenos no restaura por completo el tamaño de la musculatura, por lo que es diferente a la de una hembra intacta, lo cual sugiere que además del factor

hormonal, existe participación de otros factores como la distensión vaginal, por ello en conejas multíparas observamos que disminuye el espesor de la pared vaginal y de la capa intermedia (submucosa y muscular) así como la proporción de musculatura.

El colágeno es uno de los elementos que forma parte de los ligamentos y fascias responsables de proveer el soporte a la vejiga, vagina y útero (Falconer y cols. 1998). En nuestros resultados observamos que el colágeno disminuye con la multiparidad en la pared V1, por lo que es posible que esta disminución de alguna manera participa en el desarrollo de los prolapsos que observamos en hembras multíparas. En la capa intermedia, al igual que la disminución de colágeno y musculatura lisa, se aprecian menos fibras nerviosas entremezcladas. Es posible que la reducción de inervación probablemente promueva un incremento del flujo sanguíneo vaginal, lo cual concuerda con lo reportado para ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos (Kim y cols. 2004/a). En ratas gestantes se propone que el aumento del flujo sanguíneo al final de la gestación facilita la producción de secreciones glandulares y también podría tener un efecto protector de los tejidos vaginales durante los episodios isquémicos vasculares asociados con la compresión asociada con el parto (Liao y Smith 2011). Sin embargo este hecho solo podría explicar el incremento de vasos inmersos en la capa intermedia veinte días después del parto, ya que en V-18 y M-18 no existen diferencias significativas, y parece ser una característica de la edad. En la capa epitelial apreciamos que existe en vagina una reducción considerable de su actividad secretora y proliferativa. La proliferación celular del epitelio está regulada por la concentración de estrógenos, ya que cuando los niveles de estrógenos incrementan las células epiteliales se dividen y liberan vesículas de secreción (Blakeman y cols. 2001). Considerando que el epitelio provee de una barrera física y química contra posibles patógenos y es el responsable de brindar estabilidad y resistencia ante las fuerzas expansivas del parto (Kerkhof y cols., 2009). La disminución de la secreción podría explicar el hecho de que mujeres multíparas sean más susceptibles a infecciones bacterianas y fúngicas (Sturdee y Panay 2010). Nuestros resultados pueden relacionarse con el hecho de que en mujeres con resequecedad vaginal, sensación de ardor o dolor vaginal y falta de deseo sexual u orgasmos presentan menor inervación vaginal (Pauls y cols. 2006).

La respuesta fisiológica del aparato urogenital femenino depende de la regulación neural autonómica. El plexo pélvico desempeña un papel importante en la regulación autonómica de vísceras pélvicas, que incluyen órganos genitales y urinarios (Keast 1999). El plexo pélvico está formado por una red de ramas de los nervios (n. pélvico; n. hipogástrico y n. pudendo), así como ganglios inmersos en dicha red (de Groat 2006). Nuestros resultados muestran que en la coneja existen ganglios del plexo pélvico inmersos en el tejido paravaginal de la pared dorsolateral del canal vaginal a nivel de la desembocadura de la uretra. Los denominamos ganglios paravaginales y presentan neuronas colinérgicas y adrenérgicas, siendo las colinérgicas las que predominan. La naturaleza mixta de estos ganglios es similar a la de ganglios de la pelvis como el paracervical o pélvico en pequeños mamíferos (Wanigasekara y cols. 2003, Jobling 2011), y el PHI de la mujer (Imai y cols. 2006).

Además observamos que la experiencia reproductiva modula la morfología de los ganglios paravaginales al ser sensibles a los niveles de estrógenos. Considerando que la multiparidad implica cópulas, gestaciones, partos, lactancia, creemos que las conejas multíparas nos permiten evaluar no solo el efecto mecánico de la distensión vaginal y muscular durante la expulsión de la cría, sino que también los efectos de las fluctuaciones hormonales que regulan la expresión de estos eventos reproductivos. Nuestros resultados muestran que la densidad ganglionar por campo disminuye con la multiparidad. Así como el número de neuronas. Ello podría estar relacionado con un proceso adaptativo del colágeno que constituye la cápsula del ganglio a la distensión vaginal durante el parto, como se ha planteado para ganglios adosados a la vejiga (Dering y cols. 1998, Mizumo y cols. 2007). Sin embargo, la disminución del número de neuronas no se ha relacionado con eventos reproductivos, sino que es un proceso que ocurre de manera natural en edad avanzada (Dering y cols. 1998, Akamatdsu y cols. 1999, Mizumo y cols. 2007). Lo cual no explica nuestros resultados ya que la edad fue un factor controlado dentro de nuestros grupos y aún son conejas jóvenes, teniendo en cuenta que pueden vivir hasta cinco años.

El tracto reproductivo de la mujer se somete a la remodelación sustancial para satisfacer las necesidades de reproducción en relación con la fertilidad, la gestación y el parto. Tanto útero como la vagina expresan receptores alfa y beta de estrógenos, que varían durante el curso del ciclo (Wang y cols. 2000). La inervación uterina en roedores se somete a una



marcada variación durante el ciclo estral, con un gran número de axones simpáticos degenerados durante la fase de altos niveles de estrógenos del estro (Zoubina y cols. 1998, Zoubina y Smith 2000). Por el contrario, existe muy poca reducción en la densidad de la inervación vaginal durante el estro y diestro. Esto sugiere que la variación en el estado hormonal durante el ciclo estral es insuficiente para afectar la inervación vaginal (Dangoor y cols. 2005). No obstante, la remodelación del canal vaginal es importante para el favorecer el paso del feto durante el parto. Nuestros resultados sugieren que la disminución de la densidad de fascículos nerviosos por campo con la multiparidad, puede estar relacionada con la carencia del pico de estrógenos que se presenta el día 30 de la gestación durante los dos últimos partos (López-García 2012), lo que implica que no se prepare el tejido vaginal al parto y promueva parcial denervación del canal vaginal. Se conoce que en ratas gestantes el incremento de los niveles de estrógenos a finales de la gestación induce una reducción en la inervación simpática y sensorial vaginal (Ting y cols. 2004). La posible explicación fisiológica sería que es una adaptación del tejido vaginal como preparación para el parto, ya que existen varias implicaciones en relación con la reducción en la densidad de axones autonómicos y sensoriales al final de la gestación. Los axones simpáticos son excitatorios durante la contracción del músculo liso y el que disminuyan se cree contribuye con la relajación del tono muscular para facilitar el paso del feto a través del canal vaginal durante el parto (Liao y Smith 2011). La disminución de la inervación sensorial podría desempeñar un papel adaptativo con respecto a la sensación de dolor durante el parto (Mowa y cols. 2003). La exposición continua a la compresión directa del feto y las fuerzas de expulsión maternas y la carencia de estrógenos durante la multiparidad vence la plasticidad nerviosa e induce alteraciones anatómicas de la inervación de los ganglios paravaginales en conejas jóvenes.

Nuestros resultados sugieren que la distensión continua que sufre el aparato urogenital durante los cuatro partos vaginales no se recupera después del periodo de lactancia, ni seis meses después. Por ello proponemos que la multiparidad modula la estructura e inervación del aparato urogenital inferior y promueve el desarrollo de prolapsos viscerales (30% de nuestras conejas presento prolapsos de los cuernos uterinos, uretra, vejiga y vagina) e incontinencia urinaria en mujeres. Lo anterior como consecuencia de la pérdida de neuronas y fascículos nerviosos de los ganglios paravaginales, proporción de musculatura lisa y estriada, así como

de colágeno y cambios en la actividad epitelial como se ha sugerido en mujeres con falta de deseo sexual u orgasmos, problemas de incontinencia urinaria y fecal, resequedad vaginal y disfunción sexual. En base a nuestros resultados consideramos que el canal vaginal no solo funciona como canal del parto, sino que también es sensible a factores hormonales y mecánicos por lo que es un excelente indicador de daño del área pélvica.

## **10. CONCLUSIÓN**

Nuestros resultados muestran que la multiparidad induce cambios permanentes en la organización tisular de la pared uretral y vaginal e inervación autonómica paravaginal. Se encontraron menor número de neuronas y fascículos nerviosos en los ganglios paravaginales y reducción en la actividad celular del epitelio uretro-vaginal, proporción de musculatura lisa y estriada, así como disminución del colágeno y espesor de la pared del conducto urogenital.

Estos cambios estructurales en la inervación autonómica y de la pared del conducto urogenital inferior en conejas pueden estar relacionados con la presencia de prolapsos de órganos pélvicos y cambios transitorios o permanentes en la micción en mujeres multíparas. Nuestros resultados sustentan la hipótesis de que la inervación autonómica y estructura del aparato urogenital son sensibles al efecto mecánico de la distensión vaginal durante el parto y al efecto hormonal que promueve la gestación, el parto y la lactancia. Efectos característicos de la multiparidad que vencen la plasticidad neuronal y del canal urogenital.

## 11. PERSPECTIVAS

El material histológico con el que actualmente se cuenta en nuestro laboratorio representa la posibilidad de realizar o montar nuevas metodologías que complementen los resultados de este trabajo. Otros estudios podrían ser la caracterización de las uniones neuromusculares de la uretra distal y de la vagina pélvica con técnicas argentícas o inmunohistoquímicas. La estimación del índice de apoptosis en la musculatura con la tinción de hematoxilina de Meyer. Considerar la implementación de técnicas de inmunocitoquímica y/o microscopía electrónica con tejido que ya tenemos procesado y cortado. Así mismo, la evaluación del índice de necrosis con base a la presencia de neutrófilos y macrófagos cerca de los paquetes musculares. Otra posibilidad podría ser la identificación del tipo de colágeno en las diferentes condiciones estudiadas.

Toda esta información en conjunto nos permitiría conocer con más detalle la organización tisular de parte del sustrato anatómico involucrado en la expresión de conductas reproductivas como la cópula y el parto, y no reproductivas como la expulsión de orina.

Otra pregunta por resolver sería evaluar si el efecto de multiparidad modifica la fisiología vaginal y uretral seis meses después.

## 12. REFERENCIAS

- Abrams P, Cardozo, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, van Kerrebroeck P, Victor A and Wein A (2002) The standardization of terminology of lower urinary tract function: Report from the standardization sub-committee of the international continence society. *Neurology and Urodynamics* 21:167-178.
- Allen R, Hosker G, Smith A and Warrel D (1990) Pelvic floor damage and childbirth: A neurophysiological study. *Br J Obstet Gynaecol* 97:770-779.
- Al-Hijji J, Larsson B and Batra S (2000) Nitric oxide synthase in the rabbit uterus and vaginal: Hormonal regulation and functional significance. *Biol Reprod* 62:1387-1392.
- Akamatsu FE, De-Souza RR, Liberti EA (1999) Fall in the number of intracardiac neurons in aging rats. *Mech Ageing Dev* Sep 8. 109(3):153-61.
- Anderson KE and Arner A (2004) Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 84:935-986.
- Aukee P and Tihtonen K (2010) Pregnancy, delivery and pelvic floor disorders. *Duodecim.* 126(20): 2381-6.
- Bakircioglu ME, Sievert KD, Lin AS y Lue TF (2000) The effect of pregnancy and delivery on the function and ultrastructure of rat bladder and urethra. *BJU international* 85:350-361.
- Berkley KJ, Robbins A, Sato Y (1993) Functional differences between afferent fibers in the hypogastric and pelvic nerves innervating female reproductive organs in the rat. *J Neurophysiol* 69:533–544.
- Bernstein T (1997) The pelvic floor muscles: Muscle thickness in healthy and urinary-incontinent women measured by the effect of pelvic floor training. *Estrogen receptor studies. NeuroUrol Urod* 16:237-275.
- Blakeman PJ, Hilton P and Bulmer JN (2001) Cellular proliferation in the female lower urinary tract with reference to oestrogen status. *Bjog.* 108:813-816.
- Blacklock AD and Smith PG (2004) Estrogen increases calcitonin gene-related peptide-immunoreactive sensory innervation of rat mammary gland. *J Neurobiol;* 59:192–204.

- Bravo IR (2006) Histología de la vagina perineal en conejas domésticas jóvenes multíparas y nulíparas. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Buchana DL, Kurita T, Taylor JA, Lubahn DB, Cunha GR and Cooke PS (1998) Role of stromal and epithelial estrogen receptors in vaginal epithelial proliferation, stratification, and cornification. *Endocrinology* 139:4345-4352.
- Cannon TW, Wojcik EM, Ferguson CL, Saraga C y Damaser (2002) Effects of vaginal distension on urethral anatomy and function. *BJU International* 90:403-407.
- Carr BR (1998) Female reproductive system, humans. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Knobil E Neill JD (eds.) Editorial Academic Press. New York. pp. 205-214.
- Chiarelli P, Brown WJ (1999) Leaking urine in Australian women: prevalence and associated conditions. *Women Health*. 29(1):1-13.
- Corona DL (2005) Actividad refleja de la musculatura estriada pélvica y perineal durante la micción de la coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*). Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Corona-Quintanilla DL, Castelán F, Fajardo V, Manzo J, Martínez-Gómez M (2009) Temporal coordination of pelvic and perineal striated muscle activity during micturition in female rabbits. *J Urol* 181:1452-1458.
- Crouch JE y Lackey MB (1969) *Tex Atlas of Cat Anatomy*. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Cruz Y, Hudson R, Pacheco P, Lucio RA y Martínez-Gómez M (2002) Anatomical and physiological characteristics of perineal muscles in the female rabbit. *Physiol Behav* 74:1-8.
- Cunha G, Wang Y, Place N, Wenhui L, Baskin L y Glickman S (2003) Urogenital system of spotted hyena (*Crocuta crocuta erxleben*): A functional histological study. *J Morphol* 256:205-208.
- Cunningham G, MacDonald P, Grant N, Leveno F, Gilstrap L, Hankins G y Clark S (1998) *Williams Obstetricia*. Editorial Medica Panamericana.

- Dangoor D, Giladi E, Fridkin M, Gozes I (2005) Neuropeptide receptor transcripts are expressed in the rat clitoris and oscillate during the estrus cycle in the rat vagina. *Peptides*. 26(12):2579-2584.
- Damaser MS, Whitbeck C, Chichester P y Levin RM (2005) Effect of vaginal distension on blood flow and hypoxia of urogenital organs of the female rat. *J Appl Physiol* 98:1884-90.
- Daucher JA, Clark KA, Stolz DB, Meyn LA, Moalli PA (2007) Adaptations of the rat vagina in pregnancy to accommodate delivery. *Obstet Gynecol*. 109(1):128-135.
- D'Alfonso A, Iovenitti P, Carta G (2006) Urinary disorders during pregnancy and postpartum: our experience. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 33(1):23–25.
- de Groat WC (2006) Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective. *Br J Pharmacol* 147 (2): S25-40.
- DeLancey JOL (1988) Structural aspects of the extrinsic continence mechanism. *Obstet Gynecol* 72:296.
- Delgado J, Rodríguez J y Martínez C (1971) Incontinencia urinaria de esfuerzo en la mujer: Análisis de 300 casos. *Ginec Obstet México* 29:1-14.
- Dering MA, Santer RM, Watson AHD (1998) Age-related changes in the morphology of preganglionic neurons projecting to the paracervical ganglion of nulliparous and multiparous rats. *Brain Research* 780:245–252.
- Dyce KM, Sack WO, Wensing CJ (1999) *Anatomía Veterinaria*. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. México, D.F.
- Elbadawi A (1996) Functional anatomy of the organs of micturition. *Urodyn* 23:177-210.
- Fajardo V, Pacheco P, Hudson R, Jiménez I y Martínez-Gómez M (2007) Differences in morphology and contractility of the bulboespongiosus and pubococcygeus muscles in nulliparous and multiparous rabbits. *Int Urogynecol J*.
- Falconer C, Blomgren B, Johansson O, Ulmsten U, Malmström A, Westergren-Thorsson G, Ekman-Ordeberg G (1998) Different organization of collagen fibrils in stress-incontinent women of fertile age. *Acta Obstet Gynecol Scand* 77:87–94.

- Foldspang A, Mommsen S, Lam G y Elving L (1992) Parity as a correlate of adult female urinary incontinence prevalence. *J Epidemiol Community Health* 46:595-600.
- Fowler CJ, Griffiths D and de Groat W (2008) The neural control of micturition. Nature Publishing Group. Vol. 9:453-466.
- Ganong WF (2000) *Fisiología Médica*. Editorial Manual Moderno. México.
- Geneser F (2000) *Histología*. Editorial Médica Panamericana. México.
- Giraldi A, Alm P, Werkström V, Myllymaki L, Wagner G and Andersson KE (2002) Morphological and functional characterization of a rat vaginal smooth muscle sphincter. *Int J Impot Res* 14:271-282.
- Giuliano F, Rampin O, Allard J (2002) Neurophysiology and pharmacology of female genital sexual response. *J Sex Marital Ther* 28( suppl):101-121.
- Griebeling TL and Nygaard IE (1997) The role of estrogen replacement therapy in the management of urinary incontinence and urinary tract infection in postmenopausal women. *Endocrinol Metab Clin North Am* 26:347.
- Hale DS, Benson JT, Brubaker L, Heidkamp MC, Russell B (1999) Histologic analysis of needle biopsy of urethral sphincter from women with normal and stress incontinence with comparison of electromyographic finding. *Am J Obstet Gynecol* 180:342-8.
- Handa VL, Harris TA, Ostergard DR (1996) Protecting the pelvic floor: obstetric management to prevent incontinence and pelvic organ prolapse. *Obstet Gynecol* 88:470-478.
- Hellman L, Pritchard J y Wynn R (1975) *Williams Obstetricia*. Editorial Salvat Editores SA. Barcelona Madrid.
- Hondeau E, Prud'homme MJ, Rousseau A, Rousseau JP (1995) Distribution of noradrenergic neurons in the female rat pelvic plexus and involvement in the genital tract innervations. *J Auton Nerv Syst* 54:113-125.
- Huisman A (1983) Aspects on the anatomy of the female urethra with special relation to urinary continence. *Cont Gyneec Obstet* 10:1-31.
- Hunskar S, Burgio K, Diokno AC, Herzog AR, Hjalmas K y Lapitan MC (2002) Epidemiology and natural history of urinary incontinence. En: *Incontinence*. Abrams P

Cardozo L Khoury S Wein A (eds.) Editorial Health Publication Ltd. United Kingdom. pp. 165-201.

- Imai K, Furuya K, Kawada M, Kinugasa Y, Omote K, Namiki A, Uchiyama E and Murakami G (2006) Human pelvic extramural ganglion cell: a semiquantitative and immunohistochemical study. *Sur Radiol Anat* 28:596-605.
- Jobling P (2011) Autonomic control of the urogenital tract. *Auton Neurosci Nov* 303 16;165(1):113-26.
- Kamo I, Kazumasa T, Chancellor MB, de Groat W y Yoshimura N (2003) Urethral closure mechanisms under sneeze-induced stress condition in rats: a new animal model for evaluation of stress urinary incontinence. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:356-365.
- Keast JR and WC de Groat (1989) Immunohistochemical characterization of pelvic neurons which project of bladder, colon, or penis in rats. *J. Comp. Neurol.* 288:347-400.
- Keast JR (1999) Unusual autonomic neurons: chemistry, connections and plasticity of the pelvic ganglia. *Int Rev Cytol* 193:1-69.
- Keast JR (2006) Plasticity of pelvic autonomic ganglia and urogenital innervations. *Int Rev Cytol* 248:141-208.
- Kelly ML (2007) Physiology of the autonomic nervous system. *American Journal of Pharmaceutical Education* 71: (4) 1-11.
- Kerkhof MH, Hendriks L and Brolmann HA (2009) Changes in connective tissue in patients with pelvic organ prolapsed-a review of the current literature. *Int Urogynecol J Pelvic floor Dysfunct* 20:461-474.
- Kim N, Min K, Pessina MA, Munárriz R, Goldstein I y Traish AM (2004/a) Effects of ovariectomy and steroid hormones on vaginal smooth muscle contractility. *Int J Impot Res* 16:43-50.
- Kim SW, Kim NN, Jeong SJ, Munarriz R, Goldstein I, Traish AM (2004) Modulation of rat vaginal blood flow and estrogen receptor by estradiol. *J Urol*; 172(4)(pt 1):1538-1543.



- Klutke CG y Siegel CL (1995) Functional female pelvic anatomic. Urol Clin North Am 22:487-498.
- Langley JN and Anderson HK (1896) The innervation of the pelvic and adjoining viscera. VII. Anatomical observations J. Physiol. (Lond) 20: 241-248.
- Langworth Or and Brack CB (1939) The effect of pregnancy and the corpus luteum upon the vesical muscle. Am J Obstet Gynecol. 37:121-125.
- Levin RM, Shofer FS and Wein AJ (1980) Estrogen-induced alterations in the autonomic responses of the rabbit urinary bladder. J Pharmacol Exp Ther 215: 614.
- Liao Z and Smith PG (2011) Adaptive Plasticity of Vaginal Innervation in Term Pregnant Rats. Reproductive Sciences 18(12) 1237-1245.
- Li Ming-Zi y Masuko S (2001) Target specific organization and neuron types of the dog pelvic ganglia: A retrograde-tracing and immunohistochemical study. Arch Histol Cytol 64 (3): 267-280.
- Lin AS, Carrier S, Morgan DM, Lue TF (1998) Effect of simulated birth trauma on the urinary continence mechanism in the rat. Urology 52:143-151.
- Lien K-CMS, Morgan DM, Delancey JOL, Ashton-Miller (2005) Pudendal nerve stretch during vaginal birth: a 3D computer simulation. Am J Obstet Gynecol 192(5):1669-1676.
- López-García (2010) Parámetros estrogénicos asociados con la experiencia reproductiva en la coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*): Concentración sérica de estradiol y expresión del receptor de estrógenos en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Martínez-Gómez M, Lucio RA, Carro M, Pacheco P y Hudson R (1997) Striated muscles and scent glands associated with the vaginal tract of the rabbit. Anat Rec 247:486-493.

- Martínez-Gómez M, Corona D, Fajardo V, García L y Hudson R (2004) Patterns of urination in female rabbits of different age and reproductive state. 2<sup>nd</sup> World Lagomorph Conference. Julio 26-31. Vairao, Portugal. pp. 205.
- McKenna KE (2002) The neurophysiology of female sexual function. *World J Urol* 20: 93–100.
- Mendoza G (2006) Parámetros urodinámicos y actividad eléctrica de los músculos bulboesponjoso y pubococcígeo en conejas jóvenes y viejas. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Meyer S, Schreyer A, De Grandi P, Hohlfeld P (1998) The effects of birth on urinary continence mechanisms and other pelvic-floor characteristics. *Obstet Gynecol* 92 (4 Pt 1):613-8.
- Mizuno MS, Pompeu E, Castelucci P, Liberti EA (2007) Age-related changes in urinary bladder intramural neurons. *Int J Dev Neurosci* May; 25(3):141-8.
- Mostwin JL (2001) Clinical physiology of micturition. En: *Textbook of Female Urology and Urogynaecology*. Cardozo L (eds.) Editorial Isis Medical Media Ltd. Staskin D London. pp. 125-138.
- Mowa CN y Iwanaga T (2000) Differential distribution of oestrogen receptor-alpha and -beta mRNAs in the female reproductive organ of rats as revealed by in situ hybridization. *J Endocrinol* 165:59-66.
- Mowa CN, Usip S, Collins J, Storey-Workley M, Hargreaves KM, Papka RE (2003) The effects of pregnancy and estrogen on the expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the uterine cervix, dorsal root ganglia and spinal cord. *Peptides*. 24(8):1163-1174.
- Munarriz R, Kim SW, Kim NN, Traish A, Goldstein I (2003) A review of the physiology and pharmacology of peripheral (vaginal and clitoral) female genital arousal in the animal model. *J Urol* 170(2 Pt 2):S40–S44.
- Oh SJ, Hong SK, Kim SW y Paick JS (2003) Histological and functional aspects of different regions of the rabbit vagina. *Int J Impot Res* 15:142-50.

- Olds RJ y Olds JR (1979) A Color Atlas of the Rat. Editorial John Wiley and Sons. New York.
- Owman C and Sjöberg NO (1966) Adrenergic nerves in the female genital tract of the rabbit. With remarks on cholinesterase-Containing structures. *Zeitschrift für Zelforschung* 74:182-197.
- Pan HQ, Kerns JM, Lin DL, Sybert D, Steward J, Hoover CR, Zaszczurynski P, Butler R and Damaser M (2009) Dual simulated childbirth injury delays anatomic recovery. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:277-283.
- Pauls R, Mutema G, Segal J, Silvia WA, Kleeman S, Dryfhout Ma V, Karram M (2006) A prospective study examining the anatomic distribution of nerve density in the human vagina. *J Sex Med* 3:979-987.
- Papka RE and Mowa CN (2004) Estrogen receptors in the spinal cord, sensory ganglia, and pelvic autonomic ganglia. *Int Rev Cytol*; 231:91–127.
- Pessina MA, Hoyt RF, Goldstein I and Traish AM (2006) Differential effects of estradiol, progesterone, and testosterone on vaginal structural integrity. *Endo* 147:61-9.
- Popesko P, Pajtová V y Horák J (1990) A color atlas of the anatomy of small laboratory animal. Editorial Wolfe Publishing Lt. Inglaterra.
- Praud C, Sebe P, Monder f and Sebille A (2003) The striated urethral sphincter in female rats. *Anat and Embriol* 207:169-75.
- Purves-Tyson TD, Arshi MS, Handelsman DJ, Cheng Y and Keast JR (2007) Androgen and estrogen receptor-mediated mechanisms of testosterone action in male rat pelvic autonomic ganglia. *Neuroscience* 148(1):92-104.
- Qayyum MA, Fatani JA and Abbas, MO (1989) Degeneration of adrenergic nerves in the urinary bladder during pregnancy. *Acta Anat* 136: 303.
- Quinn G y Keough M (2002) Experimental design and data analysis for biologists. Editorial Cambridge University Press. United Kingdom.
- Quiroz F (2004) Tratado de Anatomía Humana. Editorial Porrúa. México.

- Rahn DD, Acevedo JF, Word RA (2008) Effect of vaginal distention on elastic fiber synthesis and matrix degradation in the vaginal wall: potential role in the pathogenesis of pelvic organ prolapse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*; 295(4):R1351-R1358.
- Resplande J, Gholami S, Tulio M, Graziottin, Rogers R, Lin A-S, Leng W y Lue TF (2002) Long-term effect of ovariectomy and simulated birth trauma on the lower urinary tract of female rats. *J Urol* 168:323-330.
- Robles JE (2006) Urinary incontinence. *An Sist Sanit Navar* 29:219.
- Rocha MA, Sartori MGF, De Jesus Simões M, Herrmann V, Baracat EC, Rodriguez de Lima G, Girão MJ (2007) Impact of pregnancy and childbirth on female rat's urethral nerve fibers. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 18:1453-1458.
- Rocha MA, Sartori MGF, De Jesus Simões M, Herrmann V, Baracat EC, Rodriguez de Lima G, Girão MJ (2007) Impact of pregnancy and childbirth in the urethra of female rats. *Int Urogynecol J* 18:645-651.
- Rodríguez-Antolín J (2007) Estudio histológico del aparato urogenital inferior en la coneja doméstica: Relación con la multiparidad y la edad. Tesis de Doctorado en Neuroetología. Universidad Veracruzana.
- Rodríguez-Antolín J, Xelhuantzi N, García-Lorenzana M, Cuevas E, Hudson R, Martínez-Gómez M (2009) General tissue characteristics of the lower urethral and vaginal walls in the domestic rabbit. *Int. Urogynecol J* 20:53-60.
- Senger PL (2003) Pathways to pregnancy and parturition. 2<sup>a</sup> ed. Editorial Current Conception, Inc. USA.
- Shafik A (1993) Vaginocavernosus reflex. *Gynecol Obstet Invest* 35:114-117.
- Schüssler B, Anthuber C y Warrell D (1994) The pelvic floor before and after delivery. En: *Pelvic floor re-education. Principles and Practics.* Schüssler B Laycock J Norton P Stanton S (eds.) Editorial Springer Verlag. London pp. 105-110.
- Sievert K-D, Emre M, Bakircioglu, Tsai T, Stefan E, Dahms, Nunes L y Lue TF (2001) The effect of simulated birth trauma and/or ovariectomy on rodent continence mechanism. Part I: Functional and structural change. *J Urol* 166:311-317.

- Sievert KD, Bakircioglu ME, Tsai T, Nunes L y Lue TF (2004) The effect of labor and/or ovariectomy on rodent continence mechanism-The neuronal changes. *World J Urol* 22(4):244-250.
- Skoner MM, Thompson WD, Caron VA (1994) Factors associated with risk of stress urinary incontinence in women. *Nurs Res* 43(5):301-306.
- Snooks SJ, Barnes PR, Swash M (1984) Damage to the innervation of the voluntary anal and periurethral sphincter musculature in incontinence: an electrophysiological study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 47:1269–1273.
- Snooks SJ, Badenoch DF, Tiptaft RC, Swash M (1985) Perineal nerve damage in genuine stress urinary incontinence. An electrophysiological study. *Br J Urol* 57:422–426.
- Snooks SJ, Swash M, Mathers SE, Henry MM (1990) Effects of vaginal delivery on the pelvic floor: a 5-year follow-up. *Br J Surg* 77:1358–1360.
- Smith A (2010) Estrogen replacement therapy for the treatment of postmenopausal genitourinary tract dysfunction. *Urology Surgery* December 8.
- Song YB, Hwang K, Kim DJ, Han SH (2009) Innervation of vagina: Microdissection and immunohistochemical study. *Journal of sex Marital Therapy* 35:144-153.
- Sturdee DW y Panay N (2010) Recommendations for the management of postmenopausal vaginal atrophy. *Climacteric* 13:509-522.
- Subak LL, Wing R, West DS, Franklin FMD, Vittinghoff E, Creasman J, Richter HE, Myers D, Burgio K, Gorin AA, Macer J, Kusek J, and Grady D (2009) Weight loss to treat urinary incontinence in overweight and obese women. *N Engl J Med.* 360(5):481–490.
- Suckling J, Lethaby A and Kennedy R (2006) Local oestrogen for vaginal atrophy in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev* (4):CD001500.
- Sultan AH, Kamm MA, Hudson CN (1994) Pudendal nerve damage during labor: prospective study before and after childbirth. *Br J Obstet Gynaecol* 101:22-28.

- Taki N, Taniguchi T, Okada K, Moriyama N and Muramatsu I (1999) Evidence for predominant mediation of alpha1-adrenoceptor in the tonus of entire urethra of women. *J Urol*, 162: 1829.
- Tapp A, Cardoso L, Versi E, Montgomery J, Studd J (1988) The effect of vaginal delivery on the urethral sphincter. *Br J Obstet Gynaecol* 95:142–146.
- Tetzschner T, Sorensen M, Lose G, Chistiansen J (1997) Pudendal nerve function during pregnancy and after delivery. *Int Urogynecol J* 8:66-68.
- Thom D, Van Denn Eeden S y Brown J (1997) Evaluation of parturition and other reproductive variables as risk factors for urinary incontinence in later life. *Obstet Gynecol* 90:983-989.
- Ting AY, Blacklock AD, Smith PG (2004) Estrogen regulates vaginal sensory and autonomic nerve density in the rat. *Biol Reprod.* 71(4):1397-1404.
- Toozs-Hobson P and Cutner A (2001) Pregnancy and childbirth in: *Textbook of female urology and urogynaecology*. Cardozo L and Staskin D (eds). ISIS Medical Media. United Kingdom. 978-989.
- Tresguerres JAF (1992) *Fisiología Humana*. Editorial Mc Graw Hill. Madrid.
- Viktrup L, Lose G, Rolff M, Barfoed K (1992) The symptom of stress incontinence caused by pregnancy or delivery in primíparas. *Obstet Gynecol* 79:945–949.
- Wake MH (1992) The comparative anatomy of the urogenital system. En: *Hyman's Comparative Vertebrate Anatomy*. Wake MH (eds.) Editorial The University of Chicago Press. Chicago and London.
- Wanigasekara Y, Kepper M and Keast JR (2003) Immunohistochemical characterization of pelvic autonomic ganglia in male mice. *Cell Tissue Res* 311: 175-185.
- Wang H, Eriksson H, Sahlin L (2000) Estrogen receptors alpha and beta in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle. *Biol Reprod* 63(5):1331-1340.
- Xelhuantzi N (2006) Estudio histológico de la uretra distal y la vagina pélvica en conejas jóvenes nulíparas y múltíparas. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.

- Yamaguchi H (1998) Morphological Effects of Estradiol on the Neurons of the Major Pelvic Ganglia and the Urinary Bladders of Female Rats. *Yonago Acta medica* 41:17–22.
- Zar J (1999) *Biostatistical análisis*. Editorial Prentice Hall. New Jersey.
- Zoubina EV, Fan Q, Smith PG (1998) Variations in uterine innervations during the estrous cycle in rat. *J Comp Neurol*; 397(4):561-571.
- Zoubina EV and Smith PG (2000) Axonal degeneration and regeneration in rat uterus during the estrous cycle. *Autonom Neurosci*. 84(3):176-185.
- Zoubina EV, Mize AL, Alper RH and Smith PG (2001) Acute and chronic estrogen supplementation decreases uterine sympathetic innervation in ovariectomized adult virgin rats. *Histol Histopathol*. 16:989–996.
- Zoubina EV and Smith PG (2002) Distributions of estrogen receptors alpha and beta in sympathetic neurons of female rats: enriched expression by uterine innervation. *J Neurobiol*; 52:14–23.
- Zoubina EV and Smith PG (2003) Expression of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  by sympathetic ganglion neurons projecting to the proximal urethra of female rats. *J Urol* 169: 382-385.

### **13. PUBLICACIONES**



Manuscript Number: AUTNEU-D-12-00119

Title: Effect of multiparity on the morphometry of ganglia from the pelvic plexus in rabbits

Article Type: Full Length Article

Keywords: pelvic ganglia, multiparity, childbirth, pregnancy, rabbit

Corresponding Author: Dra. Margarita Martínez-Gómez, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidad Nacional Autónoma de México

First Author: Francisco Castelán, Ph.D.

Order of Authors: Francisco Castelán, Ph.D.; Nicté Xelhuantzi, M.Sc.; Laura G Hernández-Aragón, B.Sc.; Jorge Rodríguez-Antolín, Ph.D.; Estela Cuevas, Ph.D.; Margarita Martínez-Gómez, Ph.D.

**Abstract:** Distention of pelvic viscera may lead to hypertrophy, which influences the morphology of autonomic ganglia. Because of multiparity expose the lower urogenital tract to distensible forces and hormonal fluctuations that alter its structure and function, we hypothesized that it affects the morphology of paravaginal ganglia of the pelvic plexus in rabbits. Effects of primiparity and pregnancy were also evaluated to try and separate out those based on vaginal delivery and hormonal state. Both morphology and neurochemical pattern of paravaginal ganglia were described in nulliparas Chinchilla breed rabbits, using acetylcholinesterase staining, Masson's trichrome, and immunohistochemistry. The ganglionic density, the number of neurons profiles per field, and the neuron soma area were measured in multiparas (4 consecutive deliveries) and age-matched virgins. The same variables were measured in primiparas, pregnant rabbits, and age-matched virgins. Ganglionic neurons were cholinergic and adrenergic that expressed  $\alpha$ - and  $\beta$ -estrogen receptors. Multiparity increased ganglionic density but reduced neuron density per field. Vaginal delivery and pregnancy had no effect on those variables. Neuron soma area was not modified by multiparity. However, pregnancy reduced the neuron soma area, which was recovered in primiparas. Multiparity affected morphometry of paravaginal ganglia due to consecutive and successive deliveries, in which is involved a transient reduction of neuron soma area because of pregnancy.

Suggested Reviewers: Janet R Keast Ph.D.

Professor, Kolling Institute of Medical Research, The University of Sydney

janet.keast@sydney.edu.au

Profr. Keast is one of the most experienced investigator about pelvic ganglia.

Phillip Jobling Ph.D.

Senior Lecturer, School of Biomedical Sciences and Pharmacy, The University of Newcastle

Phillip.Jobling@newcastle.edu.au

Research of Dr. Jobling is focused on on the structure and function of nerves which control our internal organs, particularly in pelvic ganglia.

Pablo Pacheco M.D.

Professor, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México

ppacheco@uv.mx

Profr. Pacheco has been devoted most of his career to the study of innervation of pelvic innervation.

Ian Gibbins Ph.D.

Professor of Anatomy & Histology, School of Medicine, Flinders University

ian.gibbins@flinders.edu.au

Profr. Gibbins has a vast experience in structure and function of the peripheral autonomic nervous system, particularly in pelvic pathways to female urogenital tract

Barry R Komisaruk Ph.D.

Professor, Psychology Dept., Rutgers University

brk@psychology.rutgers.edu

Profr. Komisaruk has a vast experienced in the field of the neural control of genital visceral (autonomic system) function

Opposed Reviewers:

August 27th, 2012.

Profr. Gregory Burnstock

Editor-in-Chief

Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical

Please find enclosed the electronic version of the manuscript entitled "Effect of multiparity on the morphometry of ganglia from the pelvic plexus in rabbits". The material contained in this manuscript has not been published or is under active consideration by another journal. In addition, we stated that the research was conducted in accordance with the Ethic Comitte of the Universidad Autónoma de Tlaxcala and the guidelines for treatment of animals in research from the Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM. Both of them are based in the Ethical Guidelines Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the United States National Institutes of Health.

We hope that you find our manuscript suitable for be published in Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.

Sincerely,

Margarita Martínez-Gómez, Ph.D.

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Unidad Periférica de Tlaxcala-UNAM:

Universidad Autónoma de Tlaxcala

Carr. Fed. Tlaxcala-Puebla Km 1.5

90070-Tlaxcala, México

Phone/Fax: 52 (246) 46 215 57

e-mail: marmag@biomedicas.unam.mx

1  
2  
3  
4 **Effect of multiparity on the morphometry of ganglia from the pelvic plexus in**  
5  
6 **rabbits**  
7

8  
9  
10  
11 Francisco Castelán, PhD,<sup>a,d</sup> Nicté Xelhuantzi, MSc,<sup>b</sup> Laura G. Hernández-Aragón, BSc,<sup>c</sup>  
12  
13 Jorge Rodríguez-Antolín, PhD,<sup>a</sup> Estela Cuevas, PhD,<sup>a</sup> and, Margarita Martínez-Gómez,  
14  
15 PhD<sup>a,d</sup>  
16  
17

18  
19  
20  
21 <sup>a</sup>*Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala*

22  
23 *(UATx), Tlaxcala-México;* <sup>b</sup>*Doctorado en Ciencias Naturales, UATx, Tlaxcala-México;*

24  
25 <sup>c</sup>*Maestría en Ciencias Biológicas, UATx, Tlaxcala-México;* <sup>d</sup>*Depto. de Biología Celular y*

26  
27 *Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de*

28  
29 *México (UNAM), México-DF, México.*  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

40  
41 Corresponding author:

42  
43 Margarita Martínez-Gómez, Ph.D.

44  
45 *Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta-UATx*

46  
47  
48 Unidat Periférica de Tlaxcala, Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM.

49  
50 90070-Tlaxcala, México

51  
52 Phone/Fax: (52) 246 462 1557

53  
54 [marmag@biomedicas.unam.mx](mailto:marmag@biomedicas.unam.mx)  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5 **Abstract**  
6

7  
8 Distention of pelvic viscera may lead to hypertrophy, which influences the morphology of  
9  
10 autonomic ganglia. Because of multiparity expose the lower urogenital tract to  
11  
12 distensible forces and hormonal fluctuations that alter its structure and function, we  
13  
14 hypothesized that it affects the morphology of paravaginal ganglia of the pelvic plexus in  
15  
16 rabbits. Effects of primiparity and pregnancy were also evaluated to try and separate out  
17  
18 those based on vaginal delivery and hormonal state. Both morphology and  
19  
20 neurochemical pattern of paravaginal ganglia were described in nulliparas Chinchilla  
21  
22 breed rabbits, using acetylcholinesterase staining, Masson's trichrome, and  
23  
24 immunohistochemistry. The ganglionic density, the number of neurons profiles per field,  
25  
26 and the neuron soma area were measured in multiparas (4 consecutive deliveries) and  
27  
28 age-matched virgins. The same variables were measured in primiparas, pregnant  
29  
30 rabbits, and age-matched virgins. Ganglionic neurons were cholinergic and adrenergic  
31  
32 that expressed  $\alpha$ - and  $\beta$ -estrogen receptors. Multiparity increased ganglionic density but  
33  
34 reduced neuron density per field. Vaginal delivery and pregnancy had no effect on those  
35  
36 variables. Neuron soma area was not modified by multiparity. However, pregnancy  
37  
38 reduced the neuron soma area, which was recovered in primiparas. Multiparity affected  
39  
40 morphometry of paravaginal ganglia due to consecutive and successive deliveries, in  
41  
42 which is involved a transient reduction of neuron soma area because of pregnancy.  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52

53 *Key words:* pelvic ganglia, multiparity, childbirth, pregnancy, rabbit  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Introduction

The pelvic plexus is composed of nerves and embedded ganglia that lie adjacent to pelvic viscera and provides most of the autonomic innervation to urogenital organs. (Dail, 1996; Jobling, 2011). In women, the pelvic plexus is called the inferior hypogastric plexus (IHP) (Imai et al., 2006), whereas in other mammal species there is a great variability in given names due to anatomy and morphology of pelvic plexuses is highly variable (Dail, 1996). However they share some features that include pelvic ganglia. These are clusters of sympathetic and parasympathetic neurons that express adrenergic and cholinergic transmitters, and neuromodulators as nitric oxide (NO), vasoactive intestinal peptide (VIP), and neuropeptide Y (NPY), among others (Keast, 2006). Pelvic ganglia located in the dorsolateral adventitious tissue of vagina in cats (Langley and Anderson, 1896) and rabbits (Langley and Anderson, 1896) seem to be homologous to paravaginal ganglia in lesser bush babies (Kanagasuntheram and Verzin, 1964) that innervate reproductive and excretory organs.

Several factors affect morphology and physiology of pelvic ganglia, for example reproduction. However, the latter has been scarcely analyzed. It has been suggested that childbirth impairs the IHP (Spackman et al., 2007), which might be related to gynecological symptoms including painful intercourse and high urination frequency (Quinn, 2004), and pelvic organ cross-sensitization (Malykhina, 2007). Moreover, anterior vaginal wall prolapse is related with an absence of neural ganglia in vaginal walls of parous women (Inal et al., 2010). In rodents, pregnancy alters pelvic ganglia composition and neurotransmitter expression (Mitchell and Stauber, 1990), whereas multiparity alters morphology of preganglionic neurons (Dering et al., 1998). These data

1  
2  
3  
4 suggests that reproductive hormones and vaginal birth are able to modify the pelvic  
5  
6  
7 plexus.  
8

9 We previously reported that multiparity changes structure and function of pelvic  
10 and perineal striated muscles related with reproduction and micturition in rabbits  
11 (Fajardo et al., 2008; Martínez-Gómez et al., 2011). These effects could be associated  
12 with alterations of innervation and morphology of the lower urogenital tract due to  
13 vaginal distention (Lin et al., 1998; Pan et al., 2009). Moreover, morphological changes  
14 in pelvic neurons are promoted by structural changes that occur in their target organs  
15 (Gabella et al., 1992). Since urethra and vagina of multiparous rabbits are exposed to  
16 distensible forces during deliveries and hormonal fluctuations due to pregnancies  
17 (Gonzalez-Mariscal et al., 1994), we hypothesized that multiparity modifies the  
18 morphometry of paravaginal ganglia. Additionally, effects of primiparity and pregnancy  
19 were also evaluated to try and separate out those based on vaginal delivery and  
20 hormonal state. The aims of this work are therefore, a) to describe the morphology of  
21 paravaginal ganglia and the basic neurochemical pattern of their neurons, and b) to  
22 determine the effect of multiparity, primiparity and late pregnancy in the morphometry of  
23 ganglia and neurons.  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

## 48 **Materials and Methods**

### 49 *Animals*

50 Thirty-three young Chinchilla-breed female rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) were housed  
51 in individual stainless-steel cages and kept at  $20 \pm 2$  °C under artificial lighting  
52 conditions (L:D 16:8, lights on at 0600). They were daily provided with pellet food  
53 (Conejina, Purina) and with a continuous access to water. All rabbits used in following  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 experimental procedures were euthanized with an overdose of sodium pentobarbital (60  
5 mg / kg, i. p., Pfizer). The Ethics Committee from the Universidad Autónoma de Tlaxcala  
6  
7 approved all experimental procedures listed below. The guidelines for treatment of  
8  
9 animals in research from the Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM were  
10  
11 followed throughout.  
12  
13  
14

15  
16 Three virgin females (7 months old) were used to describe morphology and  
17  
18 neurochemical characteristics of paravaginal ganglia and ganglionic neurons.  
19  
20 Acetylcholinesterase histochemistry, immunohistochemistry, and Masson's trichrome  
21  
22 staining were done as it is mentioned below.  
23  
24  
25

26 To analyze the effect of multiparity on morphometry of paravaginal ganglia,  
27  
28 multiparous (M, 12 months old; n = 6) and age-matched virgin nulliparous rabbits (N11,  
29  
30 n = 6) were used. Multiparas started to copulate at six-months old. After the first three  
31  
32 deliveries, multiparas were mated on the day after each delivery. Thus, they were  
33  
34 pregnant and lactational for 20 days, when pups were weaned. There was no mating  
35  
36 after the fourth delivery, and females were only in lactation for 20 days when pups were  
37  
38 separated and females were euthanized. Morphometric variables of paravaginal ganglia  
39  
40 were analyzed in Masson's trichrome stained sections.  
41  
42  
43  
44

45 To analyze the effect of the first pregnancy and primiparity on morphometry of  
46  
47 paravaginal ganglia, 18 females were divided in late-pregnant rabbits (G, n = 6),  
48  
49 primiparas (P, n=6), and age-matched virginal nulliparas (N7, n=6). Pregnant and  
50  
51 primiparous rabbits were mated at six-months old. Pregnant rabbits were euthanized at  
52  
53 the end of pregnancy (day 30; pregnancy lasts 31 days, approximately); pups were  
54  
55 surgically extracted and decapitated. Primiparas were euthanized 20 days after delivery;  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1  
2  
3  
4 pups were decapitated at postpartum day 1. Morphometric variables of paravaginal  
5  
6 ganglia were analyzed in Masson's trichrome stained sections.  
7  
8  
9

#### 10 11 *Acetylcholinesterase histochemistry*

12  
13  
14 Vaginal tracts were obtained, washed with cold saline, and the dorsal pelvic  
15  
16 vagina was excised and immersed in stabilized neutral formalin (10% formaldehyde,  
17  
18 29.1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 49.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) for 24 h at 4°C. Tissues were sucrose-  
19  
20 cryoprotected to obtain 14 µm thick longitudinal sections in a cryostat, and were  
21  
22 processed for acetylcholinesterase (AChE) staining following the method of Karnovski  
23  
24 and Roots (1964). Slides were covered with mounting medium (Cytoseal 60) and a  
25  
26 coverslip, and observed by light microscopy using an Axio Imager A1 microscope  
27  
28 (Zeiss). Images were acquired with a 5.1 megapixels (C-5060, Olympus) digital camera.  
29  
30  
31  
32

#### 33 34 35 *Masson's trichrome stain*

36  
37  
38 Vaginal tracts were obtained as it was described elsewhere (Rodríguez-Antolín et  
39  
40 al., 2009). The pelvic vagina was excised, washed in saline, immersed in Bouin-  
41  
42 Duboscq fixative for 18 h, and embedded in paraplast X-tra (Sigma-Aldrich). The tissue  
43  
44 was cut on a microtome, and 7 µm transverse sections were obtained.  
45  
46  
47  
48  
49

#### 50 51 *Immunohistochemistry*

52  
53 Some slides were deparafinized, and incubated in microwave-heated 10 mM  
54  
55 sodium citrate, pH 6 to retrieve antigens. Activity of endogenous peroxidases was  
56  
57 quenched with 0.3% hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich) diluted in phosphate buffer  
58  
59 saline (PBS; 1.6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 154 mM NaCl) at room temperature.  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 Slides were rinsed twice with PBS. Endogenous binding sites for secondary antibodies  
5  
6 were blocked using blocking buffer (5% normal serum diluted in PBS added with 0.3%  
7  
8 triton x-100, PBST). Primary antibodies were diluted in PBST, and slides were incubated  
9  
10 in a humidified chamber, overnight at 4°C. Slides were rinsed with PBST and incubated  
11  
12 with a biotinylated secondary antibody for 2 h at 37 °C in a humidified chamber, and  
13  
14 then washed with PBS. Immunostaining was developed according with the Vectastain  
15  
16 ABC kit directions (Vector Labs), and using 0.015% 3, 3'-diaminobenzidine (Sigma-  
17  
18 Aldrich) and 0.015% hydrogen peroxide as enzyme substrate.  
19  
20  
21  
22

23  
24 Neuron phenotype of ganglia cells and their cytoplasmic processes was  
25  
26 assessed using a monoclonal antibody anti- $\beta$ -tubulin III (anti-Tuj1; ab14545, Abcam;  
27  
28 1:2000). Cholinergic neurons were marked with a sheep anti-choline acetyltransferase  
29  
30 (ChAT; MAB 305, Millipore; 1:2000). Immunostaining anti-tyrosine hydroxylase (TH;  
31  
32 ab111, Abcam; 1:250) was used for marking noradrenergic ganglion neurons. Estrogen  
33  
34 receptor expression was identified to incubate sections with monoclonal antibodies anti-  
35  
36 estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ; NB120-19349, Novus Biologicals; 1:250), and  $\beta$  (ER $\beta$ ;  
37  
38 NB200-305, Novus Biologicals; 1:250). Specificity of primary antibodies is shown in  
39  
40 supplementary figure 1. A goat polyclonal biotinylated antibody anti-mouse IgGs (sc-  
41  
42 2309, SantaCruz Biotechnology; 1:200) was used as secondary antibody for anti-TUJ1,  
43  
44 anti-TH, anti-ER $\alpha$ , and anti-ER $\beta$  immunostaining. A donkey anti-sheep IgGs polyclonal  
45  
46 antibody (sc-2475, SantaCruz Biotechnology; 1:200) was used to detect the anti-ChAT  
47  
48 primary antibody. Goat and donkey normal sera (SantaCruz Biotechnology) were used  
49  
50 for blocking endogenous binding sites of secondary antibodies.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59

### 60 *Morphometric analysis*

61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 Both qualitative and quantitative histological analysis of paravaginal was done in  
5  
6 twenty sections of the pelvic vagina for nulliparous and reproductive-experienced  
7  
8 females (Fig. 1). Urethral openness was used as a reference point along the vaginal  
9  
10 segment to choose ten sections toward cranial direction, and other ten toward caudal.  
11  
12 Sections measured had a separation distance of 70  $\mu\text{m}$ . Morphological and  
13  
14 Sections measured had a separation distance of 70  $\mu\text{m}$ . Morphological and  
15  
16 neurochemical characteristics were observed under light microscopy, and images  
17  
18 acquired with the digital camera.  
19

20  
21 Images from Masson-stained sections at 100X magnification were acquired with  
22  
23 the digital camera. All ganglia profiles inside that field were quantitated. Images were  
24  
25 analyzed using the AxioVision Rel 4.6 (Carl Zeiss) to measure the ganglionic area (area  
26  
27 of all ganglia per field), the number of neuron profiles (neuron density), and the neuron  
28  
29 soma area. Measured neuron profiles were only those whose nuclei were evident. Thus,  
30  
31 the possibility of one neuron was counted more than once was extremely reduced.  
32  
33 These cells were a representative sample of the total neuron profiles per field (see  
34  
35 supplementary figure 2). Since no difference was found in the neuron density between  
36  
37 right and left ganglia (data not shown), only right ganglia were measured.  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

#### 45 *Data analysis*

46  
47 All measured variables are the mean  $\pm$  SE. Statistical significance was set at  $P \leq$   
48  
49 0.05. One-tail Student-*t* tests were used to determine significant differences in variables  
50  
51 between multiparas and age-matched nulliparas. One-way ANOVA was used to  
52  
53 compare variables between late-pregnant rabbits, primiparas, and age-matched  
54  
55 nulliparas, followed by Newman-Keuls post-hoc tests. Statistical tests were done using  
56  
57 the GraphPad Prism version 4c for Mac (GraphPad Software).  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7 **Results**  
8

9 *Morphology of paravaginal ganglia*  
10

11 Acetylcholinesterase-stained longitudinal sections of pelvic vagina revealed 2-4 ganglia  
12 in the paravaginal tissue adjoined to the external layer of the dorsolateral walls (Fig. 2).  
13  
14 Ganglia were rarely observed beyond the segment of the pelvic vagina, rostral to the  
15 urethral openness. Nerve bundles were found in the external layer of the perineal  
16 vagina, and inside paravaginal ganglia. These paravaginal ganglia received afferents  
17 from hypogastric and pelvic nerves. An intricate mesh of nerves connected with ganglia,  
18 and laterally run to them was found. Some branches appear on ganglia that were  
19 followed until bladder and pelvic and both perineal regions of vagina.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

31 In Masson-stained transversal sections, 2–3 ganglia were found surrounded  
32 blood vessels of the paravaginal tissue. Several nerves shapes were found in the same  
33 field. Paravaginal ganglia were enclosed by a dense capsule of connective tissue, which  
34 was similar and continuous with the nerve epineurium (Fig. 3A). Frequently, ganglia had  
35 circle and oval shapes, although some of them had a rounded-edge stick shape. Inside  
36 each ganglion, the extracellular matrix rounded the neuron bodies (Fig. 3A) as well as  
37 their cytoplasmic processes. Nearly all neurons had polygonal and ovoid shapes, and  
38 were heterogeneous in size. Cuboid nuclei from satellite cells were observed closed to  
39 neurons. Several axons, transversally and longitudinally oriented, and blood vessels  
40 inside ganglia were also observed. The neurochemical pattern of ganglionic neurons  
41 was revealed by immunohistochemistry (Fig. 3B-F). Neurons and their cytoplasmic  
42 processes were  $\beta$ -tubulin III positive, confirming their neural phenotype (Fig. 3B). It was  
43 occasionally evident a large cytoplasmic process emerging from soma, which seems to  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 be the axon. Short and thin dendrites, when observed, were scarce. Most of ganglionic  
5  
6 neurons were ChAT positive (Fig. 3C), and only 1 – 3 cells were TH-positive in some  
7  
8 ganglia sections (Fig. 3D). The soma and the nucleus of several neurons were  
9  
10 immunoreactive for anti-ER $\alpha$  (Fig. 3E) and anti-ER $\beta$  (Fig. 3F). No labeling was found in  
11  
12 sections that were only incubated with the corresponding secondary antibody (Fig. 3G,  
13  
14  
15 H).

### 21 *Reproductive experience and paravaginal ganglia*

22  
23  
24 The shape of paravaginal ganglia was similar for individuals of all groups (Fig. 4).  
25  
26 The connective tissue surrounding neurons and cytoplasmic processes of multiparas  
27  
28 seemed to be higher than in any other group, but it was not quantified.

29  
30  
31 In comparison with age-matched nulliparas, multiparas had a greater ganglionic  
32  
33 area ( $85112 \pm 10953$  vs.  $46342 \pm 4017 \mu\text{m}^2$ ,  $P = 0.008$ ; Fig. 5A) and a lower neuron  
34  
35 density ( $7.8 \pm 0.4$  vs.  $12.2 \pm 1$ ;  $P = 0.002$ ; Fig. 5B and supplemental Figure 1). There  
36  
37 was no difference in the averaged soma area ( $579 \pm 34$  vs.  $487 \pm 37 \mu\text{m}^2$ ;  $P = 0.095$ ;  
38  
39 Fig. 5C), neither in histograms of soma area of multiparous and nulliparous rabbits (Fig.  
40  
41  
42 5D).

43  
44  
45 Morphometric variables were also measured in late-pregnant, primiparous and  
46  
47 age-matched nulliparous (N7) rabbits (Fig. 6). The area covered by ganglia (Fig. 6A)  
48  
49 was similar among nulliparous ( $85057 \pm 7116 \mu\text{m}^2$ ), late-pregnant ( $67978 \pm 14526 \mu\text{m}^2$ ),  
50  
51 and primiparous females ( $79137 \pm 8241 \mu\text{m}^2$ ). Neuron density was similar for age-  
52  
53 matched nulliparous ( $12.4 \pm 1.5$ ; Fig. 6B), late-pregnant ( $11.2 \pm 1.3$ ), and primiparous  
54  
55 ( $10.2 \pm 0.9$ ) rabbits. The area of the soma was different among groups (Fig. 6C), being  
56  
57 smaller in late-pregnant rabbits than nulliparas ( $424.3 \pm 4.4$  vs.  $540.7 \pm 41.7 \mu\text{m}^2$ ;  $P <$   
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 0.05) and primiparas ( $424.3 \pm 4.4$  vs.  $503.2 \pm 9.7 \mu\text{m}^2$ ;  $P < 0.05$ ); no difference was  
5  
6 found between primiparas and nulliparas. In comparison with nulliparas and primiparas,  
7  
8 late pregnant rabbits had a high percentage of neurons in small area bins and a low  
9  
10 percentage in higher ones (Fig. 6D).  
11  
12  
13  
14  
15

## 16 **Discussion**

17  
18 In mammals, pelvic ganglia supply urogenital organs with autonomic innervation  
19  
20 (Dail, 1996; Jobling, 2011). Rodents are commonly used to analyze both cellular and  
21  
22 functional issues of pelvic ganglia, likely because the anatomy of their pelvic plexuses is  
23  
24 simpler than in other mammals (Dail, 1996). The anatomical organization of the pelvic  
25  
26 plexus in rabbits resembles that found in cats (Fioretto et al., 2007; Langley and  
27  
28 Anderson, 1896), dogs (Fioretto et al., 2007; Li and Masuko, 2001), lesser bush babies  
29  
30 (Kanagasuntheram and Verzin, 1964), horses (Fioretto et al., 2007), and humans (Imai  
31  
32 et al., 2006). Our findings showed that paravaginal ganglia receive afferent information  
33  
34 from hypogastric and pelvic nerves, and send efferent neural branches to bladder and  
35  
36 vagina, which agrees with classical studies of Langley and Anderson (1896). In spite of  
37  
38 the great length of vagina in rabbits (Rodríguez-Antolín et al., 2009), paravaginal ganglia  
39  
40 were only observed closed to the urethral openness suggesting that they could be  
41  
42 associated with reproductive and excretory functions.  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

50 Paravaginal ganglia in rabbits contained cholinergic and adrenergic neurons,  
51  
52 being those cholinergic more abundant. This result coincides with previous reports  
53  
54 obtained from female rats (Houdeau et al., 1995) and mice (Jobling and Lim, 2008).  
55  
56 Besides noradrenaline and acetylcholine, pelvic neurons also express non-cholinergic  
57  
58 non-adrenergic (NANC) transmitters (i.e. NPY, VIP, and NO, among others) that have  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 been identified in neurons of pelvic ganglia in female mammals (Al-Hijji et al., 2000;  
5  
6 Houdeau et al., 1995; Imai et al., 2006; Inyama et al., 1985; Jobling and Lim, 2008;  
7  
8  
9 Owman and Sjoberg, 1966). In female rabbits, NANC transmitters as like NPY, VIP  
10  
11 (Aughton et al., 2008) and NOS (Al-Hijji et al., 2000) exert an effect of relaxation on  
12  
13 vaginal walls. Those transmitters were not analyzed in this work, and should be  
14  
15 characterized in further studies because of their contribution to the function of the  
16  
17 female LUT, and they are altered by reproduction (Mitchell and Stauber, 1990) and  
18  
19 ovarian steroids (Al-Hijji et al., 2000). Neurons of paravaginal ganglia in female rabbits  
20  
21 express  $\alpha$ - and  $\beta$ -estrogen receptors. This finding is agreed with previous reports about  
22  
23 the expression of estrogen receptors in pelvic neurons of rodents (Papka et al. 1997;  
24  
25 Purves-Tyson et al., 2007), where functions such as neurotransmitter expression and  
26  
27 development, density of innervation in targets, and in a broad sense with plasticity are  
28  
29 well known (Keast, 2006).  
30  
31  
32  
33  
34

35  
36 The ganglionic area of multiparas was bigger than age-matched nulliparas.  
37  
38 However, this variable was not affected in late-pregnant and primiparous rabbits, in  
39  
40 comparison with its respective control group. The effect of multiparity could be explained  
41  
42 as an adaptation of the ganglion in response to the activity of its target organ, as well as  
43  
44 it has been proposed for intramural ganglia of the bladder in guinea pigs (Mizuno et al.,  
45  
46 2007). Possibly, distensible vaginal forces due to four consecutive labor influences on  
47  
48 the remodeling of connective tissue inside and outside the ganglionic capsule leading to  
49  
50 a higher ganglionic area.  
51  
52  
53  
54

55  
56 The reduced neuron density accounted in multiparas has been an unexpected  
57  
58 finding due to the lack of reports that associate reproduction with a loss of pelvic  
59  
60 neurons. Due to this variable was not affected in late-pregnant and primiparous rabbits,  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 we can suppose that it was an outcome of multiparity. Although, a single vaginal birth is  
5  
6 able to decrease the number of neural fibers of the mid-urethra in rats (Rocha et al.,  
7  
8 2007), there are not reports concerning to pelvic ganglia. Indeed, stimulated birth  
9  
10 trauma reduces the number of pelvic neurons in retired breeders rats (Lin et al., 1998),  
11  
12 although artificially-induced vaginal distension was longer than occurs during delivery.  
13  
14 Age is a factor that reduces the number of neurons in cardiac ganglia (Akamatsu et al.,  
15  
16 1999; Mizuno et al., 2007), and morphometry of primary dendrites in preganglionic  
17  
18 neurons of paracervical ganglion. However, it was controlled in our experimental design.  
19  
20  
21  
22

23  
24 The area of neuron soma was not modified by multiparity, but this variable was  
25  
26 reduced in late-pregnant rabbits suggesting an influence of the hormonal state  
27  
28 (Gonzalez-Mariscal et al., 1994). In pelvic neurons from gonadectomized male rats,  
29  
30 androgens but not estradiol maintain the soma area and other morphological features  
31  
32 (Keast and Saunders, 1998; Purves-Tyson et al., 2007). Moreover, androgens also  
33  
34 affect the electrophysiological properties of pelvic neurons (Kanjhan et al., 2003). The  
35  
36 aromatization of androgens to estrogens could be involved in some of those actions. At  
37  
38 the lower urogenital tract, estrogen signaling modulates the expression of growth factors  
39  
40 that alter size and survival of neurons (Bjorling, et al., 2002). The raise of serum  
41  
42 estradiol at the end of pregnancy transiently reduces the density of vaginal innervation  
43  
44 in rats, including autonomic nerves, which has been proposed as a vaginal plasticity that  
45  
46 facilitates parturition (Liao and Smith, 2011). Since paravaginal neurons in rabbits are  
47  
48 estrogen sensitive, it can be proposed that estrogen signaling is associated with the  
49  
50 reduction of soma area on them. Taking into account that the rise in serum estradiol is  
51  
52 absent at the end of pregnancy in multiparous rats (Matt et al., 1986), a similar condition  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1  
2  
3  
4 on rabbits could be related with morphometric changes in paravaginal ganglia. This  
5  
6 hypothesis must be adequately tested in further experiments.  
7  
8

9 In female rats, pelvic ganglia participate in reproductive and excretory processes,  
10  
11 such as reproductive cycles (Van Orden et al., 1983), sperm transport (Fang et al.,  
12  
13 2000) and micturition (Gabella et al., 1992; Persson et al., 1998). Thus, transient or  
14  
15 permanent modifications in the morphometry of paravaginal ganglia could be related  
16  
17 with changes in micturition for multiparous rabbits (Martínez-Gómez et al., 2011). In  
18  
19 women, the vaginal delivery has been suggested as a factor associated with pelvic  
20  
21 organ prolapses (Abramowitch et al., 2009) that could damage the connective tissue in  
22  
23 which the IHP is embedded (Butler-Manuel et al., 2000; Inal et al., 2010). Our results  
24  
25 support the hypothesis that vaginal deliveries are a source of morphological variability of  
26  
27 the IHP (Spackman et al., 2007), in which hormonal variations due to reproductive life  
28  
29 (Toriola et al., 2011) contribute in ganglionic plasticity.  
30  
31  
32  
33  
34  
35

36 In summary, the paravaginal innervation in rabbits includes ganglia and nerve  
37  
38 surrounding blood vessels. Paravaginal ganglia contained cholinergic and noradrenergic  
39  
40 neurons that also expressed estrogen receptors. Both an increase of paravaginal  
41  
42 ganglia density and a decrease in the number of neuron profiles were found in  
43  
44 multiparous rabbits. Pregnancy decreased the neuron area, which was recovered 20  
45  
46 days after delivery. Effects of multiparity on paravaginal ganglia are due to consecutive  
47  
48 and successive deliveries, in which occurs a transient reduction of neuron soma area  
49  
50  
51  
52  
53 due to pregnancy.  
54  
55  
56

## 57 **Acknowledgments**

58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 Authors thank the expert technical assistance of Laura García. This work was  
5  
6 supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of México [grant number  
7  
8 105882 to MMG and, fellowships to NX (17459) and LH (248110)]; the Universidad  
9  
10 Nacional Autónoma de México throughout the Programa de Apoyo a Proyectos de  
11  
12 Investigación e Innovación (grant number 228110 to MMG), and the Programa de  
13  
14 Mejoramiento del Profesorado de la Secretaría de Educación Pública (UATLX-PTC-109  
15  
16 to FC). FC received a post-doctoral fellowship from the Consejo Técnico de la  
17  
18 Investigación Científica of the Universidad Nacional Autónoma de México.  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

## 26 **References**

- 27  
28 Abramowitch, S.D., Feola, A., Jallah, Z., Moalli, P.A. 2009. Tissue mechanics, animal  
29  
30 models, and pelvic organ prolapse: a review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*  
31  
32 144 Suppl 1, S146-158.  
33  
34  
35 Akamatsu, F.E., De-Souza, R.R., Liberti, E.A. 1999. Fall in the number of intracardiac  
36  
37 neurons in aging rats. *Mech Ageing Dev* 109, 153-161.  
38  
39  
40 Al-Hijji, J., Larsson, B., Batra, S. 2000. Nitric oxide synthase in the rabbit uterus and  
41  
42 vagina: hormonal regulation and functional significance. *Biol Reprod* 62, 1387-  
43  
44 1392.  
45  
46  
47 Aughton, K.L., Hamilton-Smith, K., Gupta, J., Morton, J.S., Wayman, C.P., Jackson,  
48  
49 V.M. 2008. Pharmacological profiling of neuropeptides on rabbit vaginal wall and  
50  
51 vaginal artery smooth muscle in vitro. *Br J Pharmacol* 155, 236-243.  
52  
53  
54 Bjorling, D.E., Beckman, M., Clayton, M.K., Wang, Z.Y. 2002. Modulation of nerve  
55  
56 growth factor in peripheral organs by estrogen and progesterone. *Neuroscience*  
57  
58 110, 155-167.  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1  
2  
3  
4 Butler-Manuel, S.A., BATTERY, L.D.K., A'Hern, R.P., Polak, J.M., Barton, D.P.J. 2000.  
5  
6 Pelvic nerve plexus trauma at radical hysterectomy: the nerve content of the  
7  
8 uterine supporting ligaments. *Cancer* 89, 834-841.  
9  
10  
11 Dail, W.G. 1996. The pelvic plexus: innervation of pelvic and extrapelvic visceral tissues.  
12  
13 *Microsc Res Tech* 35, 95-106.  
14  
15  
16 Dering, M.A., Santer, R.M., Watson, A.H. 1998. Age-related changes in the morphology  
17  
18 of preganglionic neurons projecting to the paracervical ganglion of nulliparous  
19  
20 and multiparous rats. *Brain Res* 780, 245-252.  
21  
22  
23 Fajardo, V., Pacheco, P., Hudson, R., Jiménez, I., Martínez-Gómez, M. 2008.  
24  
25 Differences in morphology and contractility of the bulbospongiosus and  
26  
27 pubococcygeus muscles in nulliparous and multiparous rabbits. *Int Urogynecol J*  
28  
29 *Pelvic Floor Dysfunct* 19, 843-849.  
30  
31  
32  
33 Fang, J., Chung, Y.W., Clemens, L.G. 2000. Relation of Fos-IR expression in the pelvic  
34  
35 ganglion to sexual behavior in laboratory rats. *Behav Neurosci* 114, 543-552.  
36  
37  
38 Fioretto, E.T., de Abreu, R.N., Castro, M.F., Guidi, W.L., Ribeiro, A.A. 2007. Macro- and  
39  
40 microstructure of the superior cervical ganglion in dogs, cats and horses during  
41  
42 maturation. *Cells Tissues Organs* 186, 129-140.  
43  
44  
45 Gabella, G., Berggren, T., Uvelius, B. 1992. Hypertrophy and reversal of hypertrophy in  
46  
47 rat pelvic ganglion neurons. *J Neurocytol* 21, 649-662.  
48  
49  
50 Gonzalez-Mariscal, G., Diaz-Sanchez, V., Melo, A.I., Beyer, C., Rosenblatt, J.S. 1994.  
51  
52 Maternal behavior in New Zealand white rabbits: quantification of somatic events,  
53  
54 motor patterns, and steroid plasma levels. *Physiol Behav* 55, 1081-1089.  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1  
2  
3  
4 Houdeau, E., Prud'homme, M.J., Rousseau, A., Rousseau, J.P. 1995. Distribution of  
5  
6 noradrenergic neurons in the female rat pelvic plexus and involvement in the  
7  
8 genital tract innervation. *J Auton Nerv Syst* 54, 113-125.  
9  
10  
11 Imai, K., Furuya, K., Kawada, M., Kinugasa, Y., Omote, K., Namiki, A., Uchiyama, E.,  
12  
13 Murakami, G. 2006. Human pelvic extramural ganglion cells: a semiquantitative  
14  
15 and immunohistochemical study. *Surg Radiol Anat* 28, 596-605.  
16  
17  
18 Inal, H.A., Kaplan, P.B., Usta, U., Tastekin, E., Aybatl, A., Tokuc, B. 2010.  
19  
20  
21 Neuromuscular morphometry of the vaginal wall in women with anterior vaginal  
22  
23 wall prolapse. *Neurourol Urodyn* 29, 458-463.  
24  
25  
26 Inyama, C.O., Hacker, G.W., Gu, J., Dahl, D., Bloom, S.R., Polak, J.M. 1985.  
27  
28  
29 Cytochemical relationships in the paracervical ganglion (Frankenhauser) of rat  
30  
31 studied by immunocytochemistry. *Neurosci Lett* 55, 311-316.  
32  
33  
34 Jobling, P. 2011. Autonomic control of the urogenital tract. *Auton Neurosci* 165, 113-  
35  
36 126.  
37  
38  
39 Jobling, P., Lim, R. 2008. Anatomical and physiological properties of pelvic ganglion  
40  
41 neurons in female mice. *Auton Neurosci* 140, 30-39.  
42  
43  
44 Kanagasuntheram, R., Verzin, J.A. 1964. The Intrinsic Nerve Supply of the Female  
45  
46 Reproductive Organs in the Lesser Bush Baby (*Galago Senegalensis*  
47  
48 *Senegalensis*). *Acta Anat (Basel)* 58, 306-316.  
49  
50  
51 Kanjhan, R., Osborne, P.B., Ouyang, M., Keast, J.R. 2003. Postnatal maturational  
52  
53 changes in rat pelvic autonomic ganglion cells: a mixture of steroid-dependent  
54  
55 and -independent effects. *J Neurophysiol* 89, 315-323.  
56  
57  
58 Karnovsky, M.J., Roots, L. 1964. A "Direct-Coloring" Thiocholine Method for  
59  
60  
61 Cholinesterases. *J Histochem Cytochem* 12, 219-221.  
62  
63  
64  
65

- 1  
2  
3  
4 Keast, J.R. 2006. Plasticity of pelvic autonomic ganglia and urogenital innervation. *Int*  
5  
6 *Rev Cytol* 248, 141-208.  
7  
8  
9 Keast, J.R., Saunders, R.J. 1998. Testosterone has potent, selective effects on the  
10 morphology of pelvic autonomic neurons which control the bladder, lower bowel  
11 and internal reproductive organs of the male rat. *Neuroscience* 85, 543-556.  
12  
13  
14 Langley, J.N., Anderson, H.K. 1896. The Innervation of the Pelvic and adjoining Viscera:  
15  
16 Part VII. Anatomical Observations. *J Physiol* 20, 372-406.  
17  
18  
19 Li, M.Z., Masuko, S. 2001. Target specific organization and neuron types of the dog  
20 pelvic ganglia: a retrograde-tracing and immunohistochemical study. *Arch Histol*  
21 *Cytol* 64, 267-280.  
22  
23  
24 Liao, Z., Smith, P.G. Adaptive plasticity of vaginal innervation in term pregnant rats.  
25  
26 *Reprod Sci* 18, 1237-1245.  
27  
28  
29 Lin, A.S., Carrier, S., Morgan, D.M., Lue, T.F. 1998. Effect of simulated birth trauma on  
30 the urinary continence mechanism in the rat. *Urology* 52, 143-151.  
31  
32  
33 Malykhina, A.P. 2007. Neural mechanisms of pelvic organ cross-sensitization.  
34  
35 *Neuroscience* 149, 660-672.  
36  
37  
38 Martínez-Gómez, M., Mendoza, G., Corona-Quintanilla, D.L., Fajardo, V., Rodríguez-  
39  
40 Antolín, J., Castelán, F. 2011. Multiparity causes uncoordinated activity of pelvic-  
41 and perineal-striated muscles and urodynamic changes in rabbits. *Reprod Sci* 18,  
42  
43 1246-1252.  
44  
45  
46 Matt, D.W., Lee, J., Sarver, P.L., Judd, H.L., Lu, J.K. 1986. Chronological changes in  
47  
48 fertility, fecundity and steroid hormone secretion during consecutive pregnancies  
49  
50 in aging rats. *Biol Reprod* 34, 478-487.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1  
2  
3  
4 Mitchell, B.S., Stauber, V.V. 1990. Morphological, histochemical and immunohistological  
5  
6 studies of the paracervical ganglion in prepubertal, pregnant and adult, non-  
7  
8 pregnant guinea-pigs. *J Anat* 172, 177-189.  
9  
10  
11 Mizuno, M.S., Pompeu, E., Castelucci, P., Liberti, E.A. 2007. Age-related changes in  
12  
13 urinary bladder intramural neurons. *Int J Dev Neurosci* 25, 141-148.  
14  
15  
16 Owman, C., Sjoberg, N.O. 1966. Adrenergic nerves in the female genital tract of the  
17  
18 rabbit. With remarks on cholinesterase-containing structures. *Z Zellforsch Mikrosk*  
19  
20 *Anat* 74, 182-197.  
21  
22  
23 Pan, H.Q., Kerns, J.M., Lin, D.L., Sybert, D., Steward, J., Hoover, C.R., Zaszczurynski,  
24  
25 P., Butler, R.S., Damaser, M.S. 2009. Dual simulated childbirth injury delays  
26  
27 anatomic recovery. *Am J Physiol Renal Physiol* 296, F277-283.  
28  
29  
30 Papka R.E., Srinivasan, B., Miller, K.E., Hayashi, S. 1997. Localization of estrogen  
31  
32 receptor protein and estrogen receptor messenger RNA in peripheral autonomic  
33  
34 and sensory neurons. *Neuroscience* 79, 1153-1163.  
35  
36  
37  
38 Persson, K., Alm, P., Uvelius, B., Andersson, K. 1998. Nitroergic and cholinergic  
39  
40 innervation of the rat lower urinary tract after pelvic ganglionectomy. *Am J Physiol*  
41  
42 *Regul Integr Comp Physiol* 274, R389-R397.  
43  
44  
45 Purves-Tyson, T.D., Arshi, M.S., Handelsman, D.J., Cheng, Y., Keast, J.R. 2007.  
46  
47 Androgen and estrogen receptor-mediated mechanisms of testosterone action in  
48  
49 male rat pelvic autonomic ganglia. *Neuroscience* 148, 92-104.  
50  
51  
52 Quinn, M. 2004. Obstetric denervation-gynaecological reinnervation: disruption of the  
53  
54 inferior hypogastric plexus in childbirth as a source of gynaecological symptoms.  
55  
56  
57 *Medical Hypotheses* 63, 390-393.  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 Rocha, M.A., Sartori, M.G., De Jesus Simoes, M., Herrmann, V., Baracat, E.C.,  
5  
6 Rodrigues de Lima, G., Girao, M.J. 2007. Impact of pregnancy and childbirth on  
7  
8 female rats' urethral nerve fibers. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 18,  
9  
10 1453-1458.  
11  
12

13  
14 Rodríguez-Antolín, J., Xelhuantzi, N., García-Lorenzana, M., Cuevas, E., Hudson, R.,  
15  
16 Martínez-Gómez, M. 2009. General tissue characteristics of the lower urethral  
17  
18 and vaginal walls in the domestic rabbit. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*  
19  
20 20, 53-60.  
21  
22

23  
24 Spackman, R., Wrigley, B., Roberts, A., Quinn, M. 2007. The inferior hypogastric plexus:  
25  
26 a different view. *J Obstet Gynaecol* 27, 130-133.  
27

28  
29 Toriola, A.T., Varaasmaki, M., Lehtinen, M., Zeleniuch-Jacquotte, A., Lundin, E.,  
30  
31 Rodgers, K., Lakso, H., Chen, T., Schock, H., Hallmans, G., Pukkala, E., Toniolo,  
32  
33 P., Grankvist, K., Surcel, H., Lukanova, A. 2011. Determinants of maternal sex  
34  
35 steroids during the first half of pregnancy. *Obstet Gynecol* 118, 1029-1036.  
36  
37

38  
39 Van Orden, D.E., Farley, D.B., Clancey, C.J. 1983. Effect of parasymapthetic  
40  
41 decentralization and paracervical ganglion excision on reproductive fuction in  
42  
43 the rat. *Biol Reprod* 28, 910-916.  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5 **Figure legends**  
6  
7  
8  
9

10 **Figure 1.**

11  
12 Depiction showing the pelvic plexus in female rabbits. (A) Paravaginal ganglia are only  
13 embedded in the adventitious tissue of the dorsolateral pelvic vagina (arrow). (B)  
14  
15 Twenty sections from pelvic vagina were used for morphometric analysis. Urethral  
16  
17 openness (arrowhead) was taken as a reference point along the vaginal segment to  
18  
19 choose ten sections toward cranial direction, and other ten toward caudal one. Analyses  
20  
21 were only done in right ganglia (arrow).  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

29 **Figure 2.**

30  
31 Paravaginal innervation in rabbits stained with acetylcholinesterase histochemistry.  
32  
33 Upper, depiction showing the structures of the lower urogenital tract. Pelvic ganglia were  
34  
35 found only in the the region of pelvic vagina around urethral opennes (arrow). Lower,  
36  
37 composition of photographs from longitudinal sections showing ganglia and nerves  
38  
39 adjoined to the pelvic vagina. B, bladder; U, urethra; V, vagina. Bar = 50  $\mu$ m.  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

47 **Figure 3.**

48  
49 Transverse sections showing the neurochemistry of paravaginal neurons in rabbits.  
50  
51 Masson's trichrome stain (A), or immunohistochemistry anti- $\beta$ -tubulin III (B), -ChAT (C),  
52  
53 -TH, (D), --ER $\alpha$  (E) and --ER $\beta$  (F). No labeling was found in sections incubated with the  
54  
55 secondary antibody (G). nf, nerves; \*, neurons; bv, blood vessels; ct, conecctive tissue;  
56  
57 light arrow, satellite nuclei. Bar = 50  $\mu$ m.  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7 Figure 4.

8  
9 Paravaginal ganglia stained with Masson's trichrome from nulliparous (A), pregnant (B),  
10  
11 primiparous (C), and multiparous rabbits (D). bv, blood vessels; cf, collagen fibers; n,  
12  
13 neuron; nf, nerve fibers. Bar, 50  $\mu$ m.  
14  
15  
16  
17

18  
19 Figure 5.

20  
21 Figure 5. Morphometric variables of ganglionic neurons from nulliparous (N11) and  
22  
23 multiparous (M) rabbits. A) Ganglionic area per field, B) neuron density per field, C)  
24  
25 neuron soma area, and D) histogram of neuron soma area. For A, B, and C, data are  
26  
27 the mean  $\pm$  SE. For D, data are the mean of the percentage  $\pm$  SE of neurons in each bin  
28  
29 of area. Unpaired one-tail Student-t tests were used to determine significant differences  
30  
31 between groups (\*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).  
32  
33  
34  
35  
36  
37

38  
39 Figure 6.

40  
41 Morphometric variables of ganglionic neurons from nulliparous (N7), pregnant (G), and  
42  
43 primiparous (P) rabbits. A) Ganglionic area per field, B) neuron density per field, C)  
44  
45 neuron soma area, and D) histogram of neuron soma area. For A, B, and C, data are  
46  
47 the mean  $\pm$  SE of twenty sections and per animal. For D, data are the mean the  
48  
49 percentage  $\pm$  SE of neurons in each bin area. One-way ANOVA followed of Newman-  
50  
51 Keuls tests were used to determine significant differences between groups (\*,  $P < 0.05$ ;  
52  
53 \*\*,  $P < 0.01$ ).  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 Supplementary figure 1.  
5

6 Specificity of antibodies used to identify the neurochemical pattern of paravaginal  
7 ganglia in rabbits. Spinal cord (A-D) and uterine (E-F) sections with immunoreactivity for  
8 anti- $\beta$ -tubulin III (A, B), anti-ChAT (C), anti-TH (D), anti-estrogen receptor subtype  $\alpha$  (E),  
9 and anti-estrogen receptor subtype  $\beta$  (F). bv, blood vessels; ep, epithelium; ga,  
10 glandular acini; n, neuron; nf, nerve fibers. Bar = 50  $\mu$ m.  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20

21 Supplementary figure 2.  
22

23 Ganglionic neuron density per field from virgin (N11) and multiparous (M) rabbits. For A,  
24 only neuron profiles with evident nucleus were measured. For B, all neuron profiles  
25 inside the ganglion were measured. Data are shown as the mean  $\pm$  SE of twenty  
26 sections and per animal. Unpaired one-tail Student-t tests were used to determine  
27 significant differences between groups (\*\*,  $P < 0.01$ ).  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Figure 1  
Click here to download high resolution image

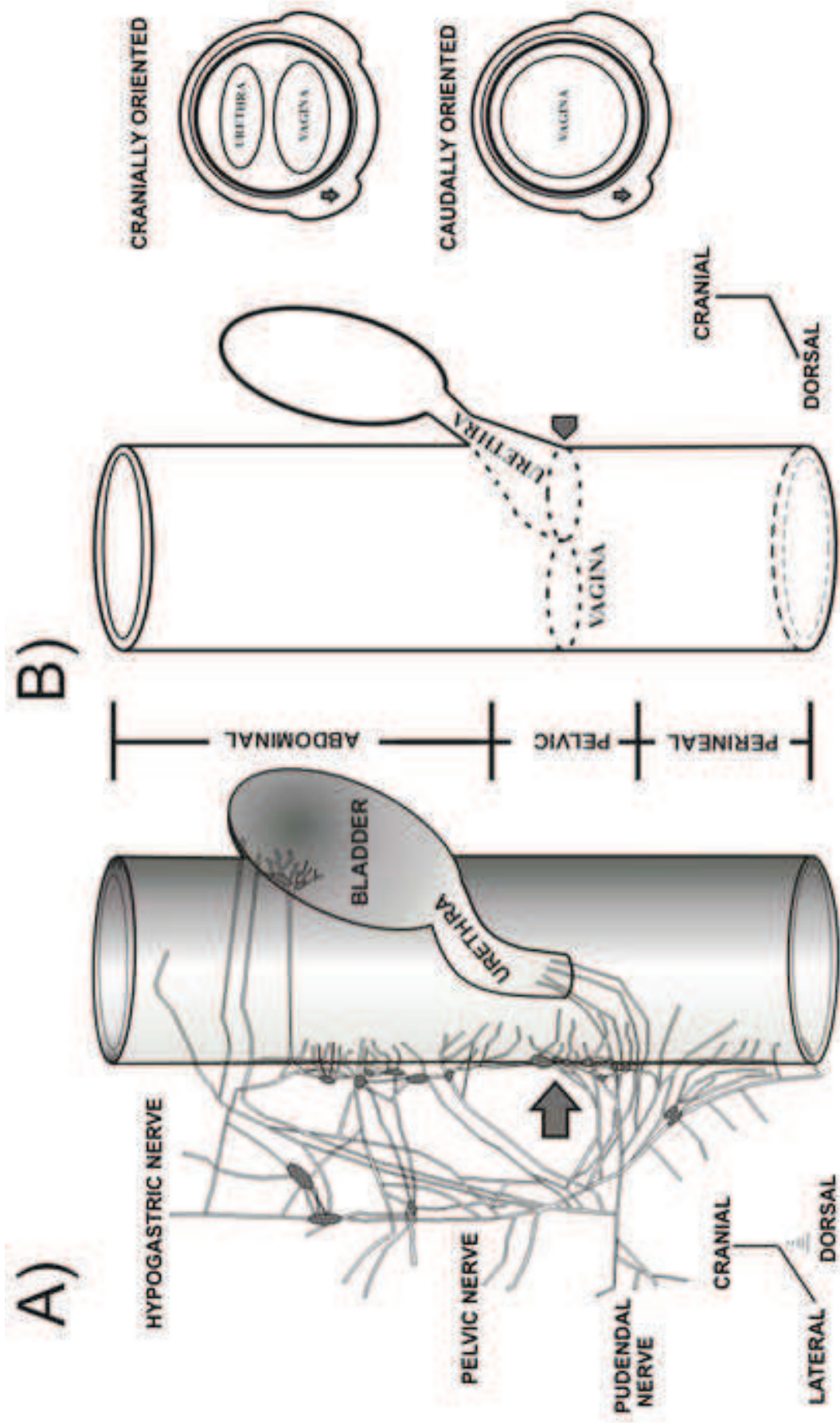


Figure 2  
[Click here to download high resolution image](#)



Figure 3  
[Click here to download high resolution image](#)

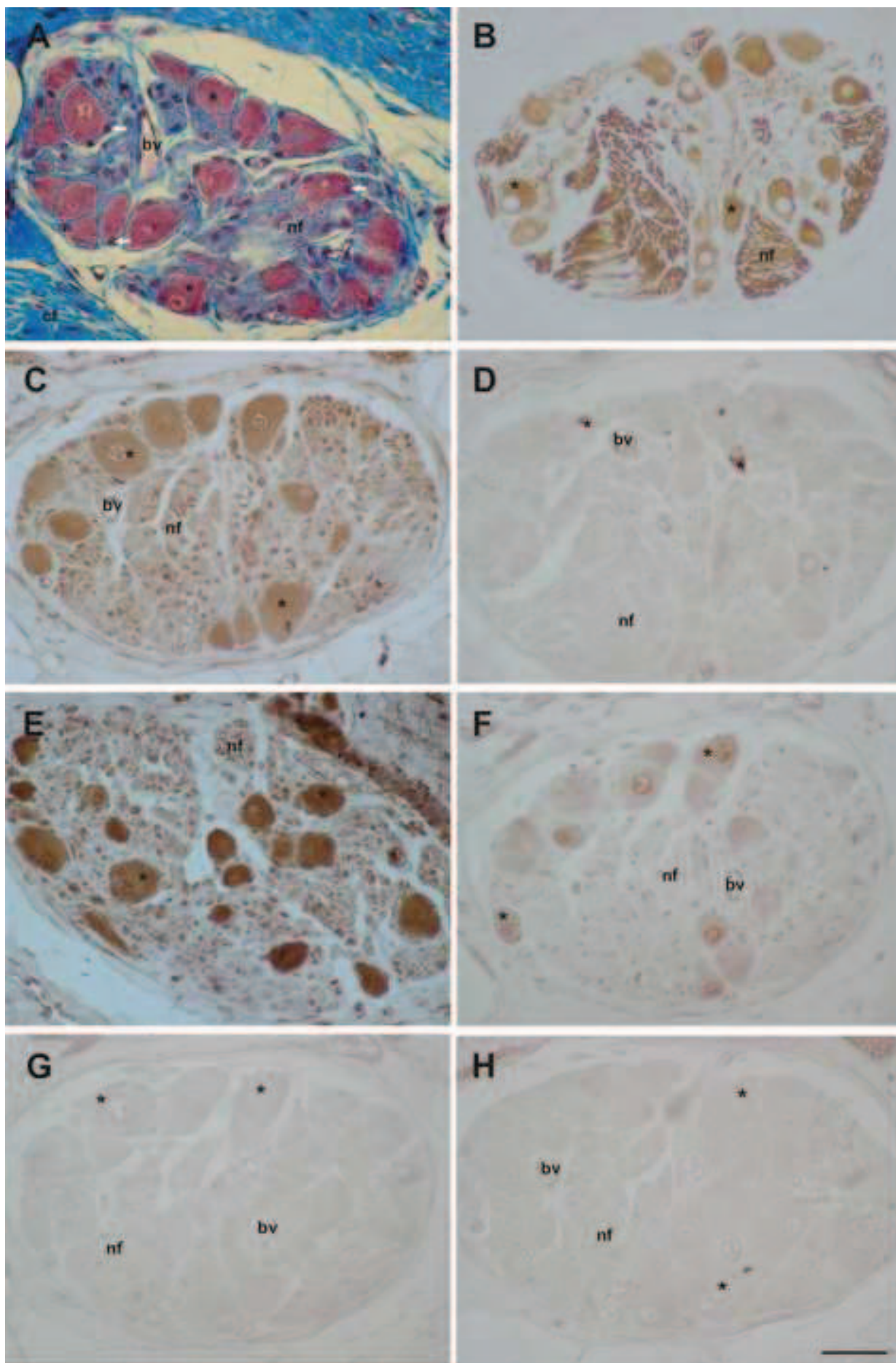
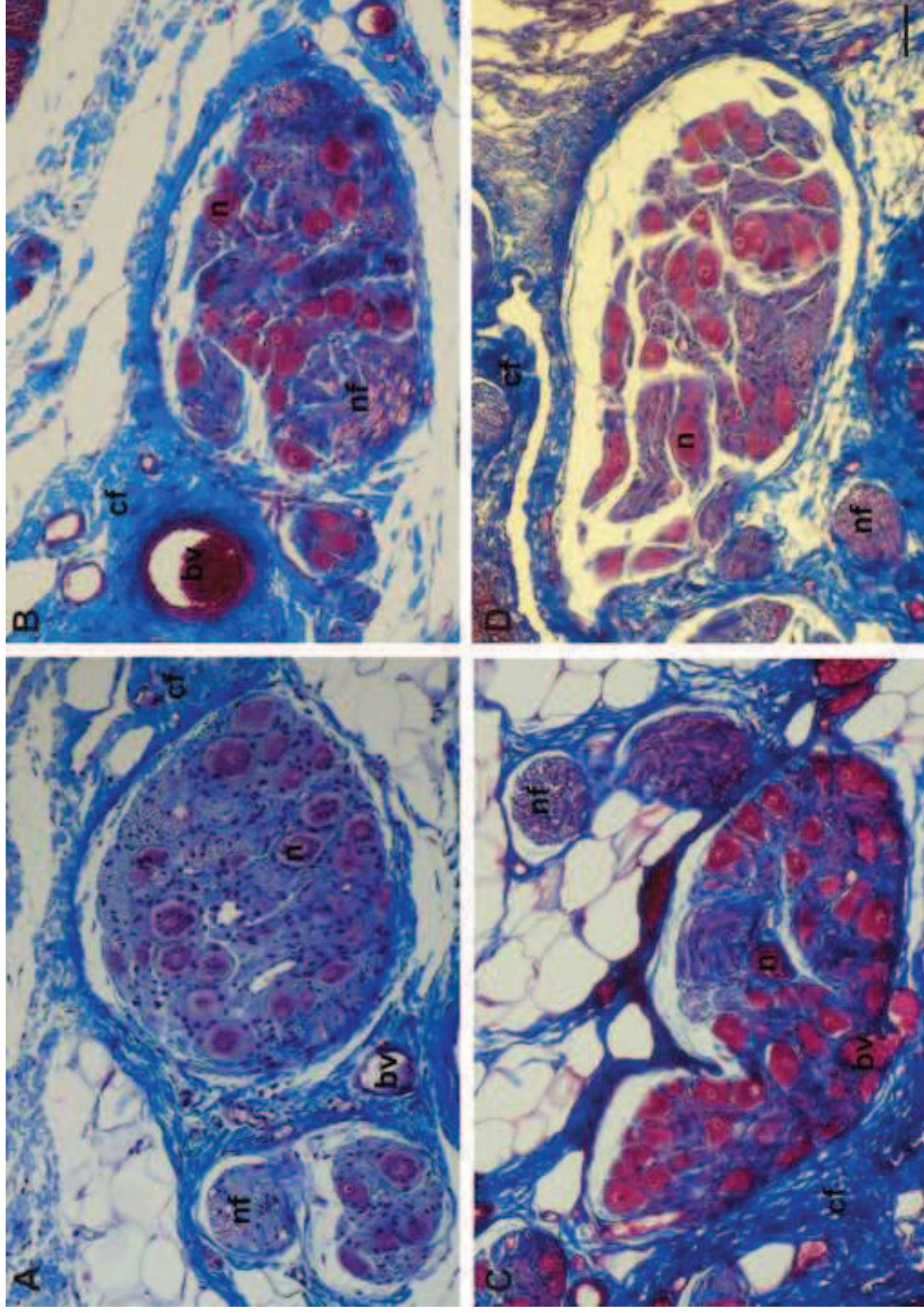


Figure 4  
[Click here to download high resolution image](#)



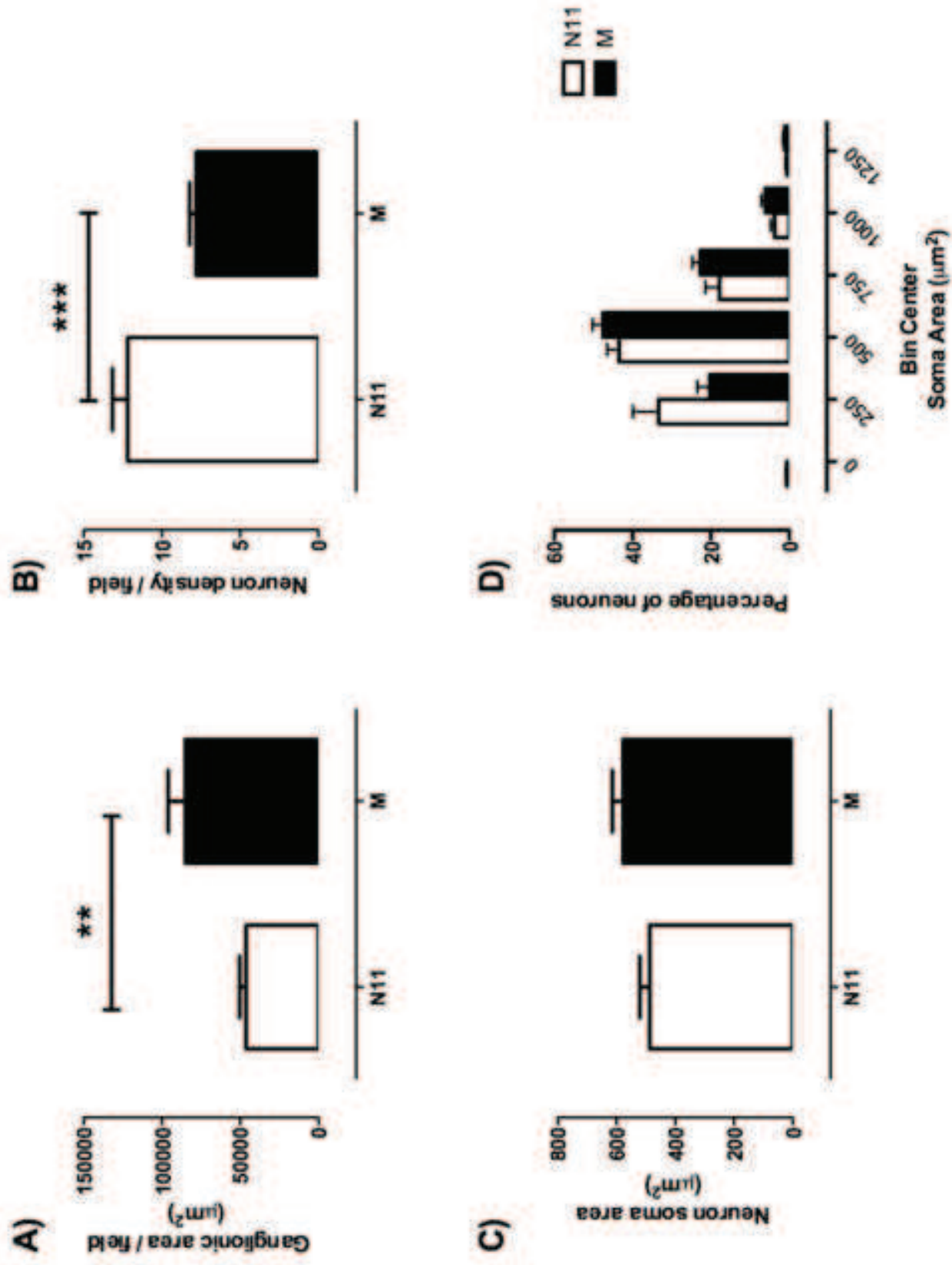
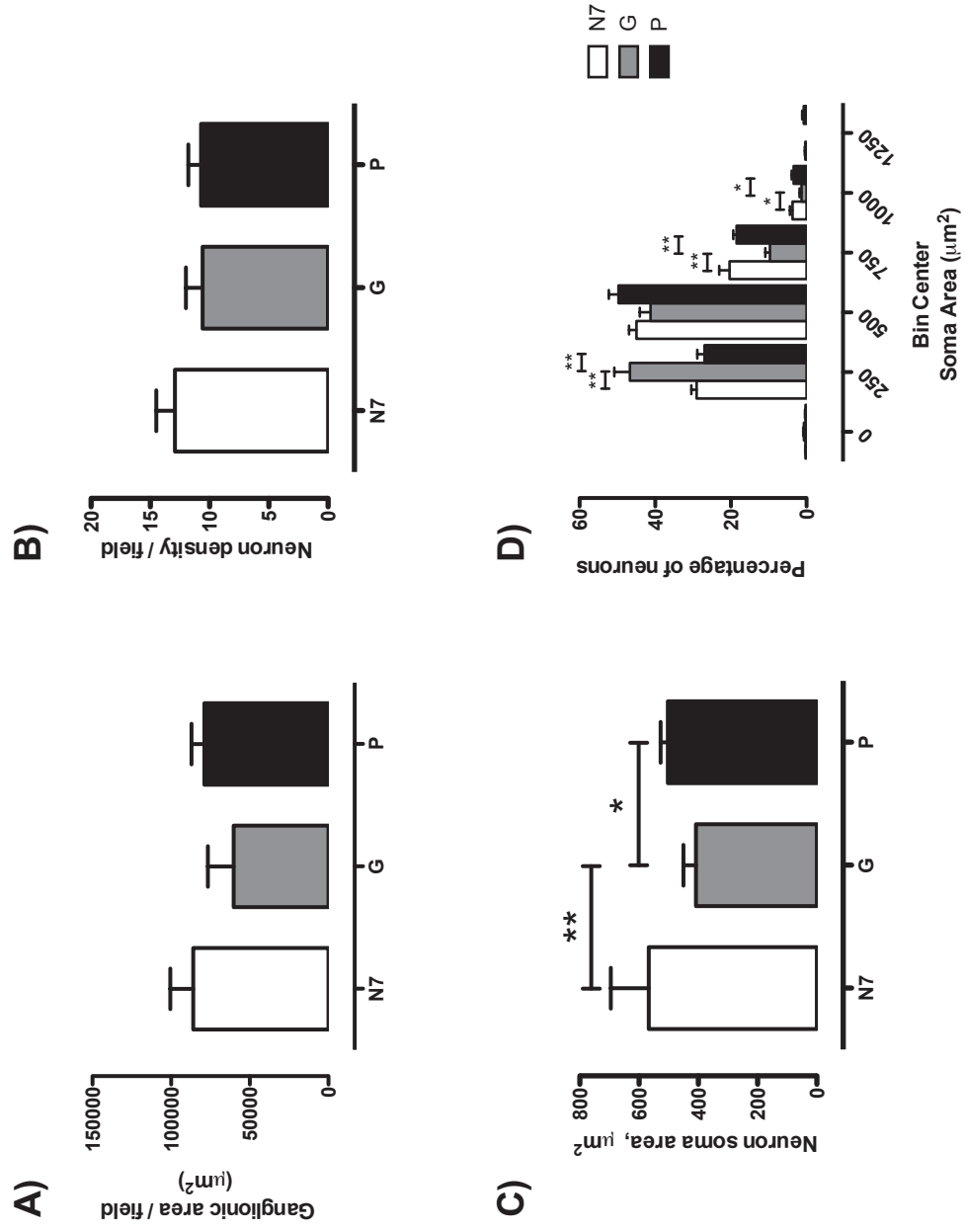


Figure 5



**Figure 6**



**Supplementary Figure 1**

[Click here to download Supplementary Material: Figure S1.jpg](#)

**Supplementary Figure 2**

[Click here to download Supplementary Material: Suppl Fig 2.pdf](#)

## **Multiparity Induces Histological Alterations in Urethral and Vaginal Walls of Rabbits**

Nicte Xelhuanzi<sup>a</sup>, Jorge Rodríguez-Antolín<sup>b</sup>, Estela Cuevas<sup>b</sup>, Leticia Nicolás<sup>b</sup>, Francisco Castelán<sup>b</sup>, and Margarita Martínez-Gómez<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>Doctorado en Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Tlaxcala, México

<sup>b</sup>Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, México

<sup>c</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México

**Corresponding author:** M. Martínez-Gómez, Ph. D., Departamento de Biología Celular y Fisiología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Phone and fax (52) 246 46 215 57, Tlaxcala, México, [marmag@biomedicas.unam.mx](mailto:marmag@biomedicas.unam.mx)

**Conflict of interest:** none

**Xelhuanzi Nicte:** Data collection and management.

**Rodríguez-Antolín Jorge:** Data collection and management, project development.

**Nicolás Leticia:** Data collection and management.

**Castelán Francisco:** Manuscript writing/editing.

**Cuevas Estela:** Manuscript writing/editing.

**Martínez-Gómez Margarita:** Manuscript writing/editing, funds getting, project development.

## Abstract

**Introduction:** Vaginal birth is a risk factor for causing both urinary incontinence and pelvic organ prolapse in women. In rats, vaginal birth or artificial vaginal distention decrease innervation, and striated or smooth musculature proportion, as well as increase connective tissue in urethra and vagina. We previously reported that 4 consecutive deliveries affects contractility and histology for bulbospongiosus and pubococcygeous muscles in rabbits, involucre in micturition and reproduction processes. It also modifies the urodynamics. Now, we investigate if multiparity also alters the tissue characteristics of the caudal urethra and pelvic vagina in rabbits. **Methods:** Caudal urethra (CU), cranial pelvic vagina (V1), and caudal pelvic vagina (V2) for nulliparas and multiparas were extracted, cut and stained with Masson's trichrome. Thickness of tissue layers (epithelium, intermediate, and external), and areas covered by cellular components (smooth or striated musculature, collagen, and blood vessels) were measured and compared among groups, using a bifactorial nested analysis of variance. **Results:** In comparison with nulliparas, multiparas showed a slimmer epithelium, a disrupted intermediate layer, and a less area covered by muscle fibers (smooth or striated) and collagen for CU and pelvic vagina. **Conclusion:** Multiparity disorganizes the tissue layers of the genitourinary tract. Our findings may be relevant to understand the effect of multiple vaginal births in the development of urinary incontinence and pelvic organ prolapse, likewise in the presence of sexual dysfunctions in women.

**Key Words:** Multiparity, rabbit, urethra, vaginal birth, vaginal histology.

## Brief summary

Multiparity (four deliveries) is related with alterations in the histology of caudal urethra and pelvic vagina in rabbits.

## Abbreviations

Caudal urethra (CU); cranial pelvic vagina (V1); caudal pelvic vagina (V2)

## Introduction

In women, vaginal birth is related to pelvic-floor dysfunctions such as urinary incontinence and pelvic organ prolapse [1-2]. Women with these pelvic pathologies show pelvic floor tissue laxity and loss of support of pelvic organs [3].

In rats, vaginal birth or vaginal distention, using an inflated intravaginal balloon, decrease innervation, and striated and smooth musculature proportion, likewise increase connective tissue in urethra and vagina [4-8]. This has been associated with a less strain of these pelvic organs [9-11] and incontinence [5]. However, the damage on the genitourinary tract has been most studied by artificial vaginal distention, and few studies have used the vaginal birth, in which ovarian hormones promote a natural tissue adaptation [12-14]. Thus, the damage on the genitourinary tract caused by simulated birth-trauma could be overestimated because the tissue preparation and biomechanical adaptations caused by gonadal hormones through pregnancy is absent. A gradual adaptation of vaginal tissues in the course of pregnancy and the postpartum period, probably also during lactation, has been proposed [9]. If these adaptations are incomplete (inadequate tissue preparation) or exceeded (fetus too large for passageway), a genitourinary tissue injury is caused [5, 9, 12-13].

We previously reported that multiparity in rabbits causes; 1) a lower twitch and tetanic tension force and a

less cross-sectional area of fibers from the bulbospongiosus and pubococcygeous muscles [15], 2) an uncoordinated activity of pubococcygeous, ischiocavernosus, and bulbospongiosus muscles during micturition [15], and 3) alterations in urodynamics variables (threshold and residual volume, voiding duration, and maximum pressure) [16]. The aim of our study was to describe and to compare tissue characteristics of the caudal urethra (CU) and the pelvic vagina (cranial, V1; caudal portions, V2) between nulliparous and multiparous rabbits. In women, rats, and rabbits, these regions contain the external urethral sphincter [17-18], a structure affected by vaginal distension [4,6-7]. Thus, the urethra fuses into pelvic vagina forming a unique duct [18].

## Materials and methods

### *Animals and Tissue Preparation*

Chinchilla-breed European female rabbits (16 h: 8 h/ light: dark cycle, housed individually, with food and water freely available) were used. Nulliparas (n = 6; not manipulated) and multiparas (n = 9; 60 mg/kg; Pfizer) at same age (12 months old). Multiple deliveries condition was established according the protocol using in previous studies, in which pregnant females can also be lactating [15-16]. After the fourth labor, females had twenty days of lactation. This study followed the guidelines of the

Universidad Autónoma de Tlaxcala, and the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

For both groups, the CU and V1-V2 were excised, fixed using a Bouin-Duboscq solution, embedded in paraplast X-tra, and transversally cut on a microtome into 7  $\mu\text{m}$  [18]. Sections were separated into four serial groups; each one was processed for Masson trichrome stain, Alcian blue stain, periodic acid-Schiff (PAS) stain, and immunohistochemistry.

Masson trichrome was used to determine the proportion of smooth muscle, connective, and vascular tissue. Alcian blue stain (pH 2.5) was useful for determining the activity of epithelial cells, and PAS stain was used to stain the basement membranes and the type of epithelial secretion. For immunohistochemistry, antigen retrieval was applied, and an anti-beta tubulin antibody (1:2000; Abcam, Cambridge, MA) was used incubating sections overnight at 4  $^{\circ}\text{C}$ . Visualization of immunoreactive tissue was done using the peroxidase Vectastain ABC method. Slides were counter stained with Mayer hematoxylin.

#### Tissue Analysis

Due to in previous studies, we found that the CU and V1 share the dorsal and ventral faces, and differences in the thickness among lateral left and lateral right portions of urethral and vaginal walls in rabbits were not found [18], in the current study a mean of measures from the lateral faces was done. For this, 20 sections (10 left and 10 rights) every 3000  $\mu\text{m}$  were selected for each region. Stained sections were photographed at a magnification of 200X and 400X. Thickness of tissue layer, the area covered by tissue components (smooth muscle, striated muscle, collagen, and blood vessels) were measured using the software AxioVision Rel 4.6 (Zeiss Software Inc.).

#### Statistical analysis

Thickness and areas among groups were compared using a t student or U Mann Whitney tests (JMP 4.0.4, SAS Institute Inc.). Tests were two-tailed, and differences were considered significant at a  $p \leq 0.05$ . Results are showed as mean  $\pm$  SE.

#### Results

For nulliparas, the CU and V1-V2 walls were composed of four layers, from lumen to periphery; mucosa (epithelium plus *lamina propia*), submucosa, smooth muscle layer, and external (striated fiber plus connective tissue). Multiparas showed a not delimited tissue layers, having only three layers; epithelium, intermediate (formed by *lamina propia*, submucosa, and smooth muscle layer), and external. Due to three multiparas suffered prolapse of uterus, oviducts, and vagina after the fourth delivery and died by a strong bleeding, the number of animals in this group was reduced to six. Oviducts passed into the uterus and stayed into the vagina.

#### Epithelium

For both nulliparas and multiparas, the epithelium was stratified squamous in the CU and V2, but cylindrical stratified with mucous and serous secretory activity in V1. In comparison with nulliparas, multiparas showed an epithelium with fewer strata, lower and shorter crypt-like invaginations, and epithelial cells with a small cytoplasm and a little secretory activity (Fig. 1a-c). Multiparity significantly reduced the thickness of epithelium in the CU ( $t=3.7$ ;  $P=0.0038$ ), V1 ( $t=7.6$ ;  $P<0.0001$ ), and V2 ( $t=4.4$ ;  $P<0.001$ ) (Fig. 2).

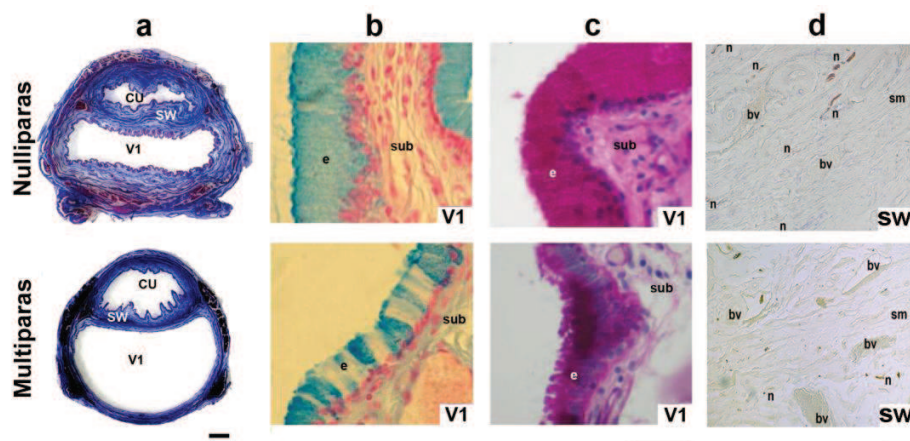


Figure 1. Histological characteristics of walls in the caudal urethra (CU) and cranial pelvic vagina (V1) for nulliparous and multiparous rabbits. **a.** Low magnification photographs showing the thickness of CU and V1 stained with Masson's trichrome. Scale bar = 800  $\mu\text{m}$ . **b and c.** Representative photomicrographs of transverse sections showing: epithelium (e) and submucosa (sub) in the V1 stained with blue alcian and PAS stain, respectively. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ . **d.** Immunoreactive nerves (n) of the intermediate layer in the shared wall (SW). Other abbreviators: smooth muscle (sm) and blood vessels (bv). Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ .

*Intermediate layer (lamina propria, submucosa, and smooth muscle layer)*

For nulliparas, the intermediate layer contained smooth muscle fibers oriented in two directions, internal fibers with longitudinal orientation and external fibers circularly oriented in the CU. Both distributions of muscle fibers were intermixed in V1-V2. For multiparas, the three layers were intermixed (intermediate layer). Thickness of intermediate layer was similar among nulliparas and multiparas in the three analyzed regions. However, multiparity significantly reduced the area covered by smooth musculature in CU (U=2; P=0.008), V1 (t=3.3; P=0.008), and V2 (t=2.7; P=0.0203), without affect the area covered by collagen. However, the area covered by blood vessels in multiparas was only significantly increased in V1 (t=3.6; P=0.004), and moderately reduced in V2 (U=7; P=0.0931) (Fig. 3).

*Shared wall*

For both groups, the dorsal face of the CU and the ventral face of the V1 were shared (Fig. 1a). For nulliparas, this shared wall was composed of five layers (mucosa, submucosa, smooth muscle layer obliquely oriented, submucosa, and mucosa). For multiparas, this layer was only composed of three layers (epithelium, intermediate layer, and epithelium). Less neural fibers (beta tubulin III positive) for multiparous were observed (Fig. 1d).

*External layer*

For both groups, this layer was composed of dense and irregular connective tissue, a venous plexus, and a fine layer of striated muscle fibers with circular orientation in all regions. Thickness of external layer was similar among nulliparas and multiparas in the CU and V2 regions, but moderately reduced in V1 (t=2.0; P=0.06) (Fig. 4). Multiparity significantly reduced the area covered by smooth musculature in the CU (t=2.7; P=0.0193), V1 (t=4.6; P=0.0009), and V2 (U=1; P=0.004). The area covered by collagen was significantly lower in the CU (t=2.9; P=0.0134) and V1 (t=4.0; P=0.0025) for multiparas than nulliparas, but not in the V2. The area covered by blood vessels in multiparas was only significantly decreased in the V2 (t=2.6; P=0.0241) (Fig. 4).

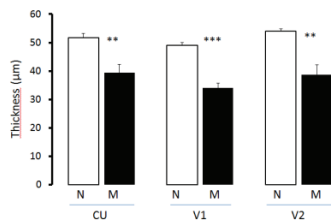


Figure 2. Thickness of epithelium along the caudal urethra (CU), cranial pelvic vagina (V1), and caudal pelvic vagina (V2) for nulliparous (N) and multiparous (M) rabbits. \*\*P=0.001, \*\*\*P=0.0001

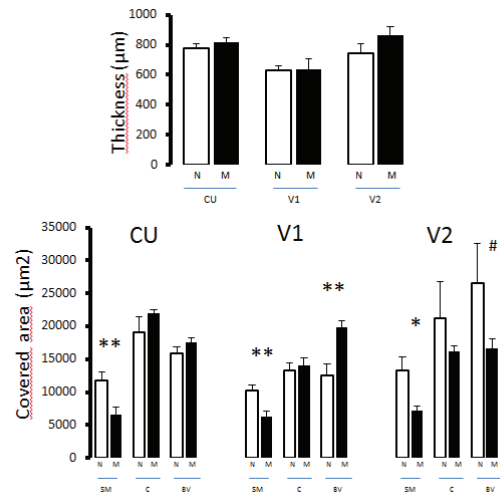


Figure 3. Thickness of intermediate layer (upper), and area covered by smooth muscle (SM), collagen (C), and blood vessels (BV) (down) along the caudal urethra (CU), cranial pelvic vagina (V1), and caudal pelvic vagina (V2) for nulliparous (N) and multiparous (M) rabbits. \*P=0.01, \*\*P=0.001, \*\*\*P=0.0001, and #P=0.09.

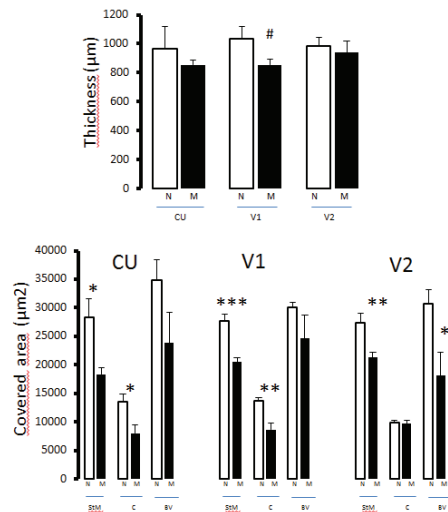


Figure 4. Thickness of external layer (upper), and area covered by striated muscle (StM), collagen (C), and blood vessels (BV) (down) along the caudal urethra (CU), cranial pelvic vagina (V1), and caudal pelvic vagina (V2) for nulliparous (N) and multiparous (M) rabbits. \*P=0.01, \*\*P=0.001, \*\*\*P=0.0001, and #P=0.06.

**Discussion**

In rabbits, multiparity: i) disorganized the tissue layers in the CU, V1 and V2 regions; ii) affected the secretion of epithelium in CU and pelvic vagina; iii) reduced the area covered by musculature (smooth and striated) in all regions; iiiii) decreased the area covered by collagen in the external layer of DU and V1 regions; and iiiiii) reduced the innervation in the shared wall between CU and V1. In concordance, other studies have found that a single vaginal

birth decrease muscular fibers; and increase collagen of urethra [7] and vagina [14] walls in rats. Moreover, simulated birth trauma induces a reduction in the smooth and striated musculature in urethra [4-6], and a less number of ganglion cells in the neural plexus caudal-lateral to the vagina in rats [4]. The loss of innervation that we observed in the shared wall between CU and V1 is in agreement with other studies, which have reported that vaginal birth and simulated birth trauma decrease the number of nerve fibers of the urethra in rats [7]. Thus, innervation could be important to the contraction of urethra and vagina walls, and the continence of urine. The innervation could be also related with the changes in the epithelial secretion that we found. In this regard, it has been shown that women with sexual dysfunctions (dryness, lack of lubrication or desire, pain, and sexual dissatisfaction) have fewer nerves along the vagina than women without these alterations [19]. Moreover, atrophied vagina in multiparous females could be more susceptible to bacterial and fungal infections [20]. Data is needed that analyze the cervical-vaginal fluid, and its possible participation in gynecological infections, because postpartum infections are related with preventable maternal morbidity and mortality not only in developing countries but in developed countries as well [21]. Although, urinary incontinence for multiparas was not tested, 30% of them had pelvic organ prolapse. This suggests that changes in histological characteristics of CU and pelvic vagina induced by multiparity could be related with a major probability to get pelvic organ prolapse.

It is possible that the effects on the histology of the genitourinary tract induced by vaginal birth could be more reasonable than those observed after artificial vaginal distention. Vaginal birth implicates a natural tissue adaptation of the urethra and vagina walls given by ovarian hormones [12-14], which participate in the process of recovering of biomechanical properties of these reproductive structures. Thus, vaginal distension promotes a less expression of neural nitric oxide synthase and calveolin-3, involucre in the contraction of the striated musculature in the urethra than vaginal birth [5]. It is necessary to increase the number of studies focused to distinguish the effects of vaginal birth on the genitourinary tract.

It is known that pelvic organ prolapse and urinary incontinence are common in women after vaginal delivery [22-23], and that postpartum is a period of time in which recovery of tissues can occurs [24]. However, these pelvic dysfunctions can persist after lactation suggesting a stronger damage of pelvic tissues. In our experimental design, multiparous females carried out the complete lactation (period obviated in other studies done in animal models), indicating that the tissue alterations were not recovered during this time. Although, it is not known the participation of hormones during lactation on the recovery of tissue properties, the early initiation and increased frequency of breast-feeding decrease the amount of blood loss after placental delivery in women [25]. Also, breast-feeding women are known to be hypo-estrogenic [26], although there is not an association between breast-feeding and a concurrent decrease in postpartum urinary incontinence occurrence [27].

And the administration of oxytocin (a hormone with high levels during lactation) improves the vaginal atrophy in postmenopausal women [28]. Using this experimental design, we have previously reported that multiparity affects the activity of striated muscles involved in reproduction and micturition process, and urodynamic parameters in rabbits [15-16]. This suggests that the damage induced by repeated vaginal deliveries on the genitourinary tract was not recovered in multiparas after the lactating period. Data is needed that abound on the role of this particular hormonal period in the recovery of tissue characteristics of genitourinary tract after vaginal birth.

Our results could help to understand the effect of vaginal birth in the development of pelvic organ prolapse and urinary incontinence in women. Due to losses of innervation, smooth muscle, and connective tissue of vagina have been also found in women with these pelvic dysfunctions [29-32]. In addition, our results could be useful for analyzing the impact of vaginal birth in the vaginal atrophy, which has been related to dyspareunia, sexual dysfunction, and vaginal dryness in women [19, 20]. This suggests that vagina could be an indicator of genitourinary tract damage and not only a medium to evaluate pelvic floor muscle strength through vaginal palpation [33].

#### *Conclusion*

In a rabbit model, multiparity modifies the histological characteristics of DU and pelvic vagina (V1-V2). These changes may be related to the presence of pelvic organ prolapse in 30% of multiparous females. Due to rabbits are bigger than rats allow a better manipulation of tissues, being a good model for analyzing pathologies that affect urethra and vagina in females.

#### **Acknowledgements**

Authors thank PAPIIT-UNAM (IN2001303-3-MMG), and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of México (grant 105882-MMG, and fellowships 124858-JRA, 161249-IB) for financial support, Laura García Rivera for bibliographic assistance, and Dr. Ellis Glazier for editing this English-language text.

#### **References**

1. Machin SE, Mukhopadhyay S (2011) Pelvic organ prolapse: review of the aetiology, presentation, diagnosis and management. *Menopause Int* 17:132-136
2. Thüroff JW, Abrams P, Andersson KE, et al (2011) EAU guidelines on urinary incontinence. *Eur Urol* 59:387-400
3. Campeau L, Gorbachinsky I, Badlani GH, Andersson KE (2011) Pelvic floor disorders: linking genetic risk factors to biochemical changes. *BJU Int* 108:1240-1247
4. Lin AS, Carrier S, Morgan DM, Lue TF (1998) Effect of simulated birth trauma on the urinary continence mechanism in the rat. *Urology* 52:143-151

5. Sievert KD, Bakircioglu ME, Tsai T, Dahms SE, Nunes L, Lue TF (2001) The effect of simulated birth trauma and/or ovariectomy on rodent continence mechanism. Part I: functional and structural change. *J Urol* 166:311-317
6. Rocha MA, Sartori MGF, De Jesus Simões M, et al (2007) The impact of pregnancy and childbirth in the urethra of female rats. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 18:645-651
7. Rocha MA, Sartori MG, De Jesus Simões M, et al (2007) Impact of pregnancy and childbirth on female rats' urethral nerve fibers. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 18:1453-1458
8. Breyer BN, Wang G, Lin G, et al (2010) The effect of long-term hormonal treatment on voiding patterns during filling cystometry and on urethral histology in a postpartum, ovariectomized female rat. *BJU Int* 106:1775-1781
9. Alperin M, Feola A, Duerr R, Moalli P, Abramowitch S (2010) Pregnancy- and delivery-induced biomechanical changes in rat vagina persist postpartum. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 21:1169-1174
10. Prantil-Baun R, de Groat WC, Miyazato M, Chancellor MB, Yoshimura N, Vorp DA (2010) Ex vivo biomechanical, functional, and immunohistochemical alterations of adrenergic responses in the female urethra in a rat model of birth trauma. *Am J Physiol Renal Physiol* 299:316-324
11. Phull HS, Pan HQ, Butler RS, Hansel DE, Damaser MS (2011) Vulnerability of continence structures to injury by simulated childbirth. *Am J Physiol Renal Physiol* 301:641-649
12. Pessina MA, Hoyt RF, Goldstein I, Traish AM (2006) Differential effects of estradiol, progesterone, and testosterone on vaginal structural integrity. *Endocrinology* 147:61-69
13. Daucher JA, Clark KA, Stolz DB, Meyn LA, Moalli PA (2007) Adaptations of the rat vagina in pregnancy to accommodate delivery. *Obstet Gynecol* 109:128-135
14. Lowder JL, Debes KM, Moon DK, Howden N, Abramowitch SD, Moalli PA (2007) Biomechanical adaptations of the rat vagina and supportive tissues in pregnancy to accommodate delivery. *Obstet Gynecol* 109:136-143
15. Fajardo V, Pacheco P, Hudson R, Jiménez I, Martínez-Gómez M (2008) Differences in morphology and contractility of the bulbospongiosus and pubococcygeus muscles in nulliparous and parous rabbits. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 19:843-849
16. Martínez-Gómez M, Mendoza-Martínez G, Corona-Quintanilla DL, Fajardo V, Rodríguez-Antolín J, Castelán F (2011) Multiparity causes uncoordinated activity of pelvic- and perineal-striated muscles and urodynamic changes in rabbits. *Reprod Sci* 18:1246-1252
17. Colleselli K, Stenzl A, Eder R, Strasser H, Poisel S, Bartsch G (1998) The female urethral sphincter: a morphological and topographical study. *J Urol* 160:49-54
18. Rodríguez-Antolín J, Xelhuanzi N, García-Lorenzana M, Cuevas E, Hudson R, Martínez-Gómez M (2009) General tissue characteristics of the lower urethral and vaginal walls in the domestic rabbit. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 20:53-60
19. Pauls R, Mutema G, Segal J, et al (2006) A prospective study examining the anatomic distribution of nerve density in the human vagina. *J Sex Med* 3:979-987
20. Sturdee DW, Panay N (2010) Recommendations for the management of postmenopausal vaginal atrophy. *Climacteric* 13:509-522
21. Maharaj D (2007) Puerperal Pyrexia: a review. Part II. *Obstet Gynecol Surv* 62:400-406
22. O'Boyle AL, O'Boyle JD, Calhoun B, Davis GD (2005) Pelvic organ support in pregnancy and postpartum. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 16:69-72
23. Thom DH, Rortveit G (2010) Prevalence of postpartum urinary incontinence: a systematic review. *Acta Obstet Gynecol Scand* 89:1511-1522
24. Romano M, Cacciatore A, Giordano R, La Rosa B (2010) Postpartum period: three distinct but continuous phases. *J Prenat Med* 4:22-25
25. Sobhy SI, Mohame NA (2004) The effect of early initiation of breast feeding on the amount of vaginal blood loss during the fourth stage of labor. *J Egypt Public Health Assoc* 79:1-12
26. Burger HG, Hee JP, Mammers P, Bangah M, Zissimos M, McCloud PI (1994) Serum inhibin during lactation: relation to the gonadotrophins and gonadal steroids. *Clin Endocrinol (Oxf)* 41:771-777
27. Hvidman L, Foldspang A, Mommsen S, Nielsen JB (2003) Postpartum urinary incontinence. *Acta Obstet Gynecol Scand* 82:556-563
28. Jonasson AF, Edwall L, Uvnäs-Moberg K (2011) Topical oxytocin reverses vaginal atrophy in postmenopausal women: a double-blind randomized pilot study. *Menopause Int* 17:120-125
29. Kerkhof MH, Hendriks L, Brölmann HA (2009) Changes in connective tissue in patients with pelvic organ prolapse-a review of the current literature. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 20:461-474
30. Zhu L, Lang J, Jiang F, Jiang X, Chen J (2009) Vasoactive intestinal peptide in vaginal epithelium of patients with pelvic organ prolapse and stress urinary incontinence. *Int J Gynaecol Obstet* 105:223-225
31. Kati LM, Feldner PC, de Castro RA, et al (2010) Analysis of glycosaminoglycans in the parametrium and vaginal apex of women with and without uterine prolapse. *J Womens Health* 19:1341-1344
32. Hu JM, Wang L, Cheng X, Zhou LH, Li ZG (2012) Neuropeptide Y innervation in the vaginal mucosa among patients with pelvic organ prolapse. *Mol Med Report* 5:444-448
33. Bø K, Sherburn M (2005) Evaluation of female pelvic-floor muscle function and strength. *Phys Ther* 85:269-282



## General tissue characteristics of the lower urethral and vaginal walls in the domestic rabbit

Jorge Rodríguez-Antolín · Nicté Xelhuantzi ·  
Mario García-Lorenzana · Estela Cuevas ·  
Robyn Hudson · Margarita Martínez-Gómez

Received: 12 May 2008 / Accepted: 2 September 2008 / Published online: 27 September 2008  
© The International Urogynecological Association 2008

**Abstract** In European rabbits, the distal urethra (DU) opens into the anterior pelvic vagina forming a single canal by which females copulate, give birth, and urinate. We investigated whether the histological characteristics of the DU and the pelvic and perineal vagina are different. The DU and vagina of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) were cut and stained with hematoxylin–eosin and Masson's trichrome ( $n=3$ ). Data were compared by using Friedman's ANOVA for repeated measures. The walls of the DU and vagina are composed of mucosa, submucosa, smooth muscle, and an external layer. Differences in tissue characteristics of the mucosa, orientation of the smooth muscle fibers, components of the external layer (connective tissue, blood vessels, and striated musculature), and thickness of the tissue layers were found among

regions. The lack of histological homogeneity along the urethra and vagina possibly reflects differences in the functions of each segment.

**Keywords** Female rabbit · Masson's trichrome · *Oryctolagus cuniculus* · Urethra · Urogenital tract · Vagina

### Abbreviations

DU Distal urethra  
V1 anterior pelvic vagina  
V2 posterior pelvic vagina  
V3 anterior perineal vagina  
V4 posterior perineal vagina

J. Rodríguez-Antolín · N. Xelhuantzi · E. Cuevas  
Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta,  
Universidad Autónoma de Tlaxcala,  
Tlaxcala, México

M. García-Lorenzana  
Departamento de Biología de la Reproducción,  
Área de Neurociencias,  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,  
Distrito Federal, México

R. Hudson  
Departamento de Fisiología y Biología Celular,  
Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
Distrito Federal, México

M. Martínez-Gómez (✉)  
Unidad Periférica Tlaxcala,  
Departamento de Fisiología y Biología Celular,  
Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
Tlaxcala, México  
e-mail: marmag@garza.uatx.mx  
e-mail: marmagabo@yahoo.com

### Introduction

In human females, reproductive and urinary tracts are separated and each has its own functions [1–4]. However, these tracts share some histological characteristics, so that both tracts can be affected by similar events, i.e. parturition, menopause, and ageing [5]. Despite this there are few studies focused on the investigation of the histology of these tracts.

In most mammals, like rabbits, the vagina and urethra fuse to form a final common pathway by which females urinate, copulate, and give birth [6]. This provides a good model to study the relation between reproductive and urinary tracts. Particularly, females of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) have been frequently used to investigate the anatomy and physiology of the genitourinary system. For example, they have been useful to describe the pelvic and perineal striated musculature [6, 7], to study the effects of gonadal hormones [8–10] and neurotransmitters [11–14] on the physiology of the urinary

and reproductive organs, and to describe the histology of both urethra and vagina walls [15–18], although this last has not been done in detail along the complete tracts.

Although in rabbits both the urethra and vagina have a close anatomical relation, the histology seems not to be the same. Some studies that have focused on particular cell types or layers have suggested that there is no histological or functional uniformity along these tracts. The upper two-thirds of the vaginal duct are lined with a monostratified epithelium characterized by ciliated cells, with frequent crypt-like invaginations, and that the lower third of the surface of the vaginal wall is covered by a stratified squamous epithelium [16, 17]. Steroid hormones have been shown to differentially regulate NOS and arginase activities of the proximal and distal regions of the vagina [14]. These findings indicate that the histological characteristics along the urethra and vagina tracts are not continuous.

The aim of our study was to describe and compare general tissue characteristics of the distal urethra and the pelvic and perineal vagina in adult virgin female rabbits so as to give a more complete and unified picture of the histological characteristics of these vital structures. We hope the results obtained in this study will help future workers to discriminate the regional actions of gonadal hormones, neurotransmitters, or drugs on these tracts.

## Materials and methods

### Animals and tissue preparation

Three virgin chinchilla-breed European rabbits 6–12-months old and weighing 3–4 kg were used. They were maintained in a 16 h:8 h light–dark cycle and housed in

individual stainless steel cages (50×60×40 cm), with food (Purina® rabbit chow) and water freely available. Throughout the study, animals were maintained and treated according to the Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals, National Institutes of Health, USA.

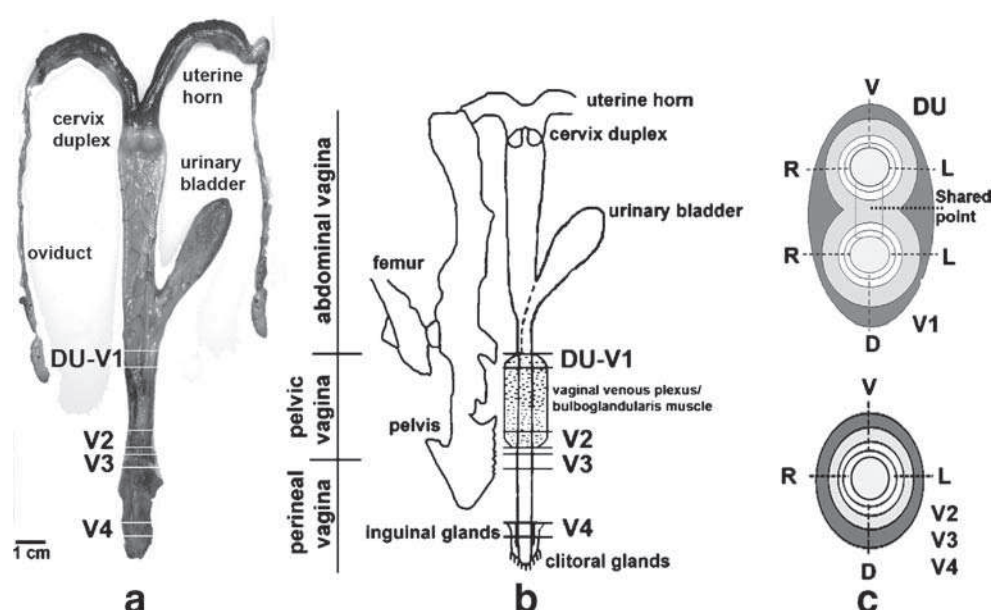
Animals were killed with an overdose of sodium pentobarbital (ip, 60 mg/kg; Pfizer). The distal urethra and the pelvic and perineal vagina were excised (Fig. 1), fixed with Bouin Duboscq solution, and embedded in paraplast X-tra (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). The tissue was cut on a microtome, with 7- $\mu$ m transverse sections mounted three per slide. The sections were grouped to form four intercollated series. Two series were used for this study; one stained using the hematoxylin–eosin method and the other using Masson's trichrome method. The hematoxylin–eosin-stained sections were used for qualitative analysis of the tissue structure and the Masson-stained sections for quantitative analysis.

### Tissue analysis

For the qualitative description, the layers of the distal urethra, anterior pelvic vagina, posterior pelvic vagina, anterior perineal vagina, and posterior perineal vagina were distinguished based on their tissue characteristics (Fig. 1). For this, sections were examined using an optical microscope (Zeiss Axio Imager A1) at a magnification of ×400 and photographed with an Olympus camera with a resolution of 5.1 megapixels.

For the quantitative analysis, the Masson-stained sections were divided into the five regions shown in Fig. 1; the distal urethra, anterior and posterior pelvic vagina, and anterior and posterior perineal vagina. Each region was represented by at least 100 slides and 300 sections. One section of every 30 was selected to yield ten sections per

**Fig. 1** **a** Photograph of the freshly dissected reproductive tract of a nulliparous adult female rabbit, **b** diagram of the pelvic region showing the position of the lower urogenital tract, and **c** representative diagrams of transverse sections from; (*upper*) the distal urethra (DU), and the anterior pelvic vagina (V1) shared the intermediate wall; (*lower*) the posterior pelvic vagina (V2), anterior perineal vagina (V3), and the posterior perineal vagina (V4)



region for analysis. For this, each section was divided by four virtual transects through the ventral, dorsal, right, and left lateral faces [4, 9] (Fig. 1). The thickness of each tissue layer was measured using AxioVision Rel 4.6 (Zeiss Software Inc). However, only the lateral faces were used for the analysis because of the difficulty caused by the distal urethra and anterior pelvic vagina sharing the same wall at their ventral and dorsal faces (Fig. 1). This meant that the delimitation of all tissue layers for all five regions of the tract was only possible for the lateral faces.

To assess the degree of variability of wall thickness among the three animals, coefficients of variation were calculated for each region from the standard deviation of the data divided by the mean. Coefficients close to zero indicated little variation and values close to one signified a substantial variation. The coefficient of variation for the thickness of the wall for each of the five regions among females ranged 0.112–0.301. Thus, the data from the three females were pooled for statistical

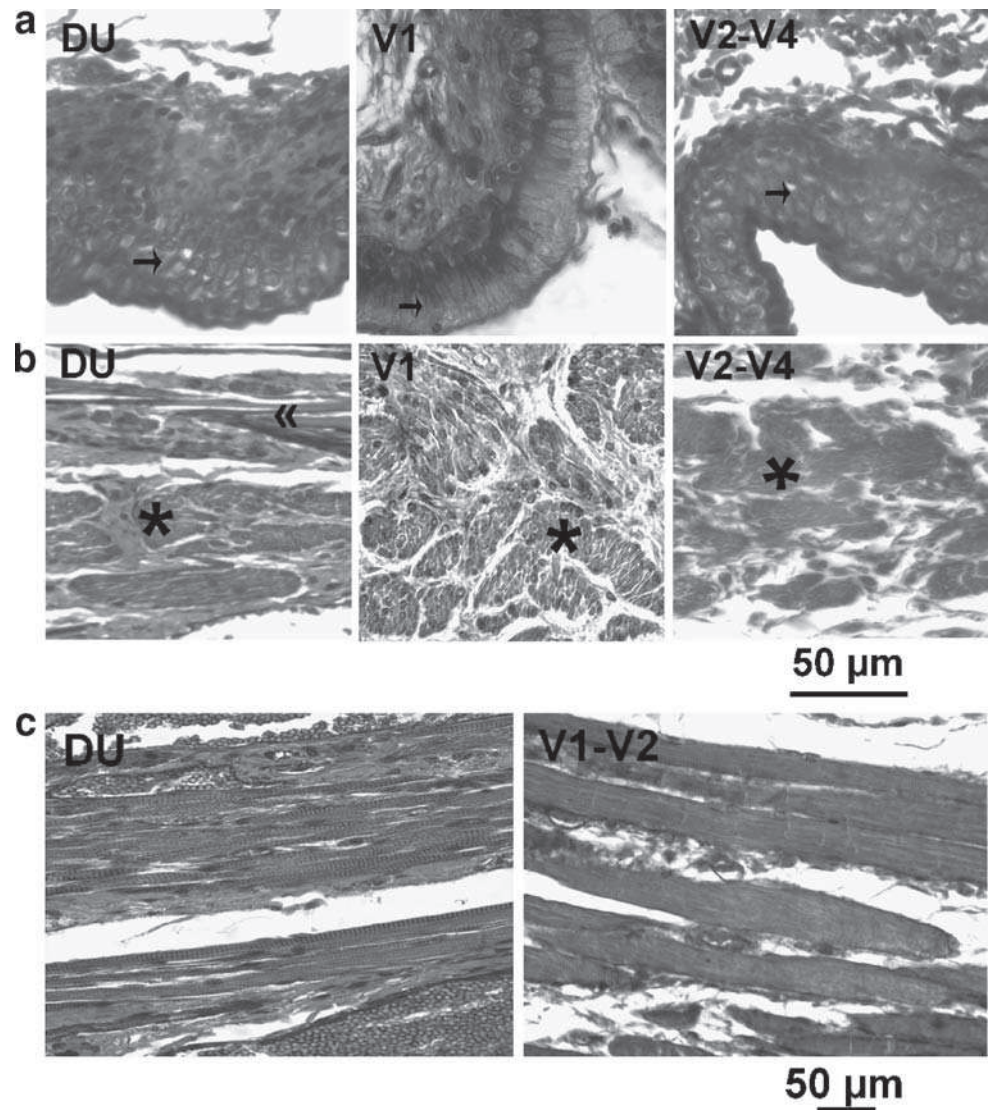
analyses. The values of the thickness of each tissue layer for the lateral faces obtained from the ten sections for each region were combined, given that the two sides showed similar thickness of the tissue layers. Values for each layer across regions were compared using the Friedman ANOVAs for repeated measures from the same subjects, followed by Dunn's multiple comparisons (GraphPad Prism 5, Software Inc.). Tests were two-tailed, and differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## Results

### Qualitative description

The walls of the distal portion of the urethra and of the pelvic and perineal vagina were composed of four layers from lumen to the periphery: mucosa, submucosa, smooth muscle, and external.

**Fig. 2** Photomicrographs of transverse sections stained with Masson's trichrome showing the mucosa layer (a) (arrows), smooth muscle layer (b), and external layer (c) of the distal urethra (DU), anterior pelvic vagina (V1), posterior pelvic vagina (V2), anterior perineal vagina (V3), or posterior perineal vagina (V4). Smooth muscle fibers with circular (double arrow) and longitudinal orientation (asterisk)



### Distal urethra

The mucosa was composed of a stratified squamous epithelium and a lamina propria of dense connective tissue (Fig. 2, Table 1). The submucosa was composed of fibrous connective tissue and the smooth muscle layer consisted of two sublayers: one inner with a longitudinal orientation and other outer with a circular orientation (Fig. 2, Table 1). The external layer was composed of three tissues; dense irregular connective tissue and a conspicuous venous plexus separated into two parts by striated muscle fibers. These fibers have circular orientations that surround both the urethra and vagina (Figs. 2 and 3, Table 1).

The dorsal wall of the urethra was attached to the ventral wall of the vagina and the dorsal wall of the vagina was located adjacent to the rectum. The lateral walls of the

urethra and vagina were adjacent to the obturatorius internus and coccygeus muscles and the ventral aspects of the urethra and vaginal tract were adjacent to the obturatorius internus muscle and to the pubic bone (Fig. 3). At the shared faces, five layers, from the urethral lumen to the vaginal lumen, were found; mucosa, submucosa, smooth muscle, submucosa, and mucosa. The mucosa and submucosa layers had a histological organization in common with the distal urethra and pelvic vagina. In the smooth muscle layer, the muscle fibers were mixed with connective tissue and had an oblique orientation.

### Pelvic vagina

In the anterior region, the mucosa consisted of a cylindrical stratified epithelium and a lamina propria of dense, irregular

**Table 1** Characteristics of tissue layers comprising the walls of the distal urethra and vagina

	Distal urethra	Pelvic vagina	Perineal vagina
Mucosa			
Folds present	Abundant	Abundant	Abundant
Epithelium	Squamous cells	Cylindrical in V1—squamous in V2	Squamous cells
Lamina propria	Dense, irregular connective tissue	Dense, irregular connective tissue with numerous fibroblasts, leucocytes, and macrophages	Dense, irregular connective tissue with numerous interwoven collagen fibers oriented in all directions
Cytoplasm affinity	Acidophilic	Acidophilic and neutral	Very acidophilic
Secretion	No	Two types; serosa and mucosa	Only serosa type
Submucosa			
Components	Fibrous connective tissue	Fibrous connective tissue	Fibrous connective tissue
Cytoplasm affinity	Acidophilic	Acidophilic	Acidophilic
Blood vessels	Numerous	Numerous	Numerous
Smooth muscle			
Components	Smooth muscle fibers mixed with collagen fibers oriented in two directions	Smooth muscle fibers mixed with collagen fibers and blood vessels oriented in three directions	Smooth muscle fibers mixed with blood vessels oriented in three directions
Orientation of fibers	An internal layer, longitudinally oriented, an external layer circularly oriented	Intermixed fibers with circular and longitudinal orientation in V1  Intermixed fibers with circular, longitudinal, and oblique orientation in V2	Intermixed fibers with circular, longitudinal, and oblique orientation
External layer			
Components	Dense and irregular connective tissue, a venous plexus, and a fine layer of striated muscle fibers	Dense and irregular connective tissue, a venous plexus, and a fine layer of striated muscle fibers	Dense and irregular connective tissue
Orientation of striated muscle fibers	Circular	Circular	Not present

Given the uniformity in the qualitative characteristics of the layers along the perineal vagina, we did not separate this region into its various subdivisions. Anterior (V1) and posterior (V2) pelvic vagina

connective tissue (Fig. 2, Table 1). The submucosa had a composition similar to the homologous layer of the distal urethra. The smooth muscle layer was composed of abundant, intermixed, smooth muscle fibers with both circular and longitudinal orientation (Fig. 2, Table 1). The external layer had an organization similar to the distal urethra with striated muscle fibers surrounding both the urethra and vagina (Figs. 2 and 3, Table 1). The posterior region differed from the anterior region in that the mucosa layer was composed of a stratified squamous epithelium (Fig. 2, Table 1) and the smooth muscle layer with intermixed fibers oriented in circular, oblique, and longitudinal directions (Fig. 2, Table 1). The external layer had an organization similar to the anterior pelvic vagina (Fig. 2, Table 1).

#### Perineal vagina

The mucosa (Fig. 2, Table 1) and submucosa layers of the anterior and posterior regions of the perineal vagina were organized the same as the distal urethra. The smooth muscle layer contained sparse fibers running intermixed in longitudinal, circular, and oblique directions and that were mixed with sinusoids (Fig. 2, Table 1). For both the anterior and posterior perineal vagina, the external layer was composed solely of dense, irregular connective tissue (Fig. 3, Table 1). In addition, in the posterior perineal vagina, the smooth muscle and the external layer were associated with a horseshoe-like layer of cartilage (Fig. 3).

#### Quantitative description

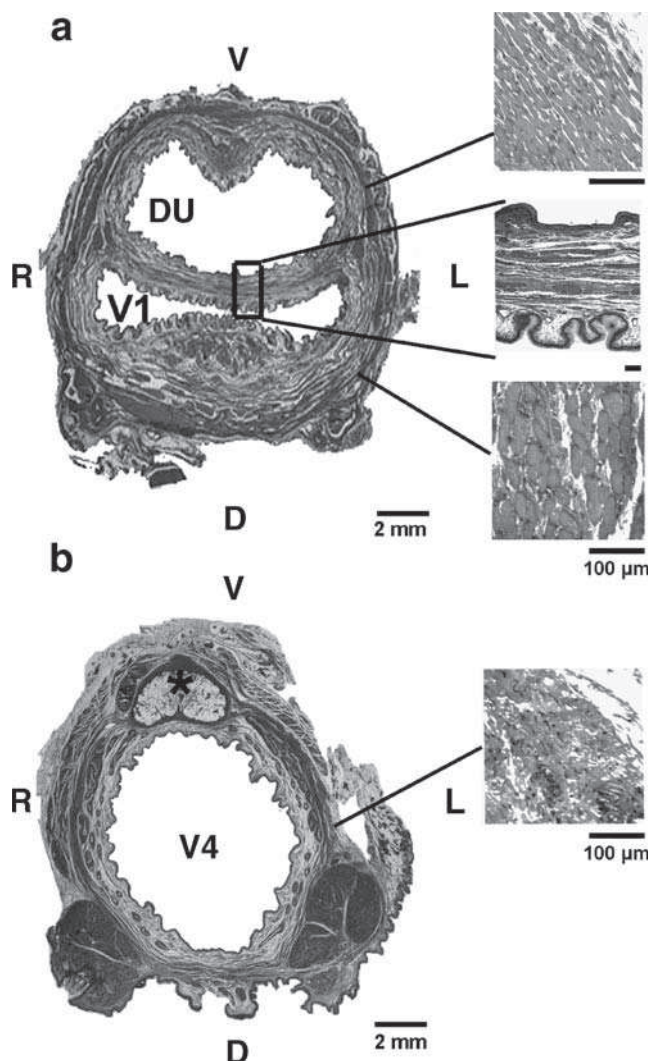
From the qualitative analysis, we found that the general characteristics of the lower urogenital tract varied along its length and differed across the five regions; distal urethra, anterior pelvic vagina, posterior pelvic vagina, anterior perineal vagina, and posterior perineal vagina. Thus, for the quantitative analysis, we grouped the values obtained for the thickness of each tissue layer according to each of these five regions.

The mucosa layer was significantly thinner for the distal urethra, increased toward the perineal vagina, and reached its greatest thickness in the posterior perineal vagina (Friedman's ANOVA for repeated measures:  $(X^2r)=102.4$ ,  $P<0.0001$ ). The submucosa was thinner for the distal urethra than for any region of the vagina ( $X^2r)=81.35$ ,  $P<0.0001$ ). The smooth muscle layer was significantly thinner for the anterior pelvic vagina, intermediate along the distal urethra and posterior pelvic vagina, and thickest for the anterior and posterior perineal vagina ( $X^2r)=200$ ,  $P<0.0001$ ). The external layer was significantly thinner for the anterior perineal vagina, intermediate along the distal urethra and posterior pelvic vagina, and thickest for the

anterior and posterior pelvic vagina ( $X^2r)=169.5$ ,  $P<0.0001$  (Fig. 4).

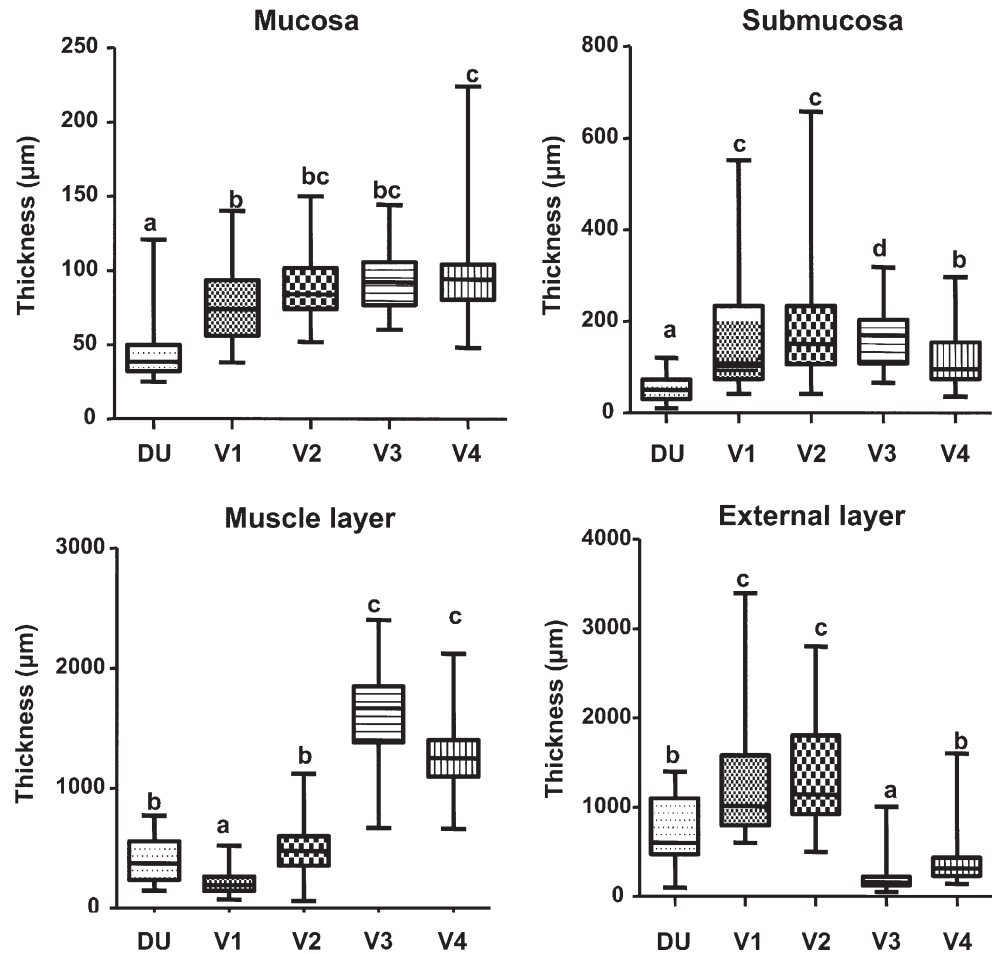
#### Discussion

To our knowledge this is the first comprehensive study of the various tissue layers forming the walls of the distal urethra, and the pelvic and the perineal vagina in the European rabbit. We found that the general characteristics varied along the distal urethra and the pelvic and the perineal vagina, probably related to their functions.



**Fig. 3** Photomicrograph of transverse sections stained with Masson's trichrome. **a** Distal urethra (DU), anterior pelvic vagina (V1) and **b** posterior perineal vagina (V4). Small pictures striated fibers from the external layer (upper and lower pictures), shared point between the dorsal (D) wall of the DU and the ventral (V) wall of the V1 (central picture), and only connective tissue in the external layer of the V4 (the lowest picture). Right (R) and left (L) lateral walls. Horseshoe-shaped cartilage (asterisk)

**Fig. 4** Thickness of the four tissue layers from the distal portion of the urethra (*DU*), anterior pelvic vagina (*V1*), posterior pelvic vagina (*V2*), anterior perineal vagina (*V3*), and posterior perineal vagina (*V4*). *Central horizontal lines* give the medians, the upper and lower limits of the *boxes* give the interquartile ranges, and the “*whiskers*” give the absolute ranges. *Letters* indicate significant differences among the regions reported by Dunn’s multiple paired comparisons following Friedman’s ANOVAs



If we compared the urethral and vaginal histological characteristics found in rabbits with other species, we found that the mucosa for the distal urethra, the posterior pelvic vagina, and the perineal vagina was composed of a stratified squamous epithelium with frequent crypt-like invaginations. Moreover, the thickness of the mucosa and submucosa layers was thinner along the distal urethra. Our observation about the type of epithelium in the vagina is in disagreement with previous reports [16], where only the lower third of the vagina contained stratified squamous epithelium whereas the rest was a monolayer. Additional studies have shown that a squamous-columnar junction occurs at the level of the pubic symphysis and that a stratified squamous epithelium covers the lower third of the surface of the vaginal wall [17, 18]. For its part in women, the urethral mucosa consists of a transitional epithelium in the proximal portion and of a nonkeratinized squamous epithelium in the distal portion [1, 2]. For the vagina wall, both in humans and rats, it has a stratified squamous epithelium [3, 4, 12, 19, 20] followed by a lamina propria composed of collagen and elastin.

For the smooth muscle layer, we observed a circular distribution of smooth muscle fibers in the outer and a longitudinal distribution in the inner muscle layer along the

distal urethra and vaginal tract. This finding contrasts with that reported by Hickey et al. [15] who described an inverse arrangement of the muscle layer in the urethra, with a circular distribution of smooth muscle fibers in the inner and a longitudinal distribution in the outer, although they did not specify for which portion of the urethra. However, our finding is consistent with previous reports in rats and guinea pigs such as an outer circular distribution and an inner longitudinal distribution of fibers in the smooth muscle layer along the distal urethra and vagina [21–23]. We found a thinner smooth muscle layer along the distal urethra and pelvic vagina. This finding is in contrast with previous reports made on juvenile females, where the upper and the middle third of the vagina were characterized by an abundance of smooth muscle, whereas the lower third was composed of numerous sinusoids scattered among bundles of smooth muscle [18].

For the external layer, we found striated muscle fibers in the external layer (commonly composed of connective tissue and blood vessels) of the distal urethral and the pelvic vagina wall. Thus, the striated muscle forms part of both the urethral and vaginal walls. These could be part of the bulboglandularis muscle, described in the European

rabbit by our group previously [7]. The thickness of this tissue layer was thinner along the perineal vagina where striated musculature was not observed. In humans and rats, the outer layer of the urethra and vagina wall has been known for many years as the tunica adventitia, composed of loose connective tissue and a large plexus of blood vessels [3, 4, 12, 20]. The striated musculature that has been observed was described as apparently adjacent to the urethral wall and semidetached from the vagina causing this musculature to be named the external urethral sphincter [1, 2, 24]. However in concordance with our finding, in the female rat other authors have described that the striated musculature that surrounds the urethra forms part of the urethral wall [21]. In the female rabbit, the gross anatomy of the external sphincter has not been described and only schematic diagrams exist of the arrangement of the striated musculature surrounding the urethra and vagina [25].

Possible functional implications. Even though in this study we did not test whether the histological characteristics found for the distal urethra and the pelvic and perineal vagina are related to the various functions of these regions, we can suggest that in the rabbit this is the case. For example, we can emphasize that the numerous rugae in the mucosa of the distal urethra and the vagina could participate in the opening and closing of the lumen of these two structures, which together with the abundant, dense and irregular connective tissue of the submucosa layer and striated muscle in the external layer may help maintain urinary continence during bladder filling, promote urine expulsion [26], and the transit of fetuses during parturition. Additionally, the striated muscle fibers in the distal urethra and pelvic vagina could act similarly to the external sphincter of the urethra during micturition, conferring greater contractile capacity to these regions [18]. In the pelvic vagina, they might also help control the transit speed of fetuses during parturition, avoiding tearing of the vagina and associated structures [25]. For its part, differences in the organization of smooth muscle and the presence or absence of striated muscle along the tract might be associated with regulation of the diverse forms of urination in this species [27]. The greater thickness of the mucosa layer of the perineal vagina might be associated with vaginal lubrication facilitating copulation [3, 4] or the expulsion of the young at parturition.

## Conclusions

Our results provide the first general overview of the histological organization of the distal urethra and the pelvic and perineal vagina in the European rabbit (*O. cuniculus*). This information should be useful in future studies focused on the analysis of the histological changes in the distal

urethra and the pelvic and the perineal vagina walls caused by age and parturition. Likewise, our findings could contribute to a better understanding of the role of neurotransmission systems and gonadal hormones on the urethra and vagina tracts. There are numerous studies concerning these factors in rabbits [8–11, 13, 14] and rats [28–30], most of which have been based on a general analysis without taking into account differences in tissue structure along these tracts.

**Acknowledgements** We thank PAPIIT-UNAM (IN2001303–3-MMG), PROMEP (UATLX-CA-27-MMG) and CONACyT (124858-JRA) for financial support, Laura García Rivera and Carolina Rojas Castañeda for bibliographic assistance, to Arturo Estrada Torres and Ivan Bravo Castillo for help with the statistical analysis, and to Dr. Ellis Glazier for editing this English language text.

**Conflicts of interest** None.

## References

- Perucchini D, DeLancey JO, Ashton-Miller JA, Galecki A, Schaer GN (2002) Age effects in urethral striated muscles. I. Changes in number and diameter of striated muscle fibers in the ventral urethra. *Am J Obstet Gynecol* 186:351–355
- Perucchini D, DeLancey JO, Ashton-Miller JA, Galecki A, Schaer GN (2002) Age effects in urethral striated muscles. II. Anatomical location of muscle loss. *Am J Obstet Gynecol* 186:356–360
- Alexander NJ, Baker E, Kaptein M, Karck U, Miller L, Zampaglione E (2004) Why consider vaginal drug administration? *Fertil Steril* 82:1–12
- Hussain A, Ahsan F (2005) The vagina as a route for systemic drug delivery. *J Control Release* 103:301–313
- Herbruck LF (2008) Stress urinary incontinence: an overview of diagnosis and treatment options. *Urol Nurs* 28:186–198
- Cruz Y, Hudson R, Pacheco P, Lucio RA, Martínez-Gómez M (2002) Anatomical and physiological characteristics of perineal muscles in the female rabbit. *Physiol Behav* 75:33–40
- Martínez-Gómez M, Lucio RA, Carro M, Pacheco P, Hudson R (1997) Striated muscles and scent glands associated with the vaginal tract of the rabbit. *Anat Rec* 247:486–495
- Park K, Ahn K, Lee S, Ryu S, Park Y, Azadzi KM (2001) Decreased circulating levels of estrogen *alters* vaginal and clitoral blood flow and structure in the rabbit. *Int J Impot Res* 13:116–124
- Yoon HN, Chung WS, Park YY, Shim BS, Han WS, Kwon SW (2001) Effects of estrogen on nitric oxide synthase and histological composition in the rabbit clitoris and vagina. *Int J Impot Res* 13:205–211
- Kim NN, Min K, Pessina MA, Munarriz R, Goldstein I, Traish AM (2004) Effects of ovariectomy and steroid hormones on vaginal smooth muscle contractility. *Int J Impot Res* 16:43–50
- Kim NN, Min K, Huang YH, Goldstein I, Traish AM (2002) Biochemical and functional characterization of alpha-adrenergic receptors in the rabbit vagina. *Life Sci* 71:2909–2920
- Resplande J, Gholami SS, Graziottin TM, Rogers R, Lin CS, Leng W, Lue TF (2002) Long-term effect of ovariectomy and simulated birth trauma on the lower urinary tract of female rats. *J Urol* 168:323–330

13. Al-Hijji J, Larsson B, Batra S (2000) Nitric oxide synthase in the rabbit uterus and vagina: hormonal regulation and functional significance. *Biol Reprod* 62:1387–1392
14. Traish AM, Kim NN, Huang YH, Min K, Munarriz R, Goldstein I (2003) Sex steroid hormones differentially regulate nitric oxide synthase and arginase activities in the proximal and distal rabbit vagina. *Int J Impot Res* 15:397–404
15. Hickey DS, Phillips JI, Hukins DW (1982) Arrangements of collagen fibrils and muscle fibers in the female urethra and their implications for the control of micturition. *Br J Urol* 54:556–561
16. Barberini F, De Santis F, Correr S, Motta PM (1992) The mucosa of the rabbit vagina: a proposed experimental model for correlated morphofunctional studies in humans. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 44:221–227
17. Barberini F, Correr S, De Santis F, Motta PM (1991) The epithelium of the rabbit vagina: A microtopographical study by light, transmission and scanning electron microscopy. *Arch Histol Cytol* 54:365–378
18. Oh SJ, Hong SK, Kim SW, Paick JS (2003) Histological and functional aspects of different regions of the rabbit vagina. *Int J Impot Res* 15:142–150
19. Daly TJ, Kramer B (1998) Alterations in rat vaginal histology by exogenous gonadotrophins. *J Anat* 193:469–472
20. Daucher JA, Clark KA, Stolz DB, Meyn LA, Moalli PA (2007) Adaptations of the rat vagina in pregnancy to accommodate delivery. *Obstet Gynecol* 109:128–135
21. Praud C, Sebe P, Mondet F, Sebille A (2003) The striated urethral sphincter in female rats. *Anat Embryol* 207:169–175
22. Kim RJ, Kerns JM, Liu S, Nagel T, Zaszczurynski P, Lin DL, Damaser MS (2007) Striated muscle and nerve fascicle distribution in the female rat urethral sphincter. *Anat Rec* 290:145–154
23. Dorschner W, Stolzenburg JU, Neuhaus J (2001) Structure and function of the bladder neck. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 159:1–109
24. Cruz Y, Downie JW (2005) Sexually dimorphic micturition in rats: relationship of perineal muscle activity to voiding pattern. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:1307–1318
25. Tokunaka S, Fujii H, Hashimoto H, Yachiku S (1993) Proportions of fiber types in the external urethral sphincter of young nulliparous and old multiparous rabbits. *Urol Res* 21:121–124
26. Arner A, Mattiasson A, Radzizewski P, Uvelius B (1998) Shortening velocity is different in longitudinal and circular muscle layers of the rabbit urethra. *Urol Res* 26:423–426
27. Hudson R, Müller A, Kennedy GA (1995) Parturition in the rabbit is compromised by daytime nursing: the role of oxytocin. *Biol Reprod* 53:519–524
28. Damaser MS, Whitbeck C, Chichester P, Levin RM (2005) Effect of vaginal distension on blood flow and hypoxia of urogenital organs of the female rat. *J Appl Physiol* 98:1884–1890
29. Pessina MA, Hoyt RF Jr, Goldstein I, Traish AM (2006) Differential effects of estradiol, progesterone, and testosterone on vaginal structural integrity. *Endocrinology* 147:61–69
30. Rocha MA, Sartori MG, De Jesus Simões M, Herrmann V, Baracat EC, Rodrigues de Lima G, Girão MJ (2007) The impact of pregnancy and childbirth in the urethra of female rats. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 18:645–651

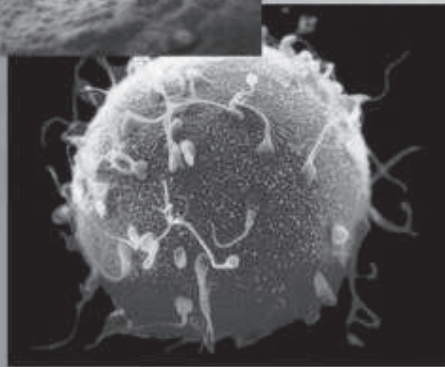
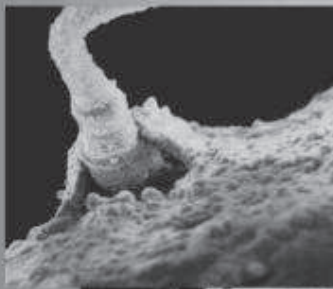


# REUNIÓN ANUAL DE LA ACADEMIA DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN, A.C.

*Del 22 al 25 de junio de 2010*

*Universidad Veracruzana  
Xalapa, Veracruz*

<http://www-lab.biomedicas.unam.mx/aibir/>



**Organización histológica de los ganglios paravaginales en conejas nulíparas y múltiparas.** N Xelhuantzi-Arreguin<sup>1</sup>, E Ramírez-Corona<sup>2</sup>, F Castelán<sup>3</sup> y M Martínez-Gómez<sup>3,4</sup> (Avalado por M Martínez-Gómez).

<sup>1</sup>Doctorado en Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx); <sup>2</sup>Maestría en Ciencias Biológicas, UATx; <sup>3</sup>Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, UATx. <sup>4</sup>Depto. de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

La inervación autonómica vaginal proviene del plexo pélvico y de ganglios autonómicos localizados en las proximidades del aparato urogenital. Los ganglios paravaginales son ganglios autonómicos ubicados en el tejido paravaginal de especies como el ratón y el lémur. En nuestro laboratorio, el análisis histológico del aparato urogenital inferior de la coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*) evidenció la presencia de estructuras ganglionares en el tejido paravaginal adyacente a la desembocadura uretral. En esta especie hemos descrito como la multiparidad modifica la morfología del conducto urogenital y la musculatura estriada asociada. El presente estudio pretende determinar la influencia de la multiparidad en la organización histológica de los ganglios paravaginales. Para ello se utilizaron conejas de 12 meses de edad, vírgenes y múltiparas (cuatro partos consecutivos) a las que se extrajo el conducto urogenital para procesarlo histológicamente. El marcaje inmunohistoquímico anti- $\beta$ -tubulina III (neuronas), tirosina hidroxilasa (TH), colina acetil transferasa (ChAT) reveló que los ganglios paravaginales contienen neuronas adrenérgicas y colinérgicas. Además las neuronas ganglionares expresan el receptor de estrógenos, lo que indica su sensibilidad a la fluctuación de estrógenos. Con respecto a las conejas vírgenes, en los ganglios paravaginales de las conejas múltiparas se observó una cápsula más delgada con apariencia laxa y un incremento en la matriz extracelular que rodea los somas neuronales. La condición de multiparidad promueve una disminución en el número de neuronas por campo y un incremento en el área neuronal. El área de los fascículos nerviosos cercanos a los ganglios paravaginales resultó mayor en las conejas múltiparas. La localización anatómica y expresión de marcadores celulares sugiere la participación de los ganglios paravaginales en funciones urinarias y reproductoras. La multiparidad promueve modificaciones morfológicas asociadas con la inervación del tracto urogenital inferior femenino.

Financiamiento: Conacyt (105882 a MM y 329112 a ER) y DGAPA-UNAM (proyecto 228110 a MM).



# XXXX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas



• [Mensaje de Bienvenida](#)

• [Agradecimientos](#)

• [Personal de Apoyo](#)

• [Sedes del Congreso](#)

• [Programa](#)

- [Cursos Precongreso](#)
- [Conferencias Magistrales](#)
- [Simposios](#)
- [Presentaciones Orales](#)
- [Presentaciones Carteles](#)

## Agradecimientos



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco  
M.A. Candita Victoria Jil Jiménez  
Rectora

M.P.E.S. María Isabel Zapata Vásquez  
Secretaria Académica

M.S.Pob. Raúl Guzmán León  
Director de la División Académica de Ciencias de la Salud

M. en C. Eliut Santamaría Mayo  
Director de Investigación y Posgrado

Ing. Miguel Ángel Ruiz Magdonel  
Director de Difusión Cultural

Dra. Miriam Carolina Martínez López  
Coordinadora de Investigación y Posgrado

C.D. Jorge Morales Guillaumin  
Coordinador de Difusión Cultural, Extensión y Servicio Social



**Título:** ORGANIZACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS GANGLIOS PARAVAGINALES EN CONEJAS NULÍPARAS, MULTÍPARAS Y OVARIECTOMIZADAS

**Autor:** XELHUANTZI ARREGUIN NICTE

**Correo electrónico:** xean2805@yahoo.com.mx

**Institución :** DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES, UAT

**Aval :** CASATELÁN FRANCISCO

**Correo electrónico aval :** fcocastelan@gmail.com

**Institución aval :** CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA, UAT

**Autores :** XELHUANTZI-ARREGUIN N1, RAMÍREZ-CORONA E2, CASTELÁN F3, MARTÍNEZ-GÓMEZ M3,4. 1. DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA (UATX). 2. MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UATX. 3. CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA, UATX. 4. DEPTO. DE BIOLOGÍA CELULAR Y FISIOLÓGÍA, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

**Resumen:** La fisiología del aparato urogenital femenino requiere de la coordinada integración de nervios autonómicos y somáticos que se entrecruzan en el plexo pélvico. En la mujer, la coneja, la gata y la perra el plexo pélvico está formado por una densa red de nervios y un gran número de agrupaciones ganglionares cercanos a las vísceras. Nuestro grupo de investigación ha descrito en la coneja joven la presencia de estructuras ganglionares en el tejido paravaginal adyacente a la desembocadura uretral. En este modelo hemos encontrado que la multiparidad modifica la morfología del conducto urogenital y la musculatura estriada asociada. El presente estudio pretende determinar la sensibilidad de la organización histológica de los ganglios paravaginales ante factores como la ovariectomía y la multiparidad. Para ello se utilizaron conejas de 12 meses de edad, vírgenes, ovariectomizadas (5 meses) y multíparas (cuatro partos consecutivos) a las que se extrajo el conducto urogenital para procesarlo histológicamente. La inmunoreactividad anti- $\alpha$ -tubulina III, tirosina hidroxilasa y colina acetil transferasa reveló que los ganglios paravaginales contienen neuronas adrenérgicas y colinérgicas. Las neuronas ganglionares expresaron el receptor de estrógenos, lo que indica su sensibilidad estrogénica. Con respecto a las conejas vírgenes, los ganglios paravaginales de las multíparas tuvieron una cápsula más delgada con apariencia laxa y un incremento en la matriz extracelular que rodea los somas neuronales. Estas diferencias no se observaron en las conejas ovariectomizadas, en las que se encontró un evidente incremento en el número de núcleos dentro de los ganglios paravaginales. La condición de multiparidad promovió una disminución en el número de neuronas ganglionares, un incremento en el área neuronal y también en la de los nervios localizados en el tejido paravaginal. Estas características no se observaron en las conejas ovariectomizadas. La localización anatómica y expresión de marcadores celulares sugiere la participación de los ganglios paravaginales en la regulación nerviosa de funciones urinarias y reproductoras. La ovariectomía y la multiparidad promueven modificaciones morfológicas asociadas con la inervación del tracto urogenital inferior femenino. Financiamiento:

Conacyt (proyecto 105882 a MMG y beca 329112 a ERC) y DGAPA-UNAM (proyecto 228110 a MMG).



La Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas A.C.

Otorga la presente constancia a:

XELHUANTZI-ARREGUIN N., RAMÍREZ-CORONA E., CASTELÁN F.,  
MARTÍNEZ-GÓMEZ M.

Por la presentación del trabajo:

ORGANIZACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS GANGLIOS PARAVAGINALES EN CONEJAS  
NULÍPARAS, MULTÍPARAS Y OVARIECTOMIZADAS

En el marco del LIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas  
26-30 de Septiembre, 2010. Villahermosa, Tabasco México

Dra. Carolina Escobar Briones  
Presidenta



Dr. David Centurión Pacheco  
Secretario





**LV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas**



- Mensaje de Bienvenida
- Agradecimientos
- Personal de Apoyo
- Sedes del Congreso
- Programa
  - Cursos Precongreso
  - Conferencias Magistrales
  - Simposios
  - Presentaciones Orales
  - Presentaciones Carteles



**COMITÉ ORGANIZADOR LOCAL:**

**Dr. José Luis Lucio Martínez**  
Rector

**Dr. Antonio Eugenio Rivera Cisneros**  
Director de la División de Ciencias de la Salud

**Dr. José Báez Mendoza**  
Director del Departamento de Medicina y Nutrición

**Dra. Silvia Solís Ortiz**  
Presidenta Del comité local de apoyo

**Título:** PERMANENCIA DE LOS EFECTOS DE LA MULTIPARIDAD SOBRE LA INERVACIÓN AUTONÓMICA PARAVAGINAL DE LA CONEJA.

**Autor :** XELHUANTZI ARREGUIN NICTE

**E-Mail :** [xean2805@yahoo.com.mx](mailto:xean2805@yahoo.com.mx)

**Institución :** DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES UATx

**Aval :** Martínez Gómez Margarita

**Autores :** Xelhuantzi Arreguin N, Hernández Aragón L, Zempoalteca Ramírez R, Castelán F, Martínez Gómez M

1Doctorado en Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx); 2Maestría en Ciencias Biológicas (UATx), 3Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (UATx). 4Depto. de Biología Celular y Fisiología. Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM).

**Resumen:** Los ganglios paravaginales forman parte del plexo pélvico de la coneja; hay pocos estudios que relacionen la inervación autonómica paravaginal con procesos reproductivos. La inervación que reciben los ganglios paravaginales proviene del nervio hipogástrico y del pélvico. La mayor parte de las fibras eferentes de los ganglios paravaginales llegan a las distintas regiones vaginales. En mujeres hay evidencias de que el parto altera los mecanismos de continencia urinaria a través de daños en la inervación periuretral y del piso pélvico. En la coneja múltipara hemos encontrado que la paridad consecutiva (cuatro partos) modifica la organización histológica de los ganglios paravaginales. Sin embargo, desconocemos si este efecto es permanente o transitorio. El objetivo de este estudio fue determinar la organización tisular de los ganglios

paravaginales en conejas vírgenes y multíparas; éstas últimas tuvieron 4 partos consecutivos y fueron sacrificadas 20 o 180 días después del último parto. El conducto urogenital se extrajo para procesarlo histológicamente y teñirlo con hematoxilina-eosina y Tricrómica de Masson. Con respecto a las conejas vírgenes, los ganglios paravaginales de las multíparas tuvieron una cápsula más delgada con apariencia laxa y un incremento en la matriz extracelular que rodea los somas neuronales. En las conejas multíparas se encontró un incremento temporal en el área ganglionar y la de los nervios localizados en el tejido paravaginal, Por el contrario, en las conejas de 180 días después del parto se mantuvo reducido el número de neuronas y el área neuronal encontrada 20 días después del cuarto parto. Por lo que son permanentes algunos de los efectos que la multiparidad ejerce sobre la inervación autonómica paravaginal. Financiamiento: Conacyt (105882 a MMG; 366117 a LHA) y DGAPA-UNAM (228110 a MMG).



# XXXVII Reunión Anual



**Academia de Investigación  
en Biología de la  
Reproducción A.C .**

## **PROGRAMA**



27-30 de Junio  
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
Pachuca Hidalgo

## Efecto de la multiparidad sobre la capa epitelial de la vagina pélvica en la coneja



Xelhuantzi-Arreguin N<sup>1</sup>, García-Lorenzana M<sup>2</sup>, García L<sup>3</sup>,  
Castelán F<sup>4</sup> y Martínez Gómez M<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Doctorado en Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx);

<sup>2</sup>Depto. de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa;

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México;

<sup>4</sup>Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, UATx.

La fisiología y estructura vaginal es modulada por eventos reproductivos como la cópula, la gestación y el parto. La gestación promueve la disminución de colágeno y un cambio en el fenotipo de la musculatura lisa. El parto daña la inervación y musculatura uretral y vaginal por la compresión directa del feto. El efecto mecánico que ejerce la distensión vaginal en ratas con simulación del trauma de parto se asocia con un incremento de tejido conectivo en la submucosa y una capa epitelial atrofiada. Considerando que la multiparidad implica el efecto mecánico que promueve la distensión vaginal durante la cópula y el parto, y los niveles hormonales que regulan la gestación, parto y lactancia, el presente trabajo tiene como objetivo determinar si la multiparidad modula la estructura y función de la mucosa vaginal. Para ello se utilizaron conejas divididas en cuatro grupos: nulíparas de 12 meses de edad; múltiparas de 4 partos consecutivos sacrificadas el día 20 postparto; nulíparas de 18 meses de edad; y múltiparas con 4 partos consecutivos sacrificadas seis meses después del cuarto parto. La organización y actividad secretora del epitelio se evaluaron en cortes transversales teñidos con hematoxilina-eosina, tricrómica de Masson, azul de alciano pH 2.5 y ácido peryódico. Los resultados evidenciaron que la mucosa forma pliegues pronunciados de epitelio estratificado cilíndrico con actividad secretora mixta solo en la porción cranial de la vagina pélvica, ya que en la porción caudal se observó epitelio estratificado cúbico. En la porción cranial se encontraron células caliciformes intercaladas con células de secreción serosa rica en glucógeno. El espesor de la mucosa se redujo significativamente solo en los dos grupos de conejas múltiparas. En las múltiparas de doce meses se encontraron escasos pliegues poco pronunciados de epitelio con escaso citoplasma y una evidente reducción en la actividad secretora. Con base a nuestros resultados podemos concluir que la multiparidad modula la secreción y proliferación epitelial. Y que las hembras múltiparas son más susceptibles a infecciones bacterianas y fúngicas por los cambios en la lubricación vaginal postparto.

*Con financiamiento de PAPIIT-UNAM (228110 a MMG) y beca CONACyT 17459 a NXA.*

**La Academia de Investigación en Biología de la  
Reproducción, A.C.**



**Otorga la presente**

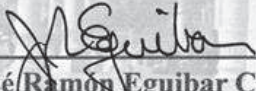
***Constancia***

**A Xelhuantzi-Arreguin N, García-  
Lorenzana M, García L , Castelán F  
y Martínez Gómez M**

*Por la participación del trabajo en cartel:*

**Efecto de la multiparidad sobre la capa  
epitelial de la vagina pélvica en la coneja.**

**En la XXXVII Reunión Anual de la AIBIR, llevada a cabo en la ciudad de  
Pachuca Hgo., del 27 al 30 de junio del 2012**

  
Dr. José Ramón Eguibar Cuenca  
Presidente

  
Dra. Margarita Martínez Gómez  
Secretaría