



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

**Contribución de los estrógenos en la organización
histológica de la vagina pélvica de la coneja
doméstica (*Oryctolagus cuniculus*)**

T e s i s

Que para obtener el grado académico de
Maestra en Ciencias Biológicas
P r e s e n t a

Q.F.B. Eréndira Ramírez Corona

Comité Tutorial

Dra. Margarita Martínez Gómez

Dr. Pablo Pacheco Cabrera

Dr. Mario García Lorenzana

Dr. Francisco Castelán

Tlaxcala, Tlax.

Septiembre 2011

La presente tesis se realizó en las instalaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Periférica de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Francisco Castelán. Se contó con la asesoría de la Dra. Margarita Martínez Gómez, la Dra. Estela Cuevas Romero, el Dr. Pablo Pacheco Cabrera y el Dr. Mario García Lorenzana.

Con el apoyo financiero de PAPIIT-UNAM (228110 a MMG); CONACYT (105882 a MMG y 229956 a ERC) y SEP-PROMEP (UATLX-PTC-109).



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



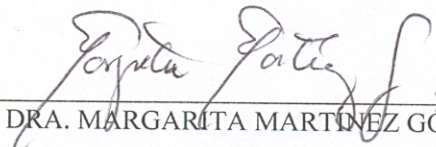
Maestría en Ciencias Biológicas

COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA
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 Eréndira Ramírez Corona realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es “Contribución de los estrógenos en la organización histológica de la vagina pélvica de la coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*)”.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.


ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., SEPTIEMBRE 2 DE 2011



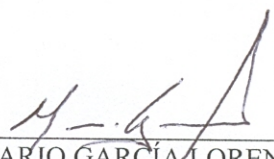
DRA. MARGARITA MARTÍNEZ GÓMEZ



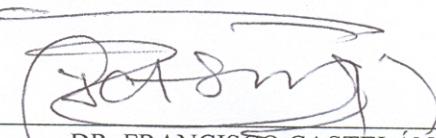
DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO



DR. PABLO PACHECO CABRERA



DR. MARIO GARCÍA LORENZANA



DR. FRANCISCO CASTELÁN



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



Dedicatorias

A Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre Italia.

Por haberme apoyado en todo momento, por quererme tal y como soy pero más que nada, por su infinita comprensión y paciencia. Te quiero mucho mami.

A mi padre Porfirio.

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mi princesa Quetzali y mi bebe.

Por ser la fuente de mi inspiración y mi apoyo cuando yo debí ser el suyo, los amo.

A mi esposo Ruddy.

Por quererme completa, aceptarme, cuidarme y motivarme; por todo su amor, por ser mi ángel y llegar en el momento que más lo necesitaba. “Debí haberte encontrado diez años antes o diez años después. Pero llegaste a tiempo” Jaime Sabines.

A mis hermanos Luis, Nelly, Marco Antonio e Italia.

Por ser tan buenos hermanos aún cuando yo no lo fui.

A mis suegros Eva y Aurelio.

Por su apoyo y comprensión incondicional. Por ser como unos segundos padres para mí. Mil gracias.

A mi cuñada Lupita y mi sobrino Leonardo.

Por cada sonrisa y palabras de aliento, los quiero mucho.

A mi Tutor.

Por creer en mí, mil gracias.

A mis amigos.

Que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos: Margarita, Vero, Nicté, Kenia, Laura y Eliut. Por supuesto a Beet_seba mi amiga incondicional, porque siempre llegas en el momento adecuado TQM.

Finalmente a todas las personas que se cruzaron en este camino y que me dieron palabras de aliento y apoyo.

“El tiempo es el mejor autor: siempre encuentra un final perfecto” Charles Chaplin

RESUMEN

En la coneja, la organización histológica vaginal difiere longitudinalmente y cada segmento está relacionado con su función. Nuestro grupo de investigación ha reportado que la multiparidad modifica la histología del conducto vaginal, induce cambios en la morfología de los ganglios autonómicos paravaginales y reduce la concentración sérica de estradiol. Los estrógenos participan en el arreglo histológico de los segmentos abdominal y perineal. Sin embargo se desconoce el efecto que los cambios hormonales tendrían sobre el segmento pélvico, involucrado en la reproducción y la micción de la mayoría de las hembras de mamíferos. El objetivo de este estudio fue determinar la contribución de los estrógenos en la organización histológica de la mucosa, musculatura (lisa y estriada), colágeno y en la morfología de los ganglios autonómicos paravaginales. Los resultados obtenidos muestran que los estrógenos influyen sobre el espesor de la capa mucosa pero no sobre el de la intermedia ni externa. En la capa intermedia, la ovariectomía (OVX) no modifica la concentración de músculo liso ni la de colágeno y la administración de benzoato de estradiol (BE) las reduce. En la externa, la OVX incrementa la concentración de músculo estriado, efecto que no es revertido con el tratamiento de BE. Al igual que la capa mucosa, el área de las neuronas ganglionares es dependiente del tratamiento con BE. Nuestros resultados sugieren que los estrógenos modulan los componentes histológicos de la vagina pélvica de la coneja.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Morfología del aparato reproductor femenino: conducto vaginal	2
2.2 Inervación del conducto vaginal.....	5
2.3 Fisiología del conducto vaginal: respuesta sexual femenina.....	7
2.3.1 Cambios fisiológicos	7
2.3.2 Mecanismos neuronales.....	8
2.3.3 Influencia hormonal.....	9
2.3.4 Cambios en la respuesta sexual femenina	9
2.4 Multiparidad: histología y fisiología del conducto vaginal	10
2.5 Conducto vaginal y estrógenos.....	14
2.5.1 Inervación y esteroides gonadales	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS.....	19
5.1 Objetivo general	19
5.2 Objetivos particulares.....	19
6. MATERIAL Y MÉTODOS	20
6.1 Modelo experimental.....	20
6.2 Cuantificación de la concentración sérica de estradiol.....	20
6.3 Obtención y procesamiento de la vagina pélvica	21
6.3.1 Tricromica de Masson	21
6.3.2 Azul de alcian	22
6.3.3 Ácido Peryódico de Schiff (PAS).....	22
6.4 Análisis histológico	23
6.5 Análisis estadístico	24
7. RESULTADOS	25
7.1 Parámetros morfométricos.....	25
7.2 Concentración sérica de estradiol	25

7.3 Características histológicas de la vagina pélvica.....	26
7.4 Características histológicas de la mucosa.....	27
7.4.1 Espesor de la capa epitelial.....	28
7.5 Características histológicas de la capa intermedia	29
7.5.1 Componentes histológicos.....	29
7.5.2 Espesor de la capa intermedia	30
7.5.3 Proporción de músculo liso y colágeno.....	31
7.6 Características histológicas de la capa externa.....	31
7.6.1 Componentes histológicos.....	31
7.6.2 Espesor de la capa externa.....	32
7.6.3 Proporción de músculo estriado y colágeno	33
7.7 Morfología de los ganglios autonómicos paravaginales	34
7.7.1 Área de los haces nerviosos.....	35
8. DISCUSIÓN.....	36
8.1 Modelo.....	36
8.2 Efecto de la ovariectomía sobre los parámetros morfométricos y la concentración sérica de estradiol	37
8.3 Efecto de la ovariectomía sobre la morfología de la vagina pélvica	39
8.4 Efecto de la ovariectomía sobre las características histológicas de la mucosa	40
8.45 Efecto de la ovariectomía sobre las características histológicas de la capa intermedia	41
8.6 Efecto de la ovariectomía sobre los componentes histológicos de la capa externa.....	43
8.7 Efecto de la ovariectomía sobre la morfología de los ganglios autonómicos	44
9. CONCLUSIONES.....	47
9.1 General.....	47
9.2 Particulares	47
11. PERSPECTIVAS	48
12. REFERENCIAS	49

1. INTRODUCCIÓN

En hembras de mamíferos, los procesos fisiológicos subyacentes a orinar, copular y parir tienen como sustrato anatómico el aparato urogenital. Este comprende dos grupos de órganos, los urinarios y los genitales. Los urinarios elaboran, almacenan y eliminan la orina, los genitales participan en funciones reproductivas como la cópula y el parto. En la mujer y la rata, los conductos urinario y reproductor están separados, a diferencia de lo que se observa en la mayoría de las especies (por ej. hiena, gata, vaca, perra y coneja) en las que un sólo conducto cumple con funciones de uretra y vagina (Cruz y col. 2002; Martínez-Gómez y col. 1997). Estos conductos provienen de un mismo desarrollo embrionario y comparten características histológicas que pueden verse afectadas por eventos similares como la edad, la menopausia y el parto. Condiciones fisiológicas como la cópula y la multiparidad, entre otros, inducen una desorganización de la histología vaginal (Rodríguez-Antolín y col. 2009; Robinson y col. 2003; Xelhuantzi en preparación).

En la mujer, la gestación y el parto se consideran factores de riesgo para manifestar incontinencia urinaria y prolapso de órganos pélvicos. Por otro lado, también se ha involucrado a la menopausia y la subsecuente deficiencia de estrógenos con patologías en el tracto urogenital (Moalli y col. 2008; Hextall y col. 2000; Berman y col. 1999). Estudios en modelos de ovariectomía muestran una alteración estructural en los componentes histológicos a lo largo del conducto vaginal, los cuales podrían relacionarse con la disminución en la concentración de hormonas esteroides circulantes (Pessina y col. 2006; Kim y col. 2004; Park y col. 2001; Yoon y col. 2001). La inervación que recibe este conducto también se ve afectada por la fluctuación de hormonas esteroides (Purves-Tyson y col. 2007; Ting y col. 2004; Al-Hijji y col. 2000; Kaleczyc 1994).

En conjunto, estas alteraciones histológicas podrían estar involucradas en algunos trastornos reproductivos y de micción. Los efectos observados en conejas multíparas pudieran estar relacionados con la concentración sérica de estradiol. En este contexto resulta interesante analizar la contribución de los estrógenos en la organización histológica de los distintos componentes tisulares y los ganglios autonómicos paravaginales en la vagina pélvica de la coneja.

2. ANTECEDENTES

2.1 Morfología del aparato reproductor femenino: conducto vaginal

En hembras de mamíferos el aparato reproductor incluye varios órganos que contribuyen de manera directa a la función primaria de la reproducción, o bien la complementan. Los órganos del aparato reproductor incluyen ovario, oviducto, útero y vagina. La vagina es el principal órgano involucrado durante la respuesta sexual femenina (Baloglu y col. 2009; Alexander y col. 2004). Este órgano cumple con dos funciones, sexual y reproductiva; esta doble función se refleja en varios aspectos de su estructura, en especial su aporte vascular, su inervación sensorial y motora y su capacidad de distensión (Azadzi y col. 2010). La vagina es un órgano tubular localizado en el área pélvica, que se encuentra detrás de la vejiga urinaria y por delante del recto. En la mujer mide entre 8-11 cm de largo y de 2-5 cm de diámetro (Baloglu y col. 2009; Alexander y col. 2004). La pared vaginal está compuesta por cuatro capas: la capa superficial consiste en un revestimiento interno de epitelio escamoso estratificado. Seguida de la lámina propia, formada por fibras de colágeno y elastina, que contiene un rico aporte de vasos y canales linfáticos. La tercera es la capa muscular formada por paquetes de músculo liso en dirección circular y longitudinal. La cuarta capa está formada por tejido conectivo areolar y un plexo venoso, también llamada túnica adventicia (Alexander y col. 2004).

En la mayoría de las hembras de mamíferos como la coneja doméstica, modelo de estudio utilizado por nuestro grupo de investigación, la uretra y la vagina se fusionan para formar una vía común, mediante la cual se llevan a cabo funciones fisiológicas como orinar, copular y parir. El conducto vaginal en esta especie mide 18 cm de largo (Rodríguez-Antolín y col. 2009) y está sostenido por músculos estriados de la región pélvica como el coccígeo, el iliococcígeo, el pubococcígeo, el obturador externo, el obturador interno, el constrictor vulvar y el bulboglandular. Otros músculos perineales como el constrictor vestibular, el isquiocavernoso y el bulboesponjoso se localizan fuera de la cavidad pélvica, asociados con la porción vaginal protruida (Cruz y col. 2002; Martínez-Gómez y col. 1997).

Debido a su posición en la cavidad pélvica el conducto vaginal se divide en tres segmentos denominados vagina abdominal, vagina pélvica y vagina perineal (Rodríguez-Antolín y col. 2009; Cruz y col. 2001; Martínez-Gómez y col. 1997). La vagina abdominal, de aproximadamente 11cm, es la porción cercana a la vejiga y al cérvix. La pélvica, mide 4 cm y

es la porción situada dentro de la cavidad pélvica que se encuentra rodeada por un plexo venoso y en cuyo lumen desemboca la uretra. Este segmento también está rodeado por las glándulas de marcate vestibulares. El segmento de la vagina que protruye caudalmente de la cavidad pélvica se denomina vagina perineal y mide aproximadamente 3 cm (Fig.1). Esta última división es análoga a otras que han dividido el conducto vaginal de la coneja en tres regiones: anterior, media y posterior (Oh y col. 2003; Giraldi y col. 2002; Al-Hijji y col. 2000).

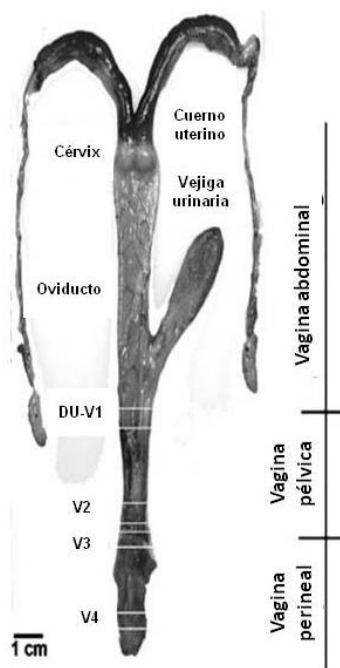


Figura 1. Vista ventral del aparato urogenital de la coneja adulta. Se observan las tres regiones de la vagina (Rodríguez-Antolín y cols. 2009).

En esta especie, la pared vaginal consta de cuatro capas distintas: mucosa, submucosa, muscular y externa (Rodríguez-Antolín y col. 2009; Alexander y col. 2004). En la vagina pélvica (Figuna 1, V1-V2) la mucosa está formada por abundantes pliegues transversales. Epitelio cilíndrico simple en la región anterior a la desembocadura de la uretra y epitelio escamoso estratificado plano en la región posterior a la desembocadura de la uretra. La lámina

propia, compuesta de colágeno y elastina, contiene un rico aporte de canales vasculares y linfáticos. La submucosa, está compuesta por tejido conectivo fibroso, así como de abundantes capilares, vénulas y arteriolas. La capa muscular o capa intermedia se divide en dos subcapas formadas por fibras de músculo liso, una capa interna que presenta fibras orientadas en forma longitudinal y una capa externa constituida por fibras orientadas en forma circular, ambas subcapas se encuentran entre mezcladas con fibras de tejido conectivo. En la región posterior a la desembocadura de la uretra también se observan fibras orientadas en forma oblicua. La última capa, llamada capa externa, se encuentra formada de tejido conectivo areolar y un gran plexo venoso, separado por fibras de músculo estriado orientadas de forma circular (Fig. 2).

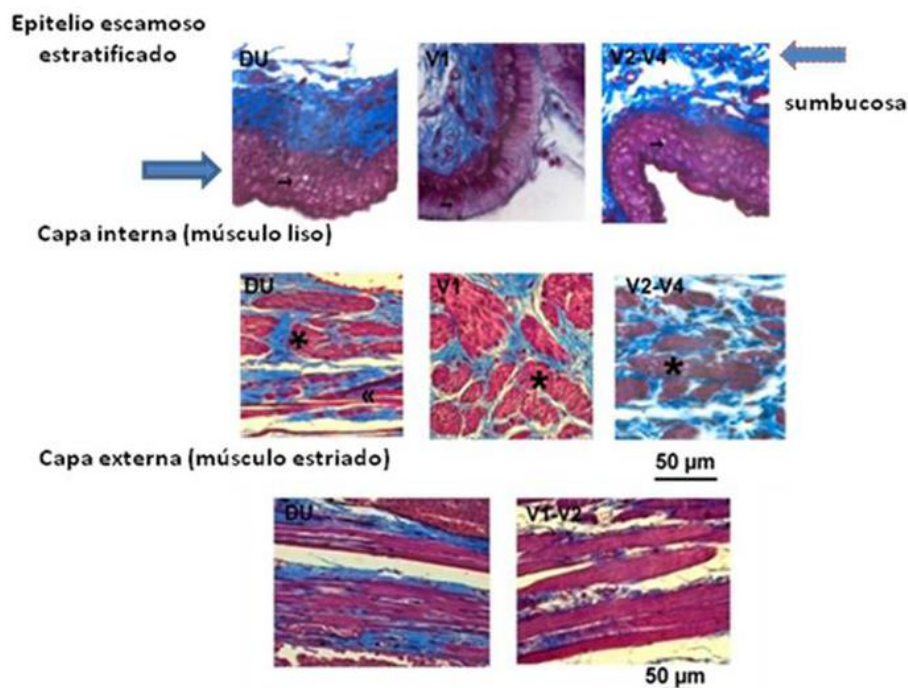


Figura 2. Características histológicas del conducto vaginal de la coneja doméstica *Oryctolagus cuniculus* (Rodríguez-Antolín y col. 2009).

Este arreglo histológico es distinto para cada uno de sus segmentos y podría estar relacionado con su función. Oh y col. (2003) mediante un estudio histológico y funcional proponen que debido a sus características histológicas el conducto vaginal puede dividirse en

tres regiones, anterior, media y posterior. Dicho estudio muestra que la arquitectura de la pared de la región posterior o vagina perineal es histológica y funcionalmente diferente a los otros dos tercios. Esta diferencia radica en la abundancia de fibras de musculatura lisa dispuestas en forma circular y longitudinal. La región anterior o vagina abdominal es la que presenta una menor proporción de musculatura, lo cual estaría relacionado con su menor grado de participación en eventos sexuales y reproductivos (Tabla 1, Rodríguez-Antolín y col. 2009; Oh y col. 2003).

Tabla .1 Diferencias histológicas de las regiones del conducto vaginal de la coneja

	Contenido de músculo (%)	Espacio sinusoidal (%)	Espesor de la pared (µm)
Segmento anterior	10.6±0.5*	14.8±1.0*	1748.0±48.7**
Segmento medio	67.9±0.7	4.5±0.2	1211.6±37.5**
Segmento posterior	71.4±0.6	2.1±0.1	946.6±41.1

Los valores representan la media±e.e.

*P<0.05

**P<0.05

La organización histológica de estos componentes depende de factores como el pH, niveles hormonales, el trauma durante el coito y la edad. En conejas sexualmente maduras después de una cópula se observan diferencias en el epitelio a lo largo del conducto vaginal. Los dos tercios superiores presentan epitelio cilíndrico simple secretor similar al del endocervix, útero y oviducto de la misma especie, el último tercio, epitelio estratificado plano (Barberini y col. 1992).

2.2 Inervación del aparato reproductor femenino: conducto vaginal

El control nervioso de los órganos pélvicos se caracteriza por un complejo conjunto de reflejos espinales, que son modulados por el descenso de las señales de la base del cerebro y las hormonas circulantes (Yan y col. 2007; Giuliano y col. 2002). La salida final del sistema

nervioso central (SNC) a los órganos pélvicos es a través de las neuronas preganglionares ubicadas en los segmentos sacros y lumbares de la médula espinal. Estas neuronas del SNC llegan a ganglios autonómicos. Los ganglios pélvicos proveen de la mayoría de conexiones autonómicas al aparato urogenital (Keast 2006). Las neuronas que contienen son la vía motora final que controla la fisiología urogenital. También inervan la mayor parte de los órganos reproductivos femeninos. Los ganglios pélvicos también se conocen como plexo pélvico, y plexo hipogástrico inferior (Imai y col. 2006). Las neuronas responsables de la regulación de la motilidad, la resistencia vascular y la secreción glandular en los órganos pélvicos como la vejiga y el tracto reproductivo se encuentran en los ganglios pélvicos (Jobling y col. 2003).

La inervación autonómica dirigida a los órganos sexuales femeninos, está constituida por la cadena ganglionar simpática y el nervio pélvico e hipogástrico, que transmiten el flujo de salida simpático y parasimpático, respectivamente. Estos nervios reciben conexiones de los segmentos sacros de la médula espinal (a través del nervio pélvico en animales y del esplácnico en el humano) y de los segmentos lumbares llegan a través del nervio hipogástrico. El nervio pélvico presenta fibras nerviosas adrenérgicas y colinérgicas y proveen la mayoría de las conexiones nerviosas autonómicas. Las fibras simpáticas destinadas a la vagina y el clítoris se transmiten por el nervio hipogástrico y la cadena simpática cervical (Guiliano y col. 2002). La inervación autonómica vaginal se complementa con la proveniente de ganglios autonómicos adosados a la pared vaginal como los paracervicales (Houdeau y col. 1995) y los paravaginales (Castelán y col. 2008; Giraldi y col. 2002; Houdeau y col. 1995; Owman and Sjoberg 1966; Kanagasuntheram and Verzin 1964). Los nervios pélvicos participan durante la estimulación vaginal, mientras que el nervio pudendo interviene en la estimulación de los labios y el clítoris.

En la coneja se han descrito estructuras ganglionares adosadas al tejido conectivo dorsolateral adyacente a la desembocadura uretral, las cuales pudieran estar contribuyendo también a la inervación del conducto vaginal (Castelán y col. 2008). Todos estos componentes nerviosos contienen fibras aferentes y eferentes que contribuyen a la regulación de la respuesta sexual femenina (Maggi y col. 1988).

La fisiología vaginal depende del control autonómico nervioso que se ejerce sobre el músculo liso vascular y vaginal. La función sexual consiste en una combinación de eventos

vasocongestivos y neuromusculares en el tracto genital y el piso pélvico, que son controlados por neurotransmisores específicos. La vagina y otros órganos reproductores reciben inervación simpática y parasimpática. Estos sistemas incluyen ganglios y nervios. La vagina presenta fibras nerviosas adrenérgicas y colinérgicas. Además varios transmisores/moduladores no adrenérgicos ni colinérgicos (NANC) son liberados en el tejido vaginal y paravaginal. Entre éstos puede mencionarse el VIP (péptido intestinal vasoactivo), el NPY (neuropéptido Y), el NO (óxido nítrico) y la sustancia P, entre otros (Kim y col. 2002, Giuliano y col. 2002). En este sentido, cualquier alteración que ocurra en la inervación del aparato urogenital podría provocar trastornos reproductivos y de micción (Maggi y col. 1988).

2.3 Fisiología del conducto vaginal: respuesta sexual femenina

La respuesta sexual femenina consiste en una serie de procesos neurofisiológicos que son regulados por componentes centrales y periféricos. Las respuestas periféricas son la vasocongestión genital, lubricación y congestión resultante de un aumento en el flujo sanguíneo en la vagina y el clítoris. En conjunto, estos eventos son dependientes de la estructura e integridad de los tejidos genitales, la función de sistemas neuronales, endocrinos y vasculares que regulan y coordinan la respuesta sexual (Giuliano y col. 2002).

2.3.1 Mecanismos fisiológicos

La vagina interviene como reservorio durante el coito, como salida del flujo menstrual y como canal de parto. Es morfológica y funcionalmente diferente en cada región. La región distal (vagina perineal) juega un papel importante en la función sexual, la región proximal (vagina abdominal) interviene como reservorio de espermatozoides y en el mantenimiento de su viabilidad (Biljana y col. 2009; Oh y col. 2003). Es el principal órgano involucrado en la respuesta sexual femenina (Alexander y col. 2004). La cual, consiste de cuatro fases sucesivas: excitación, meseta, orgasmo y relajación. La fase de excitación se caracteriza por un aumento del aporte sanguíneo a los órganos genitales, debido a su vasodilatación. Lo que se traduce en la erección del clítoris y la vasocongestión de la vagina. Estos acontecimientos determinan la lubricación vaginal (Giraldi y col. 2001). El orgasmo se caracteriza por las contracciones de la musculatura lisa de los órganos genitales y la musculatura esquelética. La fase de resolución

consiste en el retorno a los valores funcionales iniciales, con reducción de la vasocongestión pélvica y relajación muscular (Levin 2002; Berman y col. 1999).

Durante las primeras fases de la excitación genital, la vagina abdominal y pélvica se alargan y aumentan en volumen, seguido por la contracción de la vagina perineal. La vasodilatación de los vasos sanguíneos dentro de la vagina y la relajación del músculo liso vaginal son acontecimientos importantes durante la misma (Aikawa 2002, Wagner and Levin 1978).

2.3.2 Mecanismos neuronales

La respuesta sexual femenina es el resultado de una sucesión de reflejos neuronales, modulados a su vez por factores como la concentración sérica de diversas hormonas y estados emocionales. Todo esto regulado por el sistema nervioso (Berman y col. 1999).

Las fibras simpáticas provienen del plexo hipogástrico y su actividad produce vasoconstricción de los órganos eréctiles y la vagina. Las fibras parasimpáticas, forman los nervios pélvicos. Estos promueven mediante la liberación de NO y VIP vasodilatación y lubricación vaginal. El nervio pélvico responde a la estimulación mecánica de la vagina, el cérvix y el recto (Peters y col. 1986). El nervio pudendo proporciona la principal inervación motora a los músculos estriados como el bulboesponjoso y el isquiocavernoso que participan en la respuesta orgásmica (Cruz y col. 2001; Martínez-Gómez y col. 1997)

La estimulación sensorial del sistema nervioso central durante la respuesta sexual femenina, conduce a la relajación del músculo liso vaginal y del clítoris, y origina un incremento en el flujo sanguíneo genital (Wagner and Levin 1978). Esta respuesta culmina con una serie de eventos vasocongestivos y neuromusculares, que incluyen un mayor diámetro y longitud de la vagina y el clítoris, y un aumento en la lubricación de la pared vaginal. (Berman y col. 1999). El Orgasmo, se produce luego que el estímulo y excitación sexual generan múltiples aferencias sensoriales desde el área genital hacia el cerebro desencadenándose la descarga de neurotransmisores así como la contracción de los músculos del piso pélvico, útero y vagina. Los estrógenos regulan la inervación periférica, en particular con respecto a los órganos de la reproducción. (Alison y col. 2004).

2.3.3 Influencia hormonal

La función sexual humana tiene un soporte hormonal por parte de los esteroides gonadales. Los esteroides gonadales (andrógenos y estrógenos) regulan la estructura y la función de los órganos genitales y modifican la respuesta sexual. Las hormonas esteroides sexuales regulan distintos componentes celulares de la vagina. Las interacciones entre los distintos componentes celulares influyen y modulan eventos fisiológicos tales como el crecimiento y función de las neuronas, los vasos sanguíneos, músculo liso y células epiteliales. Los estrógenos participan en el mantenimiento del estado trófico de la vagina y su capacidad de respuesta a estímulos sexuales, por vasodilatación y un aumento de la lubricación (Levin y col. 2002). Los andrógenos y los estrógenos regulan: a) la síntesis, secreción y reabsorción de los neurotransmisores, b) la contractilidad del músculo liso vascular y no vascular; c) la mucificación, queratinización y permeabilidad del epitelio y d) la producción autocrina y paracrina de factores de crecimiento, vasoactivos y sustancias tróficas. Además, pueden regular la síntesis y la deposición de la matriz de tejido conectivo en la vagina. En mujeres, el estradiol (E2) es importante en la regulación del desarrollo, crecimiento y mantenimiento de muchos órganos y tejidos. Además de su papel crítico en la función reproductiva. (Erskine y col. 2004, Mani 2003).

La disminución de los niveles circulantes de E2 asociado con la menopausia se relaciona con trastornos sexuales en mujeres postmenopáusicas [66,67]. La privación de E2 disminuye el flujo sanguíneo pélvico, lo que disminuye la lubricación vaginal, induce fibrosis del clítoris, adelgazamiento de la pared vaginal y disminuye la vascularización de la submucosa. Además, la deficiencia de estrógenos conduce a la involución y atrofia de órganos genitales [66].

2.3.4 Cambios en la respuesta sexual femenina

La fisiología de la vagina puede ser modificada por diversos factores como son: la edad, el estado hormonal, la gestación y cambios en el pH. La disfunción sexual femenina es un desorden multi-factorial y multi-dimensional. Los cambios endocrinos relacionados con la edad, pueden modular de forma directa o indirecta la función sexual, debido a una alteración en las hormonas esteroides, modificación de la microvasculatura, factores neurogénicos y/o

factores psicológicos (Wierman y col. 2009). Con el envejecimiento y la menopausia, la mayoría de las mujeres experimentan algunos cambios en la función sexual. Dentro de los que incluyen la pérdida del deseo, disminución de la frecuencia de actividad sexual, relaciones sexuales dolorosas, disminución de la sensibilidad, dificultad para un orgasmo y disminución de la sensibilidad genital. Los síntomas relacionados con alteraciones en la sensibilidad genital y el flujo sanguíneo son, en parte, secundarios a la disminución de los niveles de estrógenos, y hay una correlación directa entre la presencia de las quejas sexuales y los niveles de estradiol por debajo de 50 pg/mL (Robinson and Cardozo 2003; Min y col. 2001; Berman y col. 1999).

Al igual que el impacto de la menopausia natural, la menopausia quirúrgica inducida por ovariectomía o histerectomía han tenido un impacto negativo sobre la función sexual. La histerectomía sola puede resultar en disfunción sexual. Las mujeres suelen experimentar síntomas después de la cirugía, que incluyen la disminución del deseo, disminución de la excitación, disminución de la sensibilidad genital y la disfunción orgásmica (Berman y col. 1999). Otro mecanismo por el cual el nivel hormonal puede afectar la función sexual es debido a que también afecta a la inervación que recibe el conducto vaginal. En hembras de mamíferos, las fibras nerviosas sensoriales, simpáticas y parasimpáticas tienen un papel importante en la modulación del dolor y la sensación vaginal, así como de la modulación del flujo sanguíneo, la secreción y el tono de la pared vaginal. (Ting y col. 2004).

2.4 Multiparidad: histología y fisiología del conducto vaginal

En mujeres disfunciones del piso pélvico como incontinencia urinaria y prolapsos de órganos pélvicos son frecuentes. En algunas poblaciones se estima que aproximadamente el 40% de mujeres sufren de prolapsos de órganos pélvicos y del 2 al 55% padecen incontinencia urinaria. A pesar de que la fisiopatología de las disfunciones del piso pélvico se consideran multifactoriales, la incontinencia urinaria y los prolapsos de órganos pélvicos comparten factores de riesgo entre los que se encuentran condiciones fisiológicas como la cópula (Barberini y col. 1992) y la multiparidad, entre otros, que conllevan a cambios histológicos como la pérdida de la inervación, de musculatura lisa y estriada, y un aumento en la proporción de tejido conectivo en el tracto genitourinario (Xelhuantzi en proceso). Existe una correlación positiva entre patologías como la incontinencia urinaria y el número de partos

vaginales, por lo que el daño en la musculatura pélvica y perineal así como en la inervación durante el parto pudiera ser irreversible (Allen y col. 1990).

La coneja es un buen modelo experimental para estudiar la posible relación de factores de riesgo con los cambios estructurales en la organización tisular del conducto urogenital. En conejas multíparas (cuatro partos) se ha observado que (Xelhuantzi en preparación): a) las hembras multíparas orinan con mayor frecuencia en forma de goteo *vs* las nulíparas (Corona-Quintanilla y col. 2009); b) induce un desarreglo en la histología del aparato urogenital inferior observándose una disminución en el espesor de la capa epitelial y el área de la musculatura lisa a lo largo de los distintos segmentos vaginales, así como de colágeno y elastina de la vagina pélvica; c) en la pared uretral y vaginal existe una mezcla de la submucosa y la capa muscular, por lo que solo se pueden reconocer tres capas la epitelial, intermedia y externa a diferencia de las nulíparas donde se reconocen las 4 capas clásicas de un órgano tubular (mucosa, submucosa, muscular y externa). Esta mezcla en las capas es semejante a lo que ocurre en hembras viejas multíparas, no obstante en estas se incrementa el espesor de la pared debido a un aumento en el espesor del plexo venoso que rodea a uretra y vagina (Rodríguez-Antolín 2007). También se presenta una reducción en el espesor de las tres capas y por lo tanto en el espesor total de la pared vaginal antes y después de la desembocadura de la uretra en el conducto vaginal (Xelhuantzi 2006). En el último tercio del conducto urogenital solo se observa una reducción en la capa epitelial (Bravo 2006); d) disminuye la contractibilidad de las fibras que componen a músculos estriados involucrados en la continencia y expulsión de la orina (Fajardo 2008); y e) induce una disminución en el número de neuronas y promueve un desarreglo en la morfología de los ganglios paravaginales, tal desarreglo no modifica ni el área de los ganglios ni el de los haces nerviosos analizados (Castelán y col. 2008).

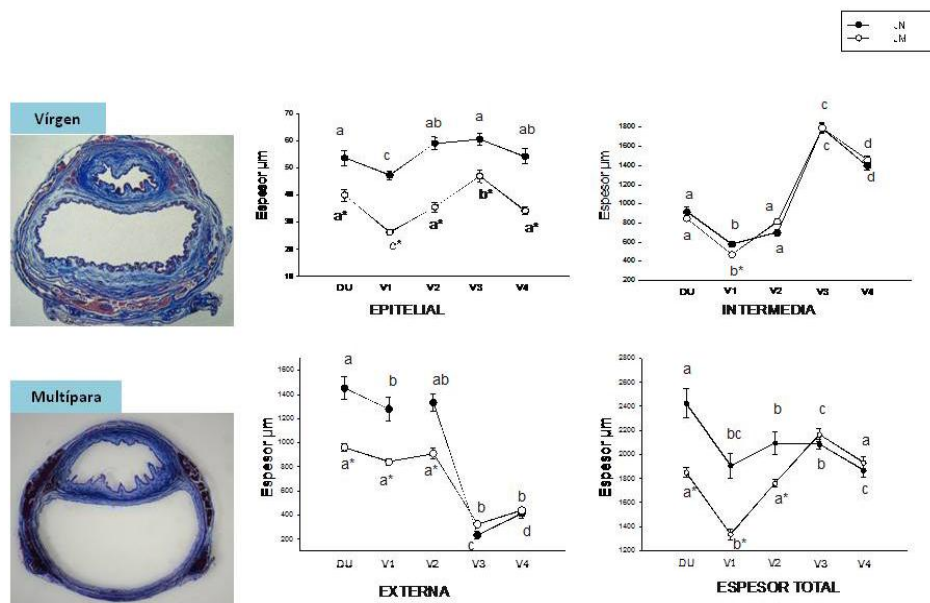


Fig. 3 Cambios histológicos del conducto vaginal debidos a la multiparidad (Xelhuantzi en proceso).

Al parecer la multiparidad también disminuye la concentración sérica de estrógenos. Datos obtenidos por nuestro grupo de investigación muestran que existe un pico máximo en la concentración sérica de estradiol en conejas múltiparas el día 30 de la primera y segunda gestación. El cual ya no se observa durante el día 30 de la tercera y cuarta gestación (Figura 4, López-García 2010). En la rata también se observa una disminución en la concentración sérica de estradiol asociada con la experiencia reproductiva (gestación, parto y lactancia), después de uno (Bridges and Byrnes 2006) o múltiples partos (Matt y col. 1986). En este contexto, es probable que los cambios histológicos encontrados en el conducto vaginal de conejas jóvenes múltiparas vs la de jóvenes nulíparas estén asociados con la concentración de hormonas esteroides circulantes.

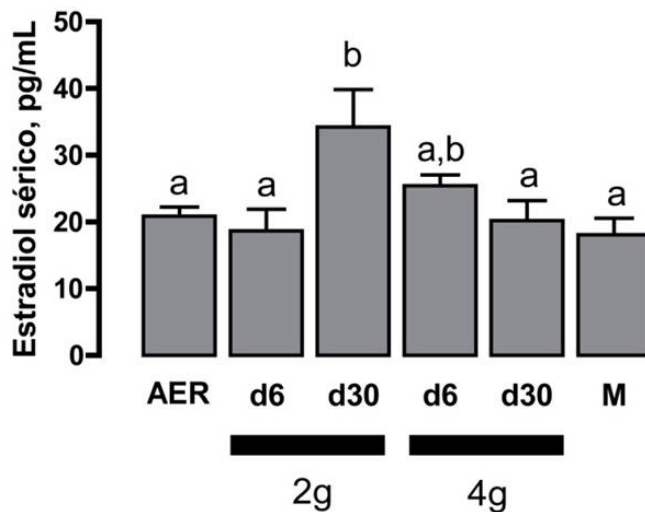


Fig. 4 Concentración sérica de estradiol antes, durante y después de la experiencia reproductiva de la coneja (Lólez-García 2010)

2.5 Conducto vaginal y estrógenos

Las hormonas esteroides se producen en los ovarios. El cerebro regula el funcionamiento del sistema hormonal femenino para que exista una coordinación entre los ovarios, que producen las hormonas, y los órganos femeninos, que las reciben. En la mujer, las glándulas encargadas de mantener la circulación de las hormonas sexuales son los ovarios, el hipotálamo y la hipófisis. Los ovarios son la principal fuente de estrógenos.

Los estrógenos, ejercen una gran variedad de efectos sobre el crecimiento, desarrollo y diferenciación de diversos tejidos entre los que se encuentran la proliferación, estratificación y cornificación del epitelio vaginal (Buchanan y col. 1998). Controlan una serie de procesos fisiológicos, entre los cuales se encuentran los ciclos reproductivos y la gestación (Alonso y col. 2006). Los estrógenos juegan un papel importante en el mantenimiento de la estructura vaginal, de tejidos de soporte pélvico, del metabolismo de colágeno y de la fuerza de contracción del músculo liso vaginal (Higgins y col. 2009; Rehm y col. 2007). Los estrógenos más importantes son el estradiol y la estrona.

Los efectos de los estrógenos (Estradiol, E2) en su órgano blanco están mediados por factores de transcripción conocido como receptores de estrógeno (REs). La expresión de dichos receptores es modulada por la fluctuación en la concentración sérica de estradiol

aunque ésta puede ocurrir a la alza o a la baja dependiendo del tejido y/o del subtipo de receptor en cuestión (Alonso y col. 2006; Papka and Mowa 2003).

En mujeres, los órganos del tracto urinario y genital son sensibles a estas hormonas, ya que expresan REs. Estos receptores también se expresan en el epitelio escamoso de la uretra proximal y distal, y de la vagina. En tejidos de ratón dos subtipos del receptor de estrógenos fueron descritos, receptor de estrógenos α y receptor de estrógenos β (Fu y col. 2003; Hewitt y col. 2003). El receptor de tipo β se encuentra en las paredes vaginales y los ligamentos uterosacros de mujeres pre-menopáusicas. Además, los receptores están localizados en el esfínter uretral y, ayudan a mantener el tono muscular. También se han identificado en los mastocitos de mujeres con cistitis intersticial y en la parte baja del tracto urinario masculino (Robinson and Cardozo 2003).

Las fluctuaciones en los niveles circulantes de estrógenos que se producen durante la gestación y la menopausia, pudieran modificar la función urogenital (Lin y col. 2006; Alonso y col. 2006; Robinson and Cardozo 2003; Hextall 2000). Estudios epidemiológicos relacionan la deficiencia de estrógenos con un incremento en la disfunción del piso pélvico, incluyendo prolapsos de órganos pélvicos, atrofia urogenital, incontinencia urinaria por estrés y recurrentes infecciones urinarias. La terapia de reemplazo con estrógenos es utilizada para tratar a mujeres postmenopáusicas con problemas de incontinencia urinaria y prolapso de órganos pélvicos (Higgins y col. 2009; Robinson and Cardozo 2003). En hembras de mamíferos los estrógenos son importantes moduladores de las funciones reproductivas.

La función vaginal es dependiente del nivel circulante de hormonas sexuales. La remoción de los ovarios (ovariectomía) modifica la histología del conducto vaginal, útero y glándulas mamarias como consecuencia de una reducción en los niveles de estrógenos circulantes. Durante la menopausia el descenso de la función ovárica es asociado con múltiples cambios en tejidos específicos entre los que se incluyen atrofia vaginal y de útero (Atzuki y col. 2009; Moalli y col. 2008).

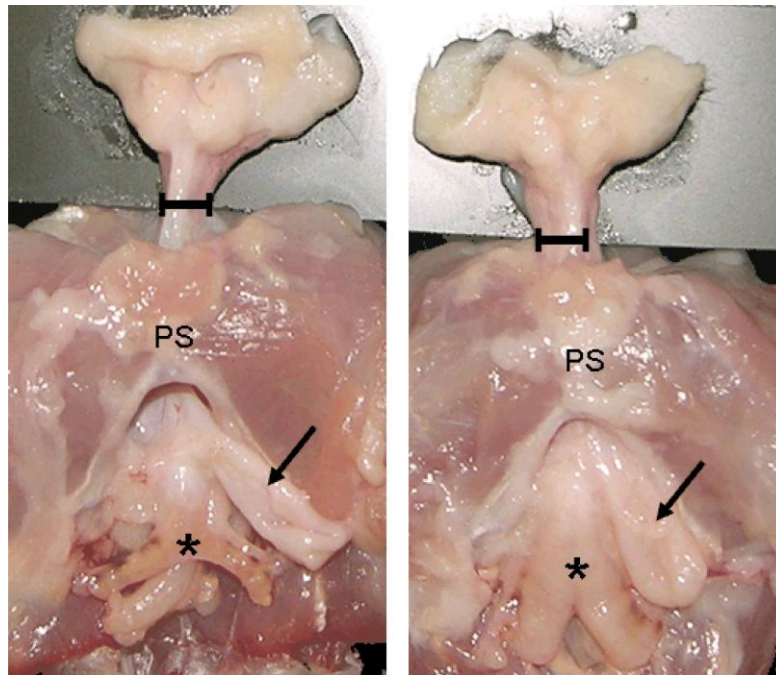


Figura 5. Efecto de la ovariectomía en órganos del aparato urogenital de ratas virgen de 4 meses de edad. La muestra a la izquierda, es de ocho semanas después de la ovariectomía, sin tratamiento hormonal. La muestra de la derecha es de una hembra con cirugía simulada. En la muestra de la derecha se observa atrofia de vejiga (flecha) y útero (asterisco). La barra muestra la disminución en el diámetro de la vagina a la altura media. PS indica la posición de la sínfis púbica (Moalli y col. 2008).

En mujeres premenopáusicas, los ovarios producen la gran mayoría de estrógeno circulante, y con la pérdida de la función ovárica en el momento de la menopausia los niveles circulantes caen drásticamente (Smith 2010). En mujeres postmenopáusicas se ha reportado una reducción en la capa de células epiteliales, incluyendo pérdida de células intermedias, y disminución de músculo liso. Estos cambios histológicos dan origen a patologías como incontinencia urinaria y prolapsos de órganos pélvicos (Moalli y col. 2008; Sanoja y col. 2007; Robinson and Cardozo 2003; Sarrel 1998). En la rata la OVX promueve atrofia de la mucosa uretral, similar a la que se observa en el útero así como un desarreglo evidente sobre la musculatura lisa del conducto vaginal (Pessina y col. 2006). En esta especie se ha reportado un incremento en el peso corporal posterior a la OVX (Shinoda y col. 2002). Cambios en el epitelio vaginal ocurren durante el estro normal y en animales OVX en respuesta a la fluctuación hormonal (Rehm y col. 2007; Poonia y col. 2006; Parakkal 1972). En la coneja las

hormonas esteroides gonadales son fundamentales para mantener la integridad estructural y funcional del tejido vaginal (Kim y col. 2004). La OVX en esta especie induce un incremento en el contenido de colágeno, una disminución en la proporción de musculatura lisa, un marcado adelgazamiento de las capas epiteliales así como una disminución de la microvasculatura en la submucosa del conducto vaginal. Estas modificaciones son recuperadas significativamente después del remplazo con estrógenos (Park y col. 2001; Yoon y col. 2001).

2.5.6 Inervación y esteroides gonadales

La relación entre las hormonas esteroides y la inervación visceral ha sido poco estudiada. Se sugiere que estas hormonas tienen influencia sobre el control neural de los mecanismos de continencia urinaria debido a que la inervación periférica es potencialmente sensible a las hormonas esteroides gonadales. Por lo que una disminución en los niveles de estas hormonas puede contribuir a la disfunción urogenital (Alison y col. 2004; Hextall y col. 2000).

Los ganglios pélvicos expresan el REs. Los subtipos α y β del REs se han localizado en neuronas provenientes de la inervación simpática, parasimpática y las neuronas sensoriales que se proyectan hacia el aparato reproductor femenino, siendo el subtipo α el que predomina (Zoubina and Smith 2002). En contraste, el subtipo β es el que predomina en las neuronas que se proyectan hacia el aparato urinario inferior (Zoubina and Smith 2002; Makela y col. 2000). Por lo que es posible que los estrógenos afecten de forma directa a la inervación vaginal, contribuyendo así a cambios en su función (Ting y col. 2004). La restitución de hormonas gonadales, entre las que se incluye el E2, modifica la inervación que recibe el conducto vaginal de especies como la cerda (Kaleczyc 1994), la rata (Pessina y col. 2006) y el ratón (Purves-Tyson y col. 2007). La contribución de los estrógenos a la organización de estos componentes podría ser tan importante como lo es para la capa epitelial de la vagina. En modelos animales el tratamiento con E2 aumenta la zona receptora de contacto a través del nervio pudiendo y mejora la actividad sensorial (Park y col. 2001). El efecto específico de la terapia de estrógenos puede deberse a la expresión diferencial de los genes que codifican para los REs lo cual depende del estado fisiológico del tejido blanco (Fu y col. 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

La concentración de estrógenos es menor en la coneja joven multípara que en la nulípara (López-García 2010). En la rata también se observa una disminución en la concentración sérica de estradiol asociada con la experiencia reproductiva (gestación, parto y lactancia), después de uno (Bridges and Byrnes 2006) o múltiples partos (Matt y col. 1986). En este contexto, es probable que los cambios histológicos encontrados en el conducto vaginal de conejas jóvenes multíparas *vs* la de jóvenes nulíparas estén asociados con la concentración de hormonas esteroides circulantes.

4. HIPÓTESIS

En la coneja, los estrógenos contribuyen en la organización histológica de los componentes tisulares de la vagina pélvica.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la contribución de los estrógenos en la organización histológica de la mucosa, musculatura (lisa y estriada), colágeno y la inervación autonómica paravaginal de la vagina pélvica.

5.2 Objetivos particulares

En la vagina pélvica de conejas vírgenes, ovariectomizadas y ovariectomizadas con administración de benzoato de estradiol:

- a. Describir la organización de la mucosa
- b. Determinar la proporción de paquetes de musculatura lisa y estriada.
- c. Determinar la proporción de fibras de colágeno.
- d. Determinar la morfología de la inervación autonómica paravaginal (ganglios paravaginales y fascículos nerviosos).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Modelo experimental

Se utilizaron conejas (*Oryctolagus cuniculus*) adultas (11-12 meses de edad) de la raza Chinchilla mantenidas en condiciones estándar de bioterio. Con un ciclo de 16 h / 8 h de luz y oscuridad. Los animales fueron alojados en jaulas individuales de acero inoxidable de 50 x 60 x 40 cm, con alimento Purina y agua *ad libitum*, a una temperatura de 22 ± 2 °C. Las conejas se dividieron en los siguientes grupos (n=6 por cada grupo): control (C); ovariectomizadas (OVX) y OVX + benzoato de estradiol (OVX+BE). Para la ovariectomía, las conejas de los grupos OVX y OVX+BE fueron anestesiadas vía intramuscular con una combinación de ketamina (0.2 ml/Kg) y xilacina (0.15 ml/Kg). Para extraer los ovarios se realizaron incisiones bilaterales que se cerraron con sutura de seda. Después de tres meses y medio de la cirugía, al grupo OVX+BE se le implanto por mes y medio una capsula de silastic con benzoato de estradiol (70 mg). El manejo de los animales de experimentales se hizo bajo los lineamientos establecidos por los protocolos de bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM) y el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (UATx).

6.2 Cuantificación de la concentración sérica de estradiol

Las muestras sanguíneas se obtuvieron el día del sacrificio por punción cardiaca. El suero fue separado por centrifugación (a 10,000 rpm, 15 min) y se almacenó para su análisis a -30 °C. Para la extracción de esteroides totales se colocaron 100 µL de suero en un tubo de vidrio. Se agregó a cada tubo un mL de éter etílico y se agitó durante 30 s. Posteriormente, se colocaron las muestras en el congelador hasta la separación de fases. La fase orgánica fue recolectada y el éter etílico se evaporó en baño María a 40°C en una campana de extracción. A continuación se agregó un mL de metanol a cada tubo, se agitó por 10 s, y se centrifugó (a 5000 rpm, 5 min). El etanol se evaporó en baño María a 80°C en una campana de extracción. El extracto fue re-suspendido en 55 µL de buffer de ELISA (PBS 50Mm/ 0.1% gelatina). Se centrifugaron las muestras a 10000 rpm por un minuto. Posteriormente, las muestras se incubaron por 10 min a 37°C en baño María. La cuantificación de estradiol se hizo por la técnica de ELISA. Se colocaron 25 µL de la muestra con 100 µL de estradiol HRP y 50 µL de rabbit anti-estradiol

mezclandose por 30 s. Se incubaron por 90 min a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con 300 μ L de buffer de lavados 1x. Posteriormente, se adicionaron 100 μ L de TMB y se incubaron por 20 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 100 μ L de solución de paro. La lectura se realizó con un espectrofotómetro a 450 nm.

6.3 Obtención y procesamiento de la vagina pélvica

Las conejas se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (60 mg / Kg peso, ip.). Se realizó una incisión sobre la línea media, desde la cavidad abdominal hasta la vagina perineal. Los músculos abdominales y el tejido adiposo del área fueron extraídos. Después se extrajeron los huesos (isquion y pubis) y los músculos obturadores (externos e internos). Se ligaron venas y arterias que irrigan al plexo venoso para evitar hemorragias y obtener el conducto vaginal. Después de la extracción del conducto, se delimitó la vagina pélvica. Que fue fijada en solución de Bouin-Duboscq (ácido Pícrico 0.39 %, formalina 26.66 %, Ac. Acético 6.66 %, etanol 80 %) por 24 h. Posteriormente, la vagina pélvica se lavo y deshidrato en alcohol etílico en concentraciones ascendentes (70, 80, 96 y 100%). Fue aclarada en xileno, infiltrada e incluida en paraplast X-tra (Sigma). Para obtener cortes transversales de 7 μ m en un micrótopo Leica (RM2135) colectados en portaobjetos formando series paralelas. Teñidos con tricrómica de Masson (específica para colágeno); Azul de Alcian a pH 2.5 (para mucinas ácidas no sulfatadas) y Ácido Peryódico de Schiff (PAS; para células en polisacáridos).

6.3.1 Tinción tricrómica de Masson

Los cortes se desparafinan para sumergirlos en el mordente Bouin por 24 hrs, y poder correr el siguiente tren de tinción.

1. Lavar con agua corriente.
2. Teñir con hematoxilina de Weigert por 11 min (lavar con agua corriente y agua destilada por 40 s).
3. Colocar en amoniaco al 1% por dos min (lavar con agua corriente).

4. Teñir con Fushina ácida- escarlata de Biebrich por cuatro min (lavar con agua corriente).
5. Diferenciar con solución de ácido fosfomolibdico: ácido fosfotungstico por cuatro min.
6. Contrastar con azul de anilina por tres min.
7. Diferenciar con solución de ácido acético glacial al 1% por tres min (lavar en agua corriente).
8. Deshidratar y aclarar a través etanol en concentraciones ascendentes, etanol-xileno (1:1) y xileno. Montar en Cytoseal-60 (Richard- Allan Scientific).

6.3.2 *Azul alcian*

Los cortes se desparafinan para el siguiente tren de tinción.

1. Colocar en la solución de ácido acético al 3% por tres min.
2. Teñir con la solución de azul alcian por 30 min (lavar con agua corriente por 10 min y enjuagar con agua destilada).
3. Contrastar con la solución de rojo núcleo-resistente por cinco min (lavar con agua corriente).
4. Deshidratar y aclarar a través etanol en concentraciones ascendentes, etanol-xileno (1:1) y xileno. Montar en Cytoseal-60 (Richard- Allan Scientific).

6.3.2 *Ácido Peryódico de Schiff (PAS)*

Los cortes se desparafinan para el siguiente tren de tinción.

1. Oxidar en la solución de ácido peryódico por cinco min (lavar con agua destilada).
2. Colocar en el reactivo de Schiff de Coleman por 15 min (lavar con agua corriente tibia por 10 min).

3. Contrastar con la solución de hematoxilina de Harris por seis min (lavar con agua corriente por 15 min).
4. Deshidratar y aclarar a través etanol en concentraciones ascendentes, etanol-xileno (1:1) y xileno. Montar en Cytoseal-60 (Richard- Allan Scientific).

6.4 Análisis histológico

La vagina pélvica se dividió en dos segmentos para su análisis: vagina pélvica antes la desembocadura de la uretra y vagina pélvica después de la desembocadura de la uretra. Por cada segmento se seleccionaron 30 portaobjetos (por coneja), considerando como punto de partida la desembocadura de la uretra. Los cuales se tiñeron de forma alterna con tricrómica de Masson, Azul de Alcian y PAS.

El análisis cualitativo se realizó en cortes teñidos con las tres tinciones, para determinar el tipo de secreción y organización tisular de la vagina pélvica. Las observaciones se hicieron en un microscopio Nikon ECLIPSE E600 a 20X y 40X y fotografiadas con una cámara OLYMPUS a una resolución de 5.1 megapíxeles.

El análisis morfométrico se realizó en los cortes teñidos con tricrómica de Masson. Para determinar la proporción de musculatura (lisa y estriada) y colágeno. Así como, el área de los ganglios paravaginales y fascículos nerviosos. Y número y área de las neuronas ganglionares. Para el muestreo se consideraron los puntos equiparables tres-nueve en sentido de las manecillas del reloj (Figura 7). Las observaciones se realizaron en un microscopio de luz visible Nikon ECLIPSE E600. Se fotografiaron campos en las capas mucosa, muscular, externa y ganglios paravaginales, con una cámara OLYMPUS a una resolución de 5.1 megapíxeles. Con los objetivos 10X (neuronas), 20X (músculo liso) y 40X (músculo estriado). El análisis de imágenes se hizo con la ayuda del programa *AxioVision Rel 4.3*.

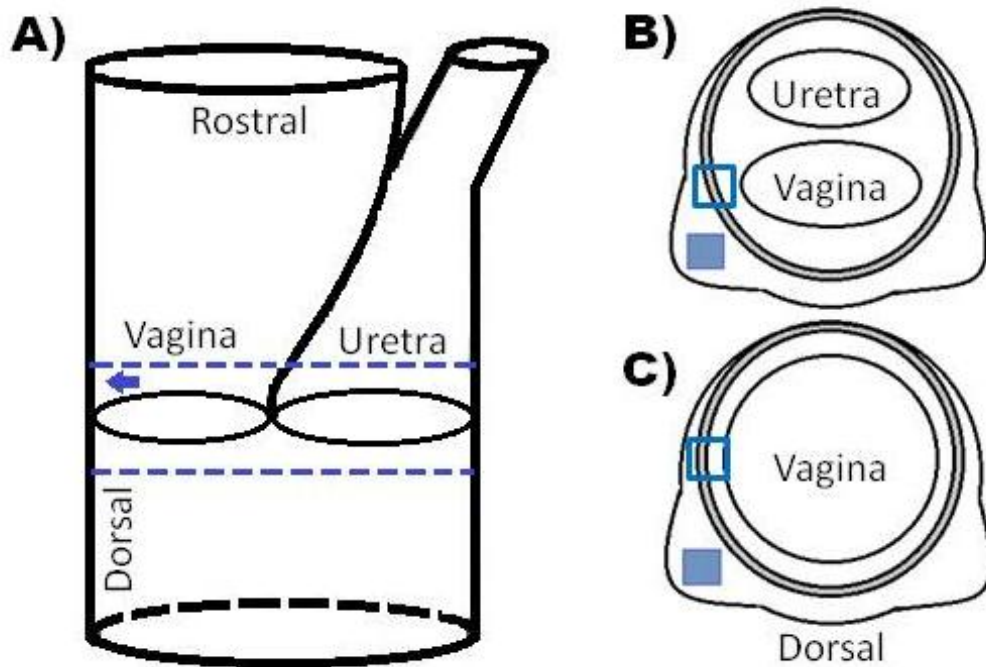


Figura 6. A) Esquema con vista longitudinal del segmento pélvico del tracto vaginal de la coneja. Esquemas de las regiones A) anterior y B) posterior a la desembocadura de la uretra. Los recuadros indican la posición de muestreo en cada punto.

6.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se hizo mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un nivel de significancia a una $P=0.05$ para determinar diferencias en la proporción de musculatura (lisa y estriada) y colágeno. Así como, el área de los ganglios paravaginales y fascículos nerviosos. Y el número y área de las neuronas ganglionares. Para determinar la diferencia entre grupos se utilizó una *post-hoc* de Tukey-Kramer. Se consideró para el diseño un factor independiente (condición: C, OVX y OVX+BE) de efectos fijos y como variable de respuesta la proporción de musculatura y colágeno (%); número de neuronas y área del soma, ganglios paravaginales y fascículos nerviosos (μm^2).

El análisis se hizo con la ayuda del programa Prism v4.0 para Windows (GraphPad). En todos los casos se graficó la media \pm el error estándar.

7. RESULTADOS

7.1 Parámetros morfométricos

Se encontraron diferencias en los patrones morfométricos entre los grupos. En la tabla 2 se muestran los pesos de las conejas C, OVX y OVX+BE, así como el peso del útero de cada grupo. Los pesos de los animales fueron similares en los tres grupos (4.68 ± 0.23 vs 4.49 ± 0.14 vs 4.11 ± 0.19 Kg). El peso del útero es menor en el grupo OVX (4.25 ± 0.49 g, $P>0.05$) respecto a los otros dos grupos experimentales (C 14.58 ± 1.18 , OVX+BE 16.43 ± 1.44 g). El peso del útero fue similar en los grupos C y OVX+BE (14.48 ± 1.18 vs 16.43 ± 1.44 g).

A) Peso del animal		
C	OVX	OVX+BE
4.68 ± 0.23 Kg ^a	4.49 ± 0.14 Kg ^a	4.11 ± 0.19 Kg ^a
B) Peso del útero		
C	OVX	OVX+BE
14.58 ± 1.18 g ^a	4.25 ± 0.49 g ^b	16.43 ± 1.44 g ^a

Tabla 2. Parámetros morfométricos tomados el día del sacrificio. A) Peso de conejas C, OVX y OVX+BE. B) Peso del útero de conejas C, OVX y OVX+BE. Los datos muestran la media \pm e.e. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos. ANOVA de una vía, *post hoc* Tukey–Kramer, $P>0.05$

7.2 Concentración sérica de estradiol

Se observaron diferencias en la concentración sérica de E2 entre los grupos. En la figura 7 se observa que la concentración sérica de E2 para el día del sacrificio fue similar en el grupo OVX (17.82 ± 2.32 pg/mL) y el grupo C (21.14 ± 1.53 pg/mL). La del grupo OVX+BE fue mayor (160.6 ± 43.03 pg/mL, $P>0.05$) que en los otros grupos.

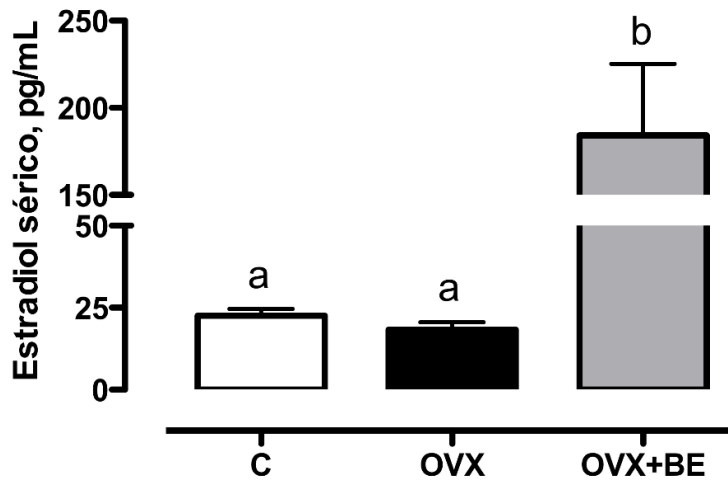


Figura 8. Concentración sérica de estradiol de conejas control (C), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas con restitución de benzoato de estradiol (OVX+BE). Las muestras se obtuvieron el día del sacrificio por punción cardíaca. Las muestras fueron cuantificadas por duplicado. Los datos representan la media \pm e.e. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos. ANOVA de una vía, *post hoc* Tukey–Kramer, $P > 0.05$.

7.3 Características histológicas de la vagina pélvica

Las características histológicas de la vagina pélvica fueron distintas entre los grupos. De manera cualitativa en la figura 9 se observa que en el grupo OVX (B) hay una mayor vascularización vs el grupo C (A). La vascularización en el grupo OVX (A) y el grupo OVX+BE (C) fue similar. El orificio uretral en el grupo OVX se observó más grande vs el grupo C. En el grupo OVX+BE (C) se observa que el efecto es revertido, siendo distinto al control.



Figura 9. Corte transversal de la vagina pélvica de conejas control (C), ovariectomizadas por 5 meses (OVX) y ovariectomizadas 3.5 meses y tratadas durante 1.5 meses con benzoato de estradiol (OVX+BE). Barra 2 mm.

Se observaron diferencias en la organización histológica de la vagina pélvica entre los grupos. La OVX modificó la organización histológica de las capas submucosa y muscular. Esto no permitió evaluar el efecto hormonal en cada una, por lo que se analizó una capa intermedia que incluía a las dos. Los resultados que se muestran corresponden a la mucosa, capa intermedia (submucosa y muscular) y externa. Comenzando con una descripción cualitativa seguida de una cuantitativa.

7.4 Características histológicas de la mucosa

La organización histológica de la capa mucosa es diferente entre los grupos. En la figura 10 se observa que el grupo OVX (B y E) presenta escasas células positivas a PAS y azul del alciano en comparación con el grupo C (A y D). En el grupo OVX+BE (C, D) se observó una disminución en el número células epiteliales positivas a PAS vs el grupo C. Para azul de alciano el marcaje de las células de la zona apical fue mayor en el grupo OVX+BE vs el grupo C.

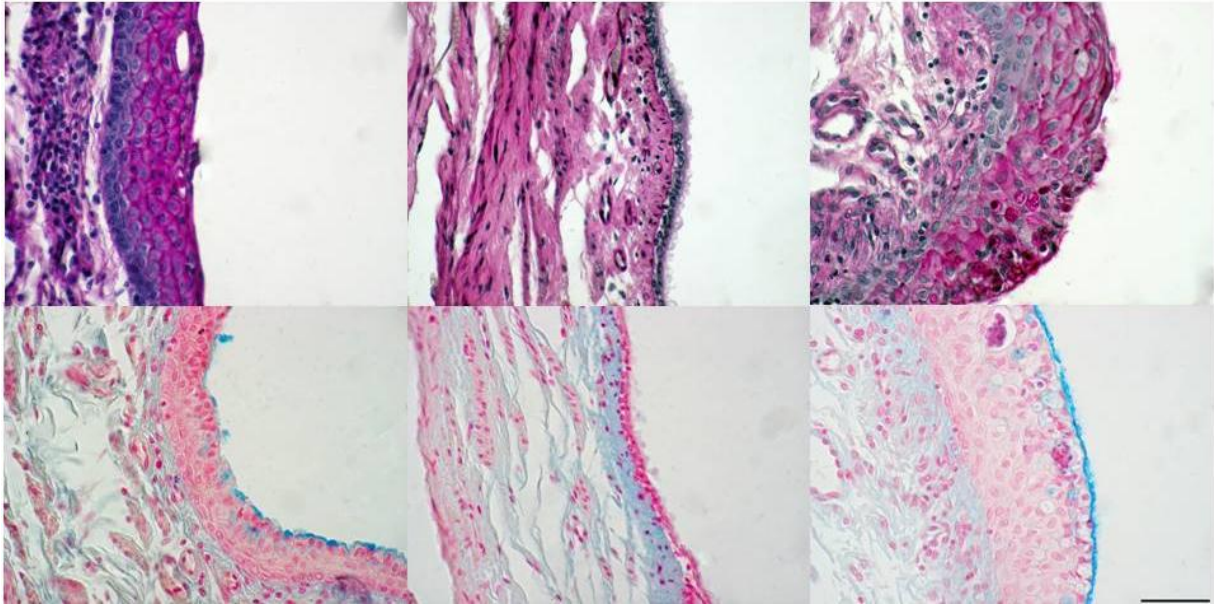


Figura 10. Características histológicas de la mucosa de la vagina pélvica de conejas control (C; A,D), ovariectomizadas por 5 meses (OVX; B,E) y ovariectomizadas 3.5 meses y tratadas durante 1.5 meses con benzoato de estradiol (OVX+BE; C,F). Teñidas con PAS (A, B y C) y azul de alciano (D, E y F).

7.4.1 *Espesor de la capa epitelial*

El espesor de la capa mucosa fue diferente entre los grupos. La OVX induce atrofia de la mucosa vaginal (Figura 11). El grupo OVX muestra una disminución en el número de estratos celulares y una disminución en el espesor de esta capa vs el grupo C (47.48 ± 1.72 vs $68.76 \pm 6.85 \mu\text{m}$, $P < 0.0001$). La administración endógena de BE tiene un efecto inverso. En este grupo se observa un mayor número de estratos celulares vs el grupo C. El espesor en el grupo OVX+BE fue mayor que en el grupo C (93.86 ± 5.02 vs $68.76 \pm 6.85 \mu\text{m}$, $P < 0.0001$).

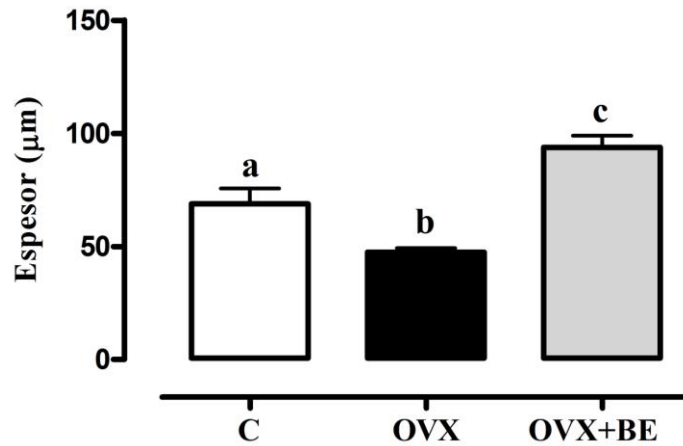


Figura 11. Espesor de la mucosa de la vagina pélvica de conejas control (C), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas con administración de benzoato de estradiol (OVX+BE). Los valores representan la media \pm e.e. de 20 cortes analizados por coneja. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre los grupos. ANOVA de una vía $P < 0.05$, *post hoc* Tukey-Kramer.

7.5 Características histológicas de la capa intermedia

7.5.1 Componentes histológicos

La organización histológica de la capa intermedia es diferente entre los grupos. En la figura 12, se puede observar de manera cualitativa que la OVX incrementa la concentración de colágeno vs el grupo C. Los paquetes de músculo liso en este grupo son de menor tamaño vs el grupo C. En comparación con el control, la administración de BE reduce la concentración de colágeno y paquetes de músculo liso. En los grupos OVX y OVX+BE se observó una mayor vascularización vs el grupo C.

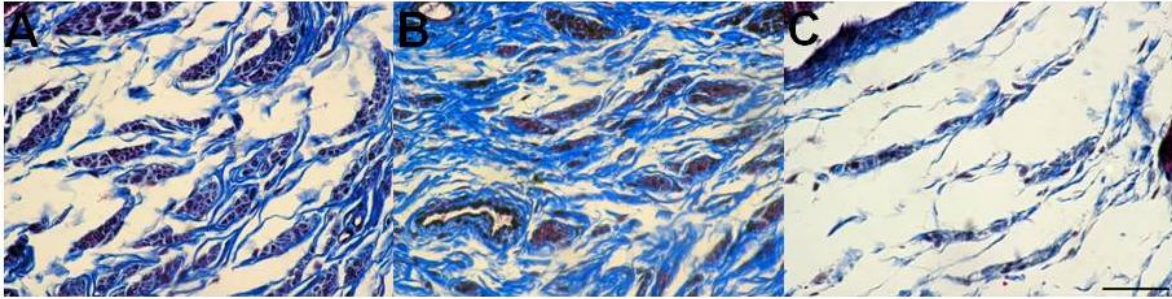


Figura 12. Componentes histológicos de la capa intermedia de la vagina pélvica de conejas control (C, A), ovariectomizadas (OVX, B) y ovariectomizadas con administración de benzoato de estradiol (OVX+BE, C). Barra 50 μm .

7.5.2 Espesor de la capa intermedia

El espesor de la capa intermedia fue similar en los grupos C, OVX y OVX+BE (594.8 ± 65.32 vs 527.8 ± 47.71 vs 631.0 ± 94.22 μm , $P=0.585$).

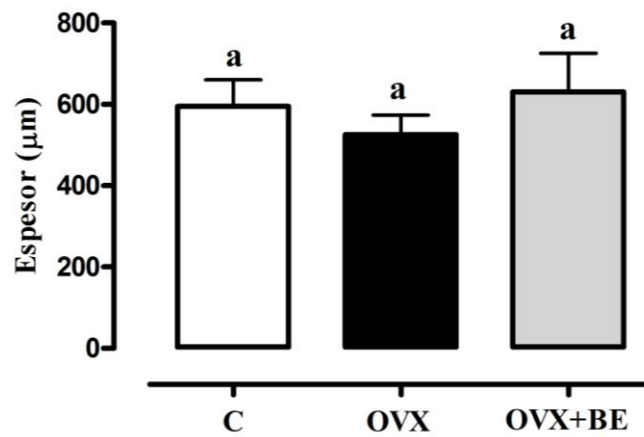


Figura 13. Espesor de la capa intermedia de la vagina pélvica de conejas control (C), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas con administración de benzoato de estradiol (OVX+BE). Los valores representan la media \pm e.e. de 20 cortes analizados por coneja. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre los grupos. ANOVA de una vía $P>0.05$.

7.5.3 Proporción de músculo liso y colágeno

La concentración de músculo liso fue similar en los grupos OVX y C. En la figura 14aA, se observa que la administración de BE disminuye la concentración de músculo liso en el grupo OVX+BE ($7.14 \pm 1.08 \mu\text{m}^2$) vs los grupos C y OVX (15.91 ± 1.74 , $15.75 \pm 0.43 \mu\text{m}^2$, $P=0.0001$).

En la figura 14B, se observa que la OVX incrementa la proporción de colágeno vs el grupo C (43.50 ± 3.00 vs $27.79 \pm 1.22 \mu\text{m}^2$, $P<0.0001$). La administración endógena de BE tiene un efecto inverso. La proporción de colágeno disminuye en el grupo OVX+BE vs los grupos C y OVX (17.77 ± 1.25 vs 27.79 ± 1.22 vs 43.50 ± 3.00 , $P<0.0001$).

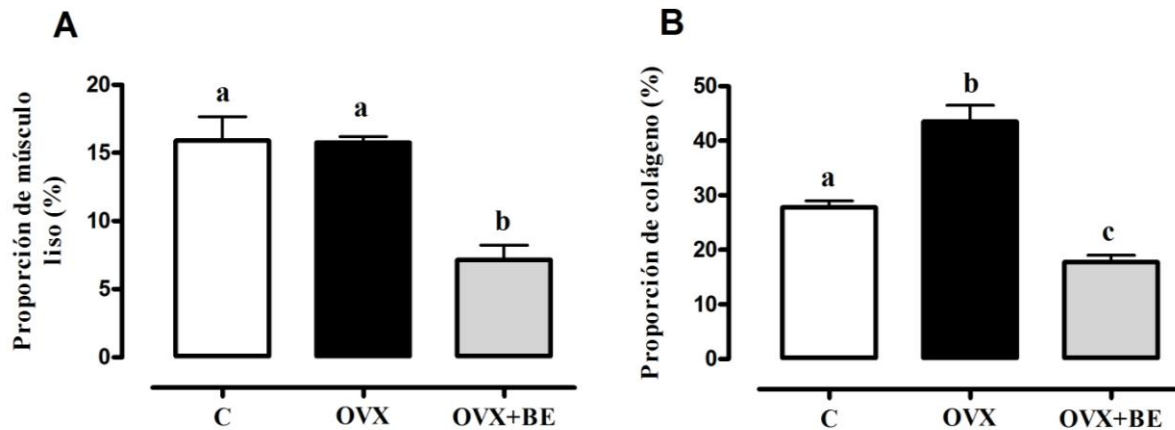


Figura 14. Proporción de músculo liso (A) y colágeno (B) de la capa intermedia de la vagina pélvica de conejas control (C), ovariectomizadas por 5 meses (OVX) y ovariectomizadas 3.5 meses y tratadas durante 1.5 meses con benzoato de estradiol (OVX+BE). Los valores representan la media \pm e.e. de 20 cortes analizados por coneja. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los grupos. ANOVA de una vía $P<0.05$, *post hoc* Tukey-Kramer.

7.6 Características histológicas de la capa externa

7.6.1 Componentes histológicos

La organización histológica de la capa externa es diferente entre los grupos. De manera cualitativa observamos que la fibras de músculo estriado en los grupos OVX y OVX+BE son

más anchas que las presentes en el grupo control. En el grupo OVX+BE, se observa un menor número de fibras musculares.

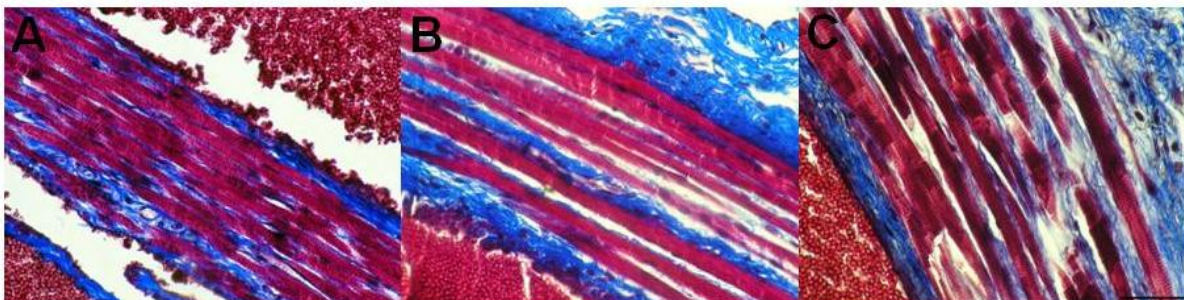


Figura 15. Componentes histológicos de la capa externa de la vagina pélvica de conejas control (C, A), ovariectomizadas (OVX, B) y ovariectomizadas con administración de benzoato de estradiol (OVX+BE, C).

7.6.2 Espesor de la capa externa

El espesor de la capa externa fue similar entre los grupos (C, 1100 ± 177.20 vs OVX, 629.5 ± 90.42 vs OVX+BE, 897.1 ± 146.40 μm , $P= 0.096$).

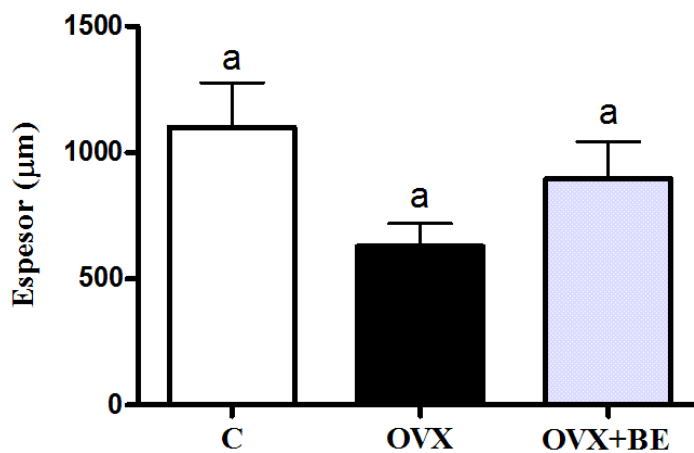


Figura 16. Espesor de la capa externa de la vagina pélvica de conejas control (C), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas con administración de benzoato de estradiol (OVX+BE). Los valores representan la media \pm e.e. de 20 cortes analizados por coneja. Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre los grupos. ANOVA de una vía $P>0.05$.

7.6.3 Proporción de músculo estriado y colágeno

La OVX incrementa la proporción de músculo estriado en la capara externa. El grupo OVX muestra una concentración mayor vs el grupo C (46.28 ± 4.94 vs $27.85 \pm 4.94 \mu\text{m}^2$, $P=0.0007$). Efecto que no es revertido con la administración de BE (Figura 17A). La concentración de músculo estriado fue similar en los grupos OVX y OVX+BE (46.28 ± 4.94 vs $56.70 \pm 1.78 \mu\text{m}^2$, $P<0.05$).

La concentración de colágeno fue similar entre los grupos (C 26.67 ± 4.24 vs OVX 21.24 ± 1.99 vs OVX+BE $24.73 \pm 3.71 \mu\text{m}^2$, $P=0.543$).

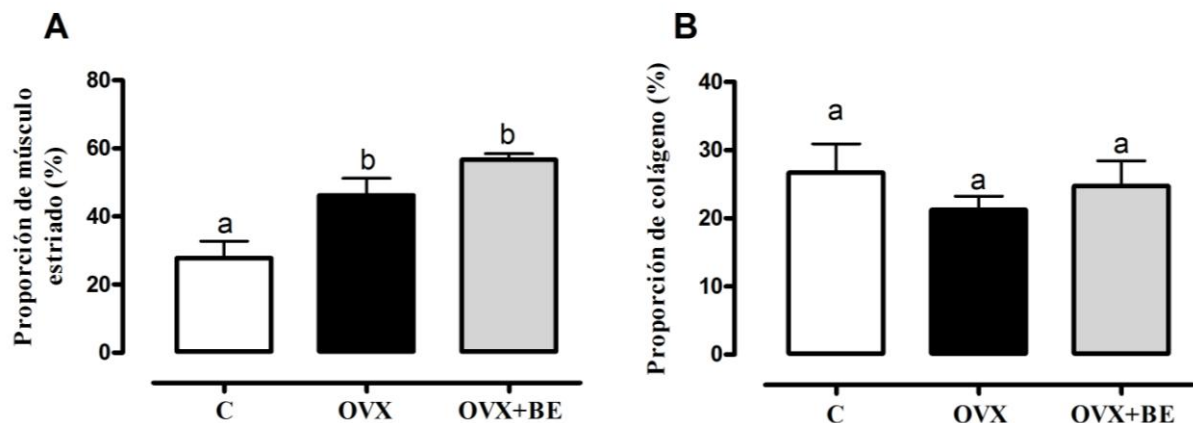


Figura 17. Proporción de músculo estriado (A) y colágeno (B) en la capa externa de la vagina pélvica de conejas control (C), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas con administración benzoato de estradiol (OVX+BE). Los valores representan la media \pm e.e. de 20 cortes analizados por campo de cada coneja. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos. ANOVA de una vía $P<0.05$, *post hoc* Tukey-Kramer.

7.7 Morfología de los ganglios autonómicos paravaginales

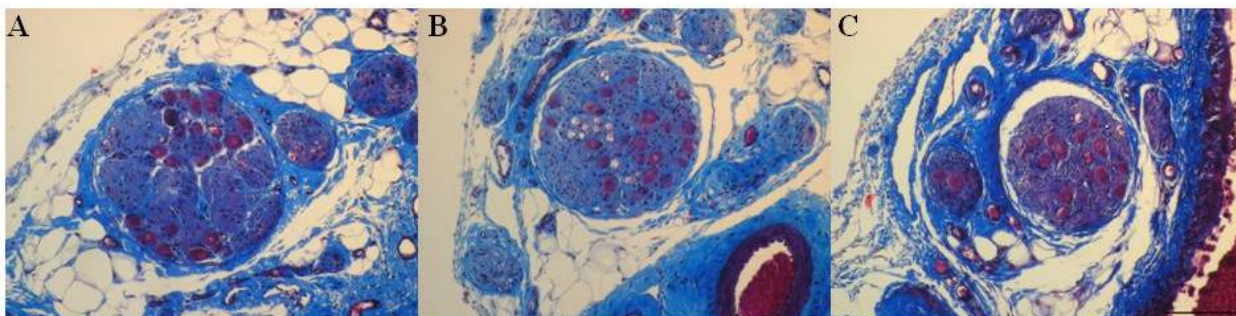


Figura 18. Ganglios autonómicos paravaginales de la vagina pélvica de conejas control (C, A), ovariectomizadas por 5 meses (OVX, B) y ovariectomizadas 3.5 meses y tratadas durante 1.5 meses con benzoato de estradiol (OVX+BE, C). Barra 100 μm .

El área de los ganglios autonómicos paravaginales fue diferente entre los grupos (Figura 19A). La OVX disminuye el área de los ganglios autonómicos paravaginales vs el grupo C. La administración de BE no revierte tal efecto (Figura 19A). Los grupos OVX y OVX+BE muestran un área menor respecto al grupo C (9800 ± 2438 , 14577 ± 3979 vs 39209 ± 6776 μm^2 , $P= 0.001$).

El número de neuronas fue similar entre los grupos C, OVX y OVX+BE (13.55 ± 1.52 vs 12.98 ± 3.23 vs 13.43 ± 2.03 μm^2 , $P= 0.983$). La OVX no modifica el número de neuronas por campo (Figura 19A). El área del soma de las neuronas es diferente entre los grupos. La OVX disminuye el área del soma de las neuronas vs el grupo C (281.8 ± 16.76 vs 494.2 ± 41.66 μm^2 , $P= 0.0009$, Figura 19B). La administración de BE revierte los efectos observados en el grupo OVX. El área del soma de las neuronas fue similar en los grupos C y OVX+BE (494.2 ± 41.66 vs 435.2 ± 33.31 μm^2 , $P=0.05$).

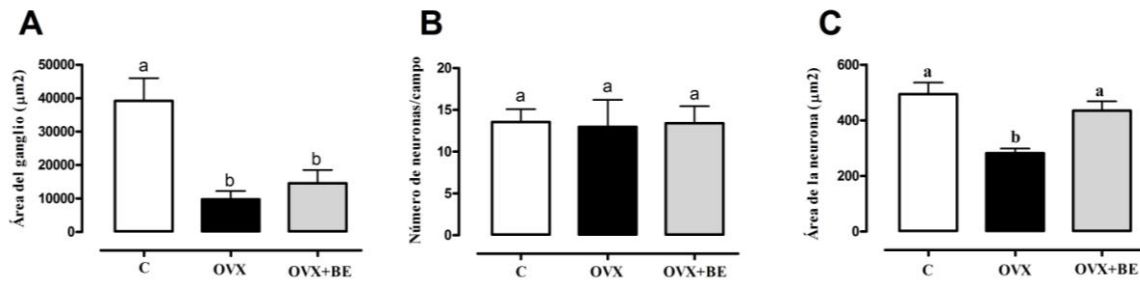


Figura 19. Área del ganglio (A), número (B) y área (C) de neuronas por campo de la vagina pélvica de conejas control (C), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas con administración de benzoato de estradiol (OVX+BE). Los valores representan la media \pm e.e. de 20 cortes analizados por campo de cada coneja. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos. ANOVA de una vía $P>0.05$, *post hoc* Tukey-Kramer.

7.7.1 Área de los haces nerviosos

La figura 20 muestra que el área de los haces nerviosos también son afectados por la ovariectomía. La administración endógena de BE no revierte este efecto. Los grupos OVX y OVX +BE muestran un área menor respecto al grupo C (3634 ± 1034 , 4996 ± 1429 vs $14673 \pm 2442 \mu\text{m}^2$, $P= 0.0008$).

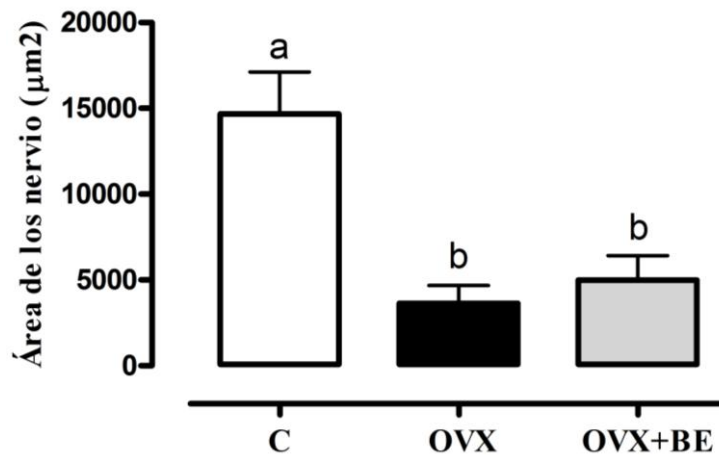


Figura 20. Área de los haces nerviosos de neuronas por campo de la vagina pélvica de conejas control (C), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas con administración de benzoato de estradiol (OVX+BE). Los valores representan la media \pm e.e. de 20 cortes analizados por campo de cada coneja. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos. ANOVA de una vía $P>0.05$, *post hoc* Tukey-Kramer.

8. DISCUSIÓN

Los estrógenos contribuyen en la organización histológica de componentes tisulares de la vagina pélvica de la coneja domestica. Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que los estrógenos influyen sobre el espesor de la capa mucosa pero no sobre el de la interna ni externa. La OVX tiene efectos sobre la concentración de músculo y colágeno. El área del ganglio, haces nerviosos y neuronas ganglionares es dependiente de E2. Estudios en modelos OVX reportan atrofia vaginal, acumulación de colágeno, disminución de la microvasculatura y cambios en la densidad nerviosa autonómica de la pared vaginal (Moalli y col. 2008; Ting y col. 2004; Giraldi y col. 2002). Resultados que en parte son consistentes con lo que hemos encontrado.

8.1 Modelo

Debido a que los cambios histológicos en el conducto vaginal pueden deberse a una variedad de factores es necesario establecer modelos animales que nos permitan diferenciar el efecto de cada factor. En la vagina pélvica de la coneja doméstica pudimos evaluar los cambios histológicos debidos a la OVX en las capas mucosa, intermedia y externa. La inervación autonómica paravaginal también fue evaluada. Estos componentes histológicos son determinantes para ejecutar diversos procesos fisiológicos como son la micción, la cópula y el parto. También involucrados durante la respuesta sexual femenina (Min y col. 2004).

Algunos resultados obtenidos en nuestro modelo contrastan con lo reportado para el modelo de OVX bilateral en la rata y la coneja blanca de Nueva Zelanda. La discrepancia puede deberse al corto plazo relativamente después de la OVX y la subsecuente administración hormonal en los modelos, lo que puede no haber permitido observar cambios en la histología del conducto vaginal. Para estos modelos se han empleado de dos a seis semanas de OVX por dos a cuatro semanas de administración hormonal (Pessina y col. 2006; Kim y col. 2004; Park y col. 2001; Yoon y col. 2001). Tiempos menores a los nuestros. Nosotros implementamos tres meses y medio de OVX por mes y medio de administración de BE. Sanoja y col. (2005) reportaron que los cambios histológicos promovidos por la OVX se observan de cuatro a ocho semanas posteriores a la cirugía. Kim y col. (2004) reportaron que la administración hormonal dos semanas después de la OVX previene la pérdida de músculo

liso que ocurre en la tercera y cuarta semana. Los tiempos de OVX y administración hormonal son determinantes para evaluar el efecto de los estrógenos sobre la histología vaginal. Las diferencias en la organización histológica a lo largo del conducto vaginal es otro factor que podría explicar el contraste en los resultados. Los reportes del efecto de los estrógenos sobre la histología del conducto vaginal se han enfocado en la vagina abdominal y perineal. Las capas analizadas has sido la mucosa y la intermedia (Pessina y col. 2006; Kim y col. 2004; Park y col. 2001; Yoon y col. 2001). No se ha reportado el efecto de los estrógenos sobre la vagina pélvica, la capa externa y los ganglios autonómicos paravaginales.

8.2 Efecto de la ovariectomía sobre los parámetros morfométricos y la concentración sérica de estradiol

Las hormonas esteroides, entre los que se encuentra el estradiol (E2), son indispensables para mantener la función y la integridad estructural de los órganos reproductivos femeninos (Kim y col. 2004). Se ha reportado que la experiencia reproductiva promueve cambios en la concentración sérica de E2 después de uno o múltiples partos (López-García 2010; Bridges and Byrnes 2006; Matt y col. 1986). Estos cambios van acompañados de modificaciones histológicas en la vagina pélvica del conducto vaginal de la coneja doméstica (Xelhuantzi en preparación). En el modelo de multiparidad no se puede descartar el daño mecánico y saber la contribución hormonal.

La menopausia se caracteriza por una marcada reducción en la producción de estrógenos (Purohit and Reed 2002). La OVX conduce casi a la total privación de esteroides sexuales lo que permite conocer los efectos de estas hormonas en sus órganos blanco (Kim y col. 2004). Como se observa en la figura 8 la concentración sérica de E2 es similar en los grupos C y OVX. Se observo atrofia de útero en el grupo OVX (Tabla 2), lo que infiere una fluctuación en la concentración sérica de E2. Tejidos como útero y vagina expresan receptores de estrógenos, por lo que son sensibles a estas hormonas (Hextall 2000). La expresión del receptor de estrógenos (REs) es modulada por la fluctuación hormonal aunque esta puede ocurrir a la alza o a la baja dependiendo del tejido y/o del subtipo de receptor en cuestión (Alonso y col. 2006). En la mujer, se han reportado atrofia de vagina y útero posterior a la menopausia. Estos cambios morfológicos están asociados con una reducción del 50% en la

concentración sérica de E2 (Lin y col. 2006; Berman y col. 1999; Semmelink y col. 1990). En mujeres premenopausicas la producción de E2 es de 400g/24h, después de la menopausia disminuye a 6g/24h (Purohit and Reed 2002). En la rata se ha reportado atrofia de útero y disminución en el peso y longitud de la vagina posterior a la OVX. En esta especie, la concentración sérica de E2 disminuye en un 63% posterior a la OVX (Moalli y col. 2008; Alison y col. 2004; Kim y col. 2004). En contraste, Shinoda y col. (2002) reportaron que cuatro semanas posteriores a la OVX la concentración sérica de E2 en la rata disminuye en un 27%. En la coneja los cambios histológicos encontrados en la vagina perineal se relacionan con una disminución en la del 35% en la concentración sérica de E2 (Kim y col. 2004; Park y col. 2001).

En nuestro modelo, la administración de BE incrementa la concentración sérica de E2 aproximadamente en un 80% respecto al grupo C. Zoubina y col. (2001) reportaron resultados similares en la rata después de la administración de 17- β estradiol. En la rata se ha observado un incremento del doble en la concentración sérica de E2 después de ocho semanas de tratamiento (Shinoda y col. 2002). En la coneja blanca de Nueva Zelanda se ha reportado un incremento de aproximadamente el 90% en la concentración sérica de E2 (datos no publicados) administrando dosis suprafisiológicas de esta hormona (Kim y col. 2004). En esta especie, Park y col. (2001) reportaron un incremento del 30% en la concentración sérica de E2 posterior a la administración hormonal. En la rata y la coneja los efectos observados en la vagina perineal son revertidos con la administración hormonal, siendo similares al grupo C (Pessina y col. 2006; Kim y col. 2004; Park y col. 2001; Yoon y col. 2001). Nosotros hemos observado efectos diferentes. La discrepancia entre los resultados puede deberse al segmento analizado, así como al tiempo de OVX y administración hormonal.

Una de las terapias utilizadas para el tratamiento de desordenes en el aparato urogenital como son la incontinencia urinaria, prolapsos de viseras pélvicas e infecciones urinarias recurrentes, entre otras, es la Terapia de Reemplazo Hormonal (HTR). Aunque se cree que ésta terapia es útil, no hay información precisa sobre la eficacia de su uso como tratamiento en éstos padecimientos. Debido a que la concentración sérica de E2 fue similar en el grupo C y el grupo OVX, es necesario estudiar con detalle los mecanismos que pudieran promover los cambios en la concentración de E2 durante la OVX. Se ha sugerido que factores como las

citoquinas y prostaglandinas participan en la estimulación de la síntesis de estrógenos en tejidos periféricos. Las concentraciones plasmáticas de citoquinas incrementan con el envejecimiento. Es posible que este incremento en los niveles de citoquinas se deba a que el cuerpo está tratando de corregir el déficit de estrógenos que se produce en la menopausia, incrementando así la producción de factores que pueden estimular la síntesis periférica de estrógenos (Purohit and Reed 2002). Otros mecanismos podrían ser la secreción adrenal y la aromatización extragonadal que también podría estar jugando un papel importante. En la cabra y la rata la expresión de aromatasa incrementa posterior a la OVX (Dessauge y col. 2009; Thordarson y col. 2001). En la rata se ha reportado que la administración de dihidroepiandrosterona (DHEA) posterior a la OVX tiene efectos sobre la morfología e histología de órganos reproductivos como útero y vagina. Tal efecto se debe a la transformación local de este metabolito a E2 (Sourla y col. 1998). Si bien ya son conocidos algunos de los efectos del E2 sobre la histología vaginal, es importante conocer los mecanismos por los cuales esta hormona lleva a cabo su función.

8.3 Efecto de la ovariectomía sobre los componentes histológicos del segmento pélvico del conducto vaginal

La OVX modifica características cualitativas de la vagina pélvica de la coneja doméstica. En el grupo control se identificaron las cuatro capas mucosa, submucosa, muscular y externa, las mismas que fueron descritas por Rodríguez- Antolín y col. (2009), también descritas en la mujer (Alexander y col. 2004). En conejas de 10 semanas se ha reportado una organización similar (Oh y col. 2003). De manera cualitativa observamos que en el grupo OVX el orificio de salida vaginal es más pequeño vs el grupo control. En el grupo OVX+BE este efecto al parecer es inverso. Estas modificaciones podrían estar relacionadas en el grupo con OVX con el incremento en la proporción de colágeno. Debido a que el colágeno es el encargado de dar forma y sostén podríamos sugerir que su modificación implica cambios estructurales o morfológicos en la vagina pélvica. En la rata, la OVX disminuye la longitud y el diámetro del conducto vaginal. Los efectos observados en la morfología vaginal son revertidos con la administración hormonal (Higgins y col. 2009; Moalli y col. 2008; Alison y col. 2004). Moalli y col. (2008) también reportan cambios en el tipo de colágeno debido a la OVX, esto se

acompaña con cambios en la estructura de la vagina y útero de la rata. En el grupo con administración de BE se observó una disminución en la proporción de colágeno efecto que también podría interferir con la estructura de la vagina pélvica. Los cambios en el colágeno en los grupos experimentales podrían explicar cambios en la morfología de la vagina pélvica. En nuestro modelo la OVX incrementa la vascularización en la vagina pélvica de la coneja doméstica. En contraste con lo reportado por Park y col. (2001), para la vagina perineal en donde se observa una disminución de la vascularización posterior a la OVX. La administración de BE no revierte tal efecto. La vascularización fue similar entre los grupos OVX y OVX+BE.

8.4 Efecto de la ovariectomía sobre las características histológicas de la mucosa

Los estrógenos participan en la proliferación de células epiteliales del tracto urinario inferior y la vagina (Blakemann y col. 2001; Buchanan y col. 1998). En el conducto vaginal de la coneja doméstica el segmento anterior a la desembocadura uretral presenta un epitelio cilíndrico simple. El segmento posterior a la desembocadura uretral presenta un epitelio de tipo escamoso estratificado (Rodríguez-Antolín y col. 2009). La OVX disminuye el número de estratos de células epiteliales de la vagina pélvica de la coneja doméstica (Figura 10B, D). Este efecto no permitió hacer el análisis por región. En el grupo OVX no fue posible diferenciar una y otra región. Con la administración endógena de BE se observó un mayor número de estratos celulares que en el grupo C (Figura 9, D). Esto podría deberse al tiempo de administración y la dosis empleada de BE. Nuestros resultados son similares a los encontrados en la coneja blanca de Nueva Zelanda. En esta especie, se observa apoptosis, atrofia de la mucosa y una disminución del citoplasma en las células epiteliales posteriores a la OVX. La administración de E2 en dosis farmacológicas causa hipertrofia de la mucosa (Aikawa y col. 2003). En contraste, Kim y col. (2004) reportan atrofia de la mucosa, efecto que es revertido con la administración de E2 siendo similar al grupo C (Park y col. 2001). Estos resultados son consistentes con los reportados para la rata (Pessina y col. 2006).

El epitelio protege a las superficies libres contra el daño mecánico y la entrada de microorganismos; también es importante en cuanto al sentido del tacto, puesto que contiene terminaciones nerviosas sensitivas. La actividad epitelial, particularmente la secreción

(mucosa y serosa), es modificada por la OVX. Mediante técnicas histológicas como Azul de alcian y PAS se observó que en el grupo OVX las células positivas a estas tinciones son escasas. En el grupo OVX+BE se observó un menor número de células epiteliales positivas a PAS vs el grupo C. Por el contrario para azul de alciano las células de la zona apical son las que presentaron marcaje, siendo este incluso más intenso que en el grupo C. Las observaciones obtenidas en estos métodos histológicos nos hacen inferir que el tipo de secreción en esta capa es de tipo mixta. Esto debido a que azul de alcian tiñe mucinas ácidas no sulfatadas, las cuales al contacto con el agua producen moco. La tinción de PAS es selectiva para mucopolisacáridos los cuales dan origen a la producción de glucógeno. En mujeres post menopáusicas se ha reportado que con la disminución en la concentración sérica de E2, el contenido de glucógeno de la vagina también disminuye (Smith 2010). Los cambios observados para esta capa en el grupo OVX se relacionan con menor grado de protección contra infecciones bacterianas, debido a que el epitelio es más delgado y más fácil de desgarrarse, pero también porque ha perdido su capacidad de producir glucógeno y así ayudar a mantener un pH bajo en el líquido vaginal (Pessina y col. 2006). No hemos encontrado reportes en la rata o en la coneja del tipo de secreción de las células epiteliales a lo largo del conducto vaginal. Debido a que la histología es diferente, podría pensarse que la secreción también pudiera serlo.

8.5 Efecto de la ovariectomía sobre las características histológicas de la capa intermedia

Las fluctuaciones en la concentración sérica de E2 que se producen durante la menstruación, la gestación y la menopausia modifica la histología del conducto vaginal (Lin y col. 2006). En nuestro modelo la OVX modificó el arreglo histológico de las capas submucosa y muscular por lo que no fue posible determinar su espesor de manera independiente. Se consideró una capa intermedia.

El espesor de la capa intermedia fue similar entre los grupos (Figura 13). De manera cualitativa se observó que en los grupos OVX y OVX+BE hay una mayor vascularización con respecto al grupo C, lo cual podría explicar el por qué no se observan diferencias en el espesor de esta capa. En contraste Higgins y col. (2009) reportaron en la coneja blanca de Nueva Zelanda, que la OVX incrementa el espesor de la capa muscular en la vagina perineal y lo

disminuye en la vagina abdominal. La vascularización de la submucosa de la vagina perineal también disminuye (Lin y col. 2006). En este modelo, el espesor total del conducto vaginal disminuye vs el grupo C (Higgins y col. 2009). Con la administración de E2 el grosor de la capa muscular incrementa, siendo similar al control (Aikawa y col. 2003). Es importante retomar que los componentes histológicos de cada segmento, así como su función, difieren a lo largo del conducto vaginal (Rodríguez-Antolín y col. 2009; Oh y col. 2003; Al-Hijji y col. 2000), por lo que no podríamos esperar que los cambios histológicos fueran de la misma magnitud para los tres segmentos.

La OVX induce atrofia vaginal, un incremento en la proporción de colágeno y apoptosis de los nervios, musculo liso y epitelio (Pessina y col. 2006; Park y col. 2001). En esta capa se observaron diferencias entre los grupo C, OVX y OVX+BE en la proporción de músculo liso y colágeno. La OVX no modificó la proporción de músculo liso pero si la de colágeno. El colágeno en esta capa incremento vs el grupo C. De manera cualitativa observamos que la OVX disminuye el tamaño de los paquetes de musculatura lisa e incrementa la vascularización vs el grupo C. Nuestros resultados contrastan a lo reportado en otras especies de mamíferos. En la mujer, hay atrofia y una disminución en la proporción de músculo liso posterior a la menopausia (Semmeling y col. 1990). Yoon y col. (2001) para la coneja blanca de nueva Zelanda reporta disminución en la proporción de musculatura lisa, así como un incremento en la proporción de colágeno. En otros estudios realizados en la rata y la coneja blanca de Nueva Zelanda solo se ha reportado atrofia del músculo liso vaginal y del útero posterior a la OVX. Aunque el segmento analizado así como el tiempo de ovariectomía fue diferente, estos resultados son consistentes con lo que nosotros hemos encontrado. En conjunto, los cambios histológicos observados en los diferentes modelos se relacionan con una disminución en la fuerza contráctil de la pared vaginal. Los cambios en la histología y fisiología de esta capa pudieran estar relacionados con algunas patologías del aparato urogenital (Pessina y col. 2006; Kim y col. 2004; Alison y col. 2004; Park y col. 2001).

En nuestro grupo OVX+BE los efectos de la OVX no fueron revertidos. La concentración de músculo liso y colágeno disminuyo posterior a la administración de BE. Nuestros resultados son similares a lo reportado para la rata, en la cual la administración de estrógenos no incremento la concentración de músculo liso vaginal (Alison y col. 2004). Estos

resultados sugieren que otras hormonas pudieran estar involucradas en modular las características de la capa interna. Los estrógenos, al parecer son capaces de ejercer efectos tróficos sobre algunos tejidos del aparato reproductor femenino pero no sobre otros (Pesina y col. 2006; Alison y col. 2004). En conjunto, estos resultados contrastan con lo reportado para el segmento abdominal y perineal en la coneja blanca de Nueva Zelanda. En esta especie, los grupos con administración hormonal son similares al grupo C (Higgins y col. 2009; Yoon y col. 2001; Park y col. 2001). Estas variaciones pudieran deberse al tiempo de OVX y tratamiento, así como al segmento analizado.

8.6 Efecto de la ovariectomía sobre las características histológicas de la capa externa

Los trabajos para evaluar la contribución hormonal en el conducto vaginal, se han enfocado a la vagina abdominal y perineal en la coneja blanca de Nueva Zelanda. En estos segmentos la cuarta capa está formada por tejido conectivo areolar y un prominente plexo de venoso (Rodríguez-Antolín y col. 2009). Por lo que el efecto hormonal en la musculatura estriada adosada a la pared de la vagina pélvica no ha sido estudiado.

El espesor en esta capa fue similar en los grupos C, OVX y OVX+BE. De manera cualitativa observamos que la OVX incremento la vascularización en esta capa. El diámetro de las fibras es mayor en el grupo OVX vs el grupo C (datos no reportados). El incremento en estos componentes podría ser una respuesta adaptativa a las modificaciones hormonales que resultan de la OVX. Las cuales también podrían explicar que el espesor sea similar entre los grupos. Los niveles fisiológicos de estrógenos también parecen jugar un papel importante en el mantenimiento de la estructura de la capa externa de la vagina pélvica de la coneja doméstica.

En la figura 17A, se observa un incremento en la concentración de músculo estriado en los grupos OVX y OVX+BE vs el grupo C. El número de fibras es menor en el grupo OVX+BE, pero su diámetro es mayor. En el grupo OVX no se observaron diferencias en el número de fibras vs el grupo control. El diámetro de las fibras fue mayor en el grupo OVX vs el grupo C. Este efecto puede ser el responsable de que se observe un incremento en la concentración de músculo estriado. Estos resultados contrastan con lo reportado para otros músculos estriados pélvicos y perineales involucrados en funciones reproductivas. En los que se observa atrofia de la musculatura. Estas diferencias podrían estar relacionadas con la

anatomía y función de dicha musculatura (Sitnick y col. 2005). En la coneja domestica se ha observado que la OVX disminuye el área transversal de las fibras del músculo pubococcigeo un musculo pélvico involucrado en funciones reproductivas y de micción (García-Villamar 2011), pero no tiene un efecto sobre el área transversal del músculo bulboesponjoso, el cual participa durante la cópula y el parto (Carrasco- Ruíz 2011). La concentración de colágeno para esta capa fue similar entre los grupos. El incremento en el diámetro de las fibras podría estar ocupando el espacio de fibras que se estén perdiendo, por lo que el colágeno no se ve modificado. Estos cambios nos hacen pensar que la musculatura estriada puede ser modulada de manera diferencial por los estrógenos

En ratas OVX el receptor de estradiol se regula a la alta en la vagina y este nivel elevado de expresión de receptores de estradiol se mantiene en los animales OVX infundidos con una dosis de estradiol (Kim y col. 2004). El incremento en la expresión del receptor puede ser responsable de los cambios histológicos observados.

La administración de BE no revierte algunos cambios en la morfología de los componentes histológicos posterior a la OVX. El examen histológico mostró que la administración de BE puede mediar la remodelación tisular en la vagina. El espesor de las capas para el grupo OVX+BE se ve restaurado en el caso de la mucosa mostrando una recuperación en la estratificación del epitelio (Pessina y col. 2006; Kim y col. 2004; Park y col. 2001; Yoon y col. 2001). Otros efectos se observan en la capa externa en donde la proporción de músculo estriado también aumenta con la administración de BE, no así en la capa intermedia en donde la proporción de músculo liso y colágeno disminuye.

8.7 Efecto de la ovariectomía sobre la morfología de los ganglios autonómicos paravaginales

Nuestro estudio proporciona información de que, además de participar en la remodelación del tejido vaginal, las hormonas reproductivas también regulan la inervación vaginal. No existen reportes del efecto hormonal, en particular del E2, sobre los ganglios autonómicos paravaginales localizados en el tejido conectivo dorsolateral de la vagina pélvica de la coneja. Las neuronas presentes en los ganglios paravaginales son de naturaleza mixta, contienen neuronas simpáticas y parasimpáticas (Xelhuantzi en preparación). Las neuronas provenientes

de la inervación simpática, parasimpática y las neuronas sensoriales que se proyectan hacia el aparato reproductor femenino expresan los subtipos α y β del RE. Por lo que la fluctuación de estas hormonas pudiera afectar de forma directa a la inervación vaginal, contribuyendo así a cambios en su función (Alison y col. 2004).

Los datos obtenidos para la inervación muestran que el número de neuronas es similar entre los grupos. El área del soma disminuye en el grupo OVX vs C. En contraste en conejas jóvenes múltiparas el área del soma de las neuronas es mayor respecto al grupo C, en este modelo la concentración sérica de E2 también se ve modificada en la tercera y cuarta gestación (López-García 2010; Xelhuantzi en preparación). La administración endógena de BE revierte el efecto en el área del soma de las neuronas. Debido a la naturaleza y expresión de RE de las neuronas presentes en los ganglios paravaginales, estas pudieran estar siendo moduladas por las fluctuaciones en la concentración sérica de estradiol (E2). Ting y col. (2004) reportaron que en la rata la inervación simpática y parasimpática incrementa posterior a la OVX. El aumento de la densidad en esta inervación puede conducir a la disminución del flujo sanguíneo vaginal y por lo tanto a una disminución de la lubricación vaginal. Estos cambios también se han reportado durante la menopausia y después de la OVX en mujeres y en modelos animales (Min y col. 2002; Sarrel 1998).

En la figura 19 se observa que el área de las neuronas fue similar en los grupos OVX+BE y C. La OVX disminuye el área del soma neuronal. La concentración de hormonas gonadales afecta a la inervación que recibe el conducto vaginal de diversas especies como la cerda (Kaleczyc 1994), la rata (Pessina y col. 2006; Ting y col. 2004), el ratón (Purves-Tyson y col. 2007), y la coneja (Al-Hijji y col. 2000). La sensibilidad estrogénica de las neuronas autonómicas ganglionares se ha estudiado en el GP (parasimpático) y en el superior cervical (simpático). Las neuronas del GP del cobayo modifican su volumen neuronal y el ganglionar durante el ciclo estral; la OVX los reduce y la administración exógena de estradiol los recupera (Coujard 1951). Datos que en parte son consistentes con lo observado en nuestro modelo para las neuronas presentes en los ganglios paravaginales de la coneja. En la rata macho se han observado cambios posteriores a la gonadectomía. Purves-Tyson y col. (2007) reportaron que las neuronas presentes en los ganglios pélvicos de la rata macho expresan el

RE y la enzima aromatasa, con lo que la aromatización extraganglionar de la testosterona también podría explicar los cambios morfológicos observados en nuestro modelo.

Estos cambios en la inervación autonómica se encuentran íntimamente ligados con la fisiología vaginal. El mecanismo de la excitación sexual y el orgasmo durante las relaciones sexuales implican la estimulación de reflejos medulares que son mediados por las fibras aferentes provenientes del nervio pudendo. El brazo eferente de los reflejos espinales implica actividad simpática, parasimpática, y somática (Goldstein y col. 2000).

Los ciclos reproductivos alteran la morfología de los ganglios paracervicales del cobayo (Coujard 1951). De manera preliminar se ha observado que la multiparidad incrementa el área de los ganglios autonómicos paravaginales y de los haces nerviosos (Xelhuantzi en preparación). En contraste, en nuestro modelo, la OVX disminuye el área de los ganglios autonómicos paravaginales y de los haces nerviosos. La administración de BE no revierte tal efecto.

Otros factores que podrían estar modulando los cambios morfológicos encontrados, son los factores de crecimiento que durante el desarrollo, estos factores neurotróficos participan en la sobrevivencia, localización y proyección de las neuronas pélvicas. En la etapa adulta se asocian con procesos de plasticidad. El aparato urogenital sintetiza el factor de crecimiento neuronal (NGF) y las neuronas noradrenérgicas de los ganglios pélvicos expresan receptores para este factor, como p75 y trkA (Keast 2006). La señalización de factores neurotróficos es relevante para la recuperación de lesiones que afecten la inervación simpática y parasimpática. En esta última el factor de crecimiento neuronal derivado de la glía (GDNF) es crítico para la supervivencia neuronal; las neuronas parasimpáticas expresan los receptores para este ligando (GFR α 1 y 2), por lo que las neuronas presentes en los ganglios paravaginales también pudieran ser sensibles a los cambios en la síntesis de estos componentes.

La OVX promovió cambios notables en la estructura de la vagina pélvica. Nuestros resultados sugieren que los estrógenos circulantes pueden ser de gran importancia en el mantenimiento de la estructura de la pared vaginal y su inervación.

9. CONCLUSIONES

9.1 General

En conejas, OVX y OVX+BE la organización histológica de la mucosa, musculatura (lisa y estriada), colágeno y la inervación autonómica paravaginal de la vagina pélvica se modifica.

9.2 Particulares

- El espesor y la actividad secretora de la capa mucosa son dependientes de estradiol.
- En los grupos OVX y OVX+BE se observó una mezcla de las capas submucosa y muscular (capa intermedia). En esta capa la proporción de músculo liso y colágeno fue diferente.
- El espesor de la capa externa fue similar entre los grupos. La proporción de músculo estriado fue mayor en los grupos OVX y OVX+BE, estos cambios se relacionan con un incremento en el diámetro de las fibras.
- El área del soma de las neuronas de los ganglios autonómicos paravaginales es dependiente de estrógenos. Estos cambios estructurales podrían estar relacionados con cambios en la función de sus órganos blanco.
- La concentración sérica de E2 fue similar entre los grupos C y OVX. Lo cual nos sugiere un cambio local más que sistémico.

10. PERSPECTIVAS

Los resultados que se muestran en el presente trabajo aportan información relevante sobre el efecto de los estrógenos sobre la organización histológica de la mucosa, la musculatura (lisa y externa), el colágeno y los ganglios autonómicos paravaginales en la vagina pélvica. Al mismo tiempo que esta información permite contestar algunas preguntas, también genera nuevas dudas en el conocimiento de la biología reproductiva. A continuación se presentan algunas propuestas de investigación que sugiero a partir de este trabajo.

- Establecer un mecanismo por el cual la concentración sérica de estradiol no cambia, en donde podría estar involucrada la participación de la enzima aromatasa.
- Describir otros procesos involucrados en los cambios observados en la inervación autonómica paravaginal, en donde podrían participar los factores de crecimiento neuronal y derivado de la glía de los que existe poca información (NGF y GDNF)
- Evaluar la participación de otras hormonas esteroides sobre la organización histológica la mucosa, la musculatura (lisa y externa), el colágeno y los ganglios autonómicos paravaginales de la vagina pélvica.

11. REFERENCIAS

- Aikawa K, Sujino T, Matsumoto S, Chichester P, Whitbeck C and Levin RM (2003). The effect of ovariectomy and estradiol on rabbit bladder smooth muscle contraction and morphology . J Urol **170**: 634-637.
- Al-Hijji J, Larsson B and Batra S (2000). Nitric oxide synthase in the rabbit uterus and vagina: Hormonal regulation and functional significance. Biol Reprod **62**(5): 1387-92.
- Alison Y. Ting, Audrey D. Blacklock and Peter G. Smith (2004). Estrogen regulates vaginal sensory and autonomic nerve density in the rat. Biology Reprod **71**: 1397- 1404.
- Alexander NJ, Baker E, Kaptein M, Karck U, Miller L and Zampaglione E (2004). Why consider vaginal drug administration? Fertil Steril **82**(1): 1-12.
- Alonso A, Fernandez R, Ordonez P, Moreno M, Patterson AM and Gonzalez C (2006). Regulation of estrogen receptor alpha by estradiol in pregnant and estradiol treated rats. Steroids **71**(13-14): 1052-61.
- 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
- Aughton KL, Hamilton-Smith K, Gupta J, Morton JS, Wayman CP and Jackson VM (2008). Pharmacological profiling of neuropeptides on rabbit vaginal wall and vaginal artery smooth muscle *in vitro*. British Journal of Pharmacology **155**(2): 236-243.
- Aughton MK nad Siroky M (2010). Neurologic factors in female sexual function and dysfunction. J Urol **51**(7): 443-449.
- Barberini F, De Santis F, Correr S and 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**(3): 221-7.
- Batra S, Al-Hijji J (1998). Characterization of nitric oxide synthase activity in rabbit uterus and vagina: Downregulation by estrogen. Life Sciences **62** (23): 2093-2100.
- Berman JR, Berman LA, Werbin TJ, Flaherty EE, Leahy NM and Goldstein I (1999). Clinical evaluation of female sexual dysfunction: effects of age and estrogen status on subjective and physiologic sexual responses. Int J Impot Res **11**(1): 31-38.

- Biljana M, Tongyun L, Gwen AL, Trinity JB, Travis DS, Arthur LB (2009). Endotelial Nitric Oxide Synthase Regulation in Female Genital Tract Structures. *J Sex Med* **1**(6): 247-253.
- Blakeman PJ, Hilton P and Bulmer JN (2001). Cellular proliferation in the female lower urinary tract with reference to oestrogen status. *J Obst & Gyn* **108**: 813-816.
- Bravo IR (2005). Histología de la vagina perineal en conejas domésticas jóvenes nulíparas y multíparas. Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Tlaxcala, Universidad Autónoma de Tlaxcala. Maestría en Ciencias Biológicas.
- Bridges RS and Byrnes EM (2006). Reproductive experience reduces circulating 17beta-estradiol and prolactin levels during proestrus and alters estrogen sensitivity in female rats. *Endocrinology* **147**(5): 2575-82.
- Buchanan DL, Takeshi K, Taylor JA, Lubahn DB, Cunha GR and Cooke PS (1998). Role of stromal and epithelial estrogen receptors in vaginal epithelial proliferation, stratification and cornification. *Endo* **139**(10): 4345-4352.
- Castelán F, Xelhuantzi N, Cuevas E, Rodríguez-Antolín J and Martínez-Gómez M. Multiple deliveries affects the histological organization of paravaginal autonomic ganglia in rabbits. 2008 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2008. Online
- Carrasco Ruíz MA (2011). Contribución de los estrógenos en el musculo estriado bulboesponjoso de la coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*). Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Tlaxcala, Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Corona-Quintanilla DL, Castelán F, Fajardo V, Manzo J and Martínez-Gómez M (2009). Temporal coordination of pelvic and perineal striated muscle activity during micturition in female rabbits. *J Urol* **181**(3): 1452-8.
- Cruz Y, Hudson R, Pacheco P, Lucio RA and Martínez-Gómez M (2002). Anatomical and Physiological characteristics of perineal muscles in the female rabbit.
- Coujard R (1951). Some considerations on the uterovaginal autonomic nervous system. *Gynecol Obstet (Paris)* **50**:270-96.
- Dessauge F, Finot L, Wiart S, Aubry JM and Ellis SE (2009). Effects of ovariectomy in prepubertal goats. *J Physiol Pharmacol* **3**:127-33. Dessauge F, Finot L, Wiart S, Aubry

- JM and Ellis SE (2009). Effects of ovariectomy in prepubertal goats. *J Physiol Pharmacol* **3**:127-33.
- Erskine MS, Lehmann ML, Cameron NM and Polston EK (2004). Co-regulation of female sexual behavior and pregnancy induction: An exploratory synthesis. *Behav Brain Res.* **153**:295-15.
- Fajardo V, Pacheco P, Hudson R, Jiménez I and Martínez-Gómez M (2008). Differences in morphology and contractility of the bulbospongiosus and pubococcygeus muscles in nulliparous and multiparous rabbits. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* **19**(6): 843-9.
- Fu X, Rezapour M, Wu X, Li L, Sjogren C and Ulmsten U (2003). Expression of estrogen receptor- α and $-\beta$ in anterior vaginal walls of genuine stress incontinent women. *Int Urogynecol* **14**: 276-281.
- García-Villamar V (2011). Contribución de los estrógenos en el musculo estriado pubococcigeo de la coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*). Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Tlaxcala, Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Giraldi A, Persson K, Alm P, Werkstrom V, Myllymaki L, Wagner G and Andersson KE (2001). Effects of diabetes on neurotransmission in rat vaginal smooth muscle. *Int J Impot Res* **13**: 58-66.
- Giraldi A, Alm P, Werkstrom 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**(4): 271-82.
- Giuliano F, Rampin O, Allard J (2002). Neurophysiology and Pharmacology of female genital sexual response. *J sex* **28**:102-121.
- Hextall A (2000). Oestrogens and lower urinary tract function. *Maturitas* **36**(2): 83-92.
- Higgins EW, Rao A, Baumann SS, James RL, Kuehl JT, Muir TW and Pierce LM (2009). Effect of estrogen replacement on the histologic response to polypropylene mesh implanted in the rabbit vagina model. *J Obst & Gyn* 505.e1-505.e8.
- Houdeau E, Prud'homme MJ, Rousseau A and Rousseau JP (1995). Distribution of noradrenergic neurons in the female rat pelvic plexus and involvement in the genital tract innervation. *J Auton Nerv Syst* **54**(2): 113-25.

- Imai K, Furuya K, Kawada M, Kinugasa Y, Omote K, Namiki A, Uchiyama E and Murakami G (2006). Human pelvic extramural ganglion cells: a semiquantitative and immunohistochemical study. *Surg Radiol Anat* 28: 596-605.
- Jelinsky SA, Sung EC, Crabtree JS, Cotreau MM, Wilson E, Saraf K, Dorner AJ, Brown EL, Peano BJ, Zhang X, Winneker RC and Harris HA (2008). Molecular analysis of the vagina response to estrogens in the ovariectomized rat and postmenopausal woman. *BMC Medical Genomics* 1(27): 1-12.
- Jobling P and Lim R (2008). Anatomical and physiological properties of pelvic ganglion neurons in female mice. *Auton Neurosci* 140:30-9.
- Kaleczyc J (1994). Effect of estradiol and progesterone on noradrenaline content in nerves of the oviduct, uterus and vagina in ovariectomized pigs. *Folia Histochem Cytobiol* 32(2): 119-26.
- Kanagasuntheram R and Verzin JA (1964). The intrinsic nerve supply of the female reproductive organs in the lesser bush baby (*galago senegalensis senegalensis*). *Acta Anat (Basel)* 58: 306-16.
- Keast JR (2006). Plasticity of pelvic autonomic ganglia and urogenital innervation. *Int Rev Cytol* 248: 141-208.
- Kim NN, Min K, Huang Y, Goldstein Y and Traish AM (2002). Biochemical and functional characterization of alpha-adrenergic receptors in the rabbit vagina. *Life Sciences* 71: 2909-2920.
- Kim NN, Min K, Pessina MA, Munarriz M, Goldstein Y and Traish AM (2004). Effects of ovariectomy and steroid hormones on vaginal smooth muscle contractility. *Int J Impot Res* 16: 43-50.
- Levin RJ (2002). The physiology of sexual arousal in the human females: a recreational and procreational synthesis. *Arch Sex Behav* 31: 405-11.
- López-García K (2010). Parámetros estrogénicos asociados con la multiparidad en la coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*): Concentración sérica de estradiol y expresión del receptor de estrógenos en los músculos bulboesponjoso y pubococcígeo. Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Tlaxcala, Universidad Autónoma de Tlaxcala. Maestría en Ciencias Biológicas.

- Maggi M, Genazzani AD, Giannini S, Torrisi C, Baldi E, di Tomaso M, Munson PJ, Rodbard D and Serio M (1988). Vasopressin and oxytocin receptors in vagina, myometrium, and oviduct of rabbits. *Endocrinology* **122**(6): 2970-80.
- Makela S, Strauss L, Kuiper G, Valve E, Salmi S, Santti R, and Gustafsson JA (2000). Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in adult rat accessory sex glands and lower urinary tract. *Mol Cell Endocrinol* **170**: 219-29.
- Mani S (2003). Emerging concepts in the regulation of female sexual behavior. *Scand J Psychol* **44**: 231-9.
- Martínez-Gómez M, Lucio RA, Carro M, Pacheco P and Hudson R (1997). Striated muscles and scent glands associated with the vaginal tract of the rabbit. *Anat Rec* **247**(4): 486-95.
- Martínez-Gómez M, Mendoza G, Corona-Quintanilla DL, Fajardo V, Nicolas L and Castelán F (en preparación). Multiparity-induced urodynamic dysfunction through an uncoordinated activity of pelvic and perineal striated-muscle in rabbits.
- Matt DW, Lee J, Sarver PL, Judd HL and Lu JK (1986). Chronological changes in fertility, fecundity and steroid hormone secretion during consecutive pregnancies in aging rats. *Biol Reprod* **34**(3): 478-87.
- Min K, Munarriz R, Kim NN, Goldstein I and Traish A (2002). Effects ovariectomy and estrogen and androgen treatment on sildenafil-mediated changes in female genital blood flow and vagina lubrication in the animal model. *Am J Obstet Gynecol* **187**: 1370-1376.
- Moalli PA, Debes KM, Meyn LA, Howden N and Abramowitch SD (2008). Hormones Restore Biochemical Properties of the vagina and supportive tissues after surgical menopause in young rats. **199**(2): 161.e1-161.e8.
- Oh SJ, Hong SK, Kim SW and Paick JS (2003). Histological and functional aspects of different regions of the rabbit vagina. *Int J Impot Res* **15**(2): 142-50.
- Owman C and Sjoberg NO (1966). Adrenergic nerves in the female genital tract of the rabbit. With remarks on cholinesterase-containing structures. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **74**(2): 182-97.

- Papka RE and Mowa CN (2003). Estrogen receptors in the spinal cord, sensory ganglia, and pelvic autonomic ganglia. *Int Rev Cytol* **231**: 91-127.
- Parakkal PF and Gregoire AT (1972). Differentiation of vagina epithelium in the normal and hormone treated rhesus monkey. *Biology of reproduction* 6: 117-130.
- Park K, Ahn K, Lee S, Ryu S, Park Y and Azadzoi KM (2001). Decreased circulating levels of estrogen alter vaginal and clitoral blood flow and structure in the rabbit. *Int J Impot Res* **13**: 116-124.
- Pessina MA, Hoyt RF, Jr., Goldstein I and Traish AM (2006). Differential regulation of the expression of estrogen, progesterone, and androgen receptors by sex steroid hormones in the vagina: Immunohistochemical studies. *J Sex Med* **3**(5): 804-14.
- Peters LC, Kristal MB and Komisaruk BR (1986). Sensory innervations of the external and internal genitalia of the female rat. *Brain Res* **408**: 199-204.
- Poonia B, Walter L, Dufour J, Harrison R, Marx PA and Veazey RS (2006). Cyclic changes in the vaginal epithelium of normal rhesus macaques. *J Endo* **190**: 829-835.
- Purohit A and Reed MJ (2002). Regulation of estrogen synthesis in postmenopausal women. *Steroids* **67**: 979-983.
- 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.
- Rehm S, Dinesh J, Stanislaus and Williams AM (2007). Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth Defects research (part B)* 80: 233-245.
- Robinson D and Cardozo L (2003). Urogenital effects of hormone therapy. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **17**(1): 91-104.
- Rodríguez-Antolín J, Xelhuantzi N, García-Lorenzana M, Cuevas E, Hudson R and 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**(1): 53-60.
- Sanoja R and Cervero F (2008). Estrogen modulation of ovariectomy-induced hyperalgesia in adult mice. *J Pain* **12**: 573-581.

- Sarrel PM (1998). Ovarian hormones and vaginal blood flow: using laser Doppler velocimetry to measure effects in a clinical trial of postmenopausal women. *Int J Impot Res* **20**(1): 53-60.
- Semmelink HJ, Wilde PC, Houwelingen JC and Vooijs GP (1990). Histomorphometric study of the lower urogenital tract in pre- and postmenopausal women. *Cytometry* **11**: 700-707.
- Shinoda M, Latour MG and Lavoie JM (2002). Effects of physical on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *Int J Ob* **26**: 335-343.
- Smith PG and Bradshaw S (2004). Innervation of the proximal urethra of ovariectomized and estrogen- treated female rats. *Histol Histopathol* **19**: 1109-1116.
- Smith AL (2010). Estrogen replacement therapy for the treatment of postmenopausal genitourinary tract dysfunction. *Discov Med* **10** (55): 500-10.
- Sourla A, Flamand M, Belanger A and Labrie F (1998). Effect of dehydroepiandrosterone on vaginal and uterine histomorphology in the rat. *Steroid Biochem Molec Biol* **66**(3): 137-149.
- Thordarson G, Lee AV, McCarty M, Horn VK, Chu O, Chou YC, Yang J, Guzman RC, Nandi S and Talamantes F (2001). Growth and characterization of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumors in intact and ovariectomized rats. *Carcinogen* **22** (12): 2039-2047.
- Ting AY, Blacklock AD and Smith PG (2004). Estrogen regulates vaginal sensory and autonomic nerve density in the rat. *Biol Reprod* **71**:1397-404.
- Wagner G and Levin R (1978). Vaginal fluid. *The human vagina*. Biomedical Press 121-137.
- Xelhuantzi N (2005). Estudio histológico de la uretra distal y vagina pélvica en conejas domésticas jóvenes nulíparas y multíparas. Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Tlaxcala, Universidad Autónoma de Tlaxcala. Maestría en Ciencias Biológicas.
- Xelhuantzi N, Rodríguez-Antolín J, Cuevas E, Nicolás L, Bravo I and Martínez-Gómez M (en preparación). Multiple labor effects on the lower urethral and vaginal walls in the domestic rabbit.

- Yoon HN, Chung WS, Park YY, Shim BS, Han WS and Kwon SW (2001). Effects of estrogen on nitric oxide synthase and histological composition in the rabbit clitoris and vagina. *Int J Import Res* **13**: 205-211.
- Zoubina EV, Mize AL, Alper RH, and Smith PG Shim BS (2001). Acute and chronic estrogen supplementation decreases uterine sympathetic innervations 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 innervations. *J Neurobiol* **52**: 14-23.
- Zoubina EV and Smith PG (2003). Expression of estrogen receptor alpha and beta by sympathetic ganglion neurons projecting to the proximal urethra of female rats. *J Urol* **169**: 382-5.