



# Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto de la gestación y la primiparidad sobre la organización  
histológica de la vagina pélvica de la coneja

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Laura Guadalupe Hernández Aragón

Director de Tesis

Dr. Francisco Castelán

Miembros del comité tutorial

Dra. Margarita Martínez Gómez

Dr. Pablo Pacheco Cabrera

Dr. Mario García Lorenzana

Dr. Jorge Rodríguez Antolín

Tlaxcala, Tlax.

Dic. 2012.





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



**COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
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 **Laura Guadalupe Hernández Aragón** 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 "Efecto de la gestación y la primiparidad sobre la organización histológica de la vagina pélvica de la coneja".

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., JULIO 23 DE 2012

  
DR. PABLO PACHECO CABRERA

  
DR. MARIO GARCÍA LORENZANA

  
DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO

  
DR. FRANCISCO CASTELÁN

  
DRA. MARGARITA MARTÍNEZ GÓMEZ

  
DR. JORGE RODRÍGUEZ ANTOLÍN



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



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

Esta tesis se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biología Celular del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala bajo la dirección del Dr. Francisco Castelán. El comité tutorial enriqueció la discusión de este trabajo y estuvo integrado por la Dra. Margarita Martínez Gómez, el Dr. Pablo Pacheco Cabrera, el Dr. Jorge Rodríguez Antolín y el Dr. Mario García Lorenzana. La asistencia técnica brindada por la Q.F.B. Laura García fue fundamental para la realización de esta tesis.

Se realizó una estancia de movilidad estudiantil auspiciada por el programa ECOES en el Laboratorio 23 del Departamento de Genética y Biología Molecular en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Arturo Ortega Soto.

Este proyecto fue financiado por los programas PROMEP-SEP (UATLX-PTC-109 a FC), PAPIIT-UNAM (228110 a MMG) y por el CONACyT a través de una beca de estudios de maestría (Registro 248110 a LGHA).

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Campus Rectoría.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad Periférica Tlaxcala.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. En especial, al Laboratorio 23 del Departamento de Genética y Biología Molecular.

A los programas de investigación que financiaron este proyecto: *PROMEPEP-SEP (UATLX-PTC-109)*, *PAPIIT-UNAM (228110)*, *CONACyT (248110)* y *ECOES (Estancia de movilidad estudiantil)*.

A mi director de tesis, Dr. Francisco Castelán, jefe del laboratorio de Biología celular en el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, maestro y guía.

A mi comité tutorial: Dra. Margarita Martínez Gómez, Dr. Pablo Pacheco Cabrera, Dr. Jorge Rodríguez Antolín, Dr. Mario García Lorenzana. Por su amable aceptación para revisar el desarrollo y culminación de este proyecto. Sus acertadas aportaciones y comentarios enriquecieron notablemente este trabajo

Al Dr. Arturo Ortega Soto, por su invaluable enseñanza durante mi estancia de investigación en CINVESTAV-IPN.

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, quienes a pesar de las circunstancias siempre me apoyen y me demuestran su cariño. Mis hermanas Blanca, Maricela y Azucena. Mis cuñados, Gregorio y Luis Ricardo, así como, a mis hermosos sobrinos Luis Fernando y Gerardo.

Un agradecimiento muy especial a mis amigos y compañeros del laboratorio de Biología Celular del CTBC, Nicté Xelhuantzi, Kenia López, Verónica García, Ángeles Carrasco, Eréndira Ramírez y Octavio Sánchez, quienes participaron directa e indirectamente en el desarrollo de este proyecto. Con quienes, más allá de las técnicas, he aprendido el valor del trabajo en equipo.

A mis amigos de CINVESTAV-IPN, Diana Ramírez, Orquídea Méndez, Lucía García, Casandra Chaires, Orlando Vargas, Gerardo Gil, Marc Guillan Carlos Martínez y Marco Flores, quienes me enseñaron que hay más de una forma de hacer las cosas y todas son correctas.

Finalmente, pero no menos importante a todos mis amigos que me acompañaron y apoyaron durante el desarrollo de este proyecto. Luis A. Pérez, Cristian Cruz, Verónica Maraño, Francisco J. Cruz, Patricia Aguilar, Fabián I. Hernández, Ilse A. Balcázar, Pascale Foreau, Lizbeth B. Mendieta, Ana C. Lemus, Maribel Huerta y Ulises D. Jiménez. Es una bendición contar con su amistad, a pesar de la distancia y el tiempo, sé que siempre puedo confiar en ustedes.

*"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad"*

*- Albert Einstein*

*Dedicó esta tesis a mis padres, Ascención y Josefina, quienes sin saber me han enseñado todo, lo bueno, lo malo, lo feo y lo hermoso.*

**Porque, sí las cosas hubieran sido de otra manera,  
el día de hoy no seríamos quienes somos.**

*“Yo creo bastante en la suerte. Y he constatado que, cuanto más duro trabajo, más suerte tengo”*

*Thomas Jefferson*

# ÍNDICE

Resumen .....	6
<b>1. Introducción .....</b>	<b>7</b>
1.1. <i>Fisiología vaginal</i> .....	7
1.2. <i>La coneja como modelo de estudio, descripción histológica y anatómica de la vagina</i> .....	8
1.3. <i>Estructura y función de la inervación vaginal</i> .....	9
<b>2. Antecedentes .....</b>	<b>12</b>
2.1. <i>Mantenimiento de la gestación</i> .....	12
2.2. <i>Impacto de la gestación sobre la inervación vaginal</i> .....	14
2.3. <i>Modulación endocrina del tejido vaginal</i> .....	15
2.5. <i>El parto y modelos de distensión vaginal</i> .....	16
2.6. <i>El modelo de multiparidad en la coneja</i> .....	18
<b>3. Justificación .....</b>	<b>20</b>
<b>4. Hipótesis.....</b>	<b>21</b>
<b>5. Objetivos .....</b>	<b>22</b>
5.1. <i>Objetivo general</i> .....	22
5.2. <i>Objetivos particulares</i> .....	22
<b>6. Metodología .....</b>	<b>23</b>
6.1. <i>Animales</i> .....	23
6.2. <i>Disección</i> .....	23
6.3. <i>Histología</i> .....	23
6.4. <i>Inmunohistoquímica</i> .....	24
6.5. <i>Análisis histológico en la tinción tricrómica de Masson</i> .....	25
6.6. <i>Cuantificación la proporción de musculatura lisa y musculatura estriada</i> .....	25
6.7. <i>Cuantificar la proporción de fibras de colágeno</i> .....	26
6.8. <i>Determinación del espesor de las capas de la pared vaginal</i> .....	26
6.9. <i>Determinación de la morfología y composición de la los ganglios paravaginales</i> .....	26
6.9.1. <i>Parámetros morfométricos</i> .....	26
6.9.2. <i>Comunicación química</i> .....	27
6.10. <i>Análisis estadístico</i> .....	27
<b>7. Resultados .....</b>	<b>28</b>
7.1. <i>Peso de la coneja y las crías</i> .....	28
7.2. <i>Descripción histológica de la pared de la vagina pélvica</i> .....	28
7.3. <i>Espesor de la capa mucosa en la pared vaginal</i> .....	31
7.4. <i>Evaluación de la capa interna en la pared vaginal</i> .....	32
7.4.1. <i>Espesor de la capa intermedia de la pared vaginal</i> .....	32



7.4.2. <i>Proporción de músculo liso y colágeno en la capa intermedia</i> .....	33
7.4.3. <i>Características histológicas de la musculatura lisa y colágeno en la capa intermedia</i> .....	34
<b>7.5. <u>Evaluación de la capa externa en la pared vaginal</u></b> .....	<b>37</b>
7.5.1 <i>Espesor de la capa externa de la pared vaginal</i> .....	37
7.5.2 <i>Proporción de músculo estriado y colágeno en la capa externa</i> .....	39
7.5.3. <i>Características histológicas de la capa de musculatura estriada en la capa externa</i> .....	40
<b>7.6 <u>Descripción histológica de los ganglios paravaginales en región pélvica de la coneja</u></b> .....	<b>43</b>
7.6.1 <i>Área ganglionar</i> .....	43
7.6.2 <i>Descripción histológica de las neuronas en los ganglios paravaginales</i> .....	46
<b>7.7. <u>Neuroquímica ganglionar</u></b> .....	<b>48</b>
7.7.1. <i><math>\beta</math>-tubulina III</i> .....	48
7.7.2. <i>Acetilcolintransferasa</i> .....	48
7.7.3. <i>Tirosina hidroxilasa</i> .....	49
<b>7.8. <u>Receptor de estrógenos <math>\alpha</math> y <math>\beta</math></u></b> .....	<b>49</b>
<b>8. <u>Discusión</u></b> .....	<b>51</b>
8.1. <i>Características histológicas de la pared vaginal en la región pélvica</i> .....	51
8.2. <i>Espesor de la capa mucosa en la pared vaginal</i> .....	51
8.3. <i>Proporción y características histológicas del músculo liso y colágeno capa interna en la pared vaginal</i> .....	53
8.4. <i>Proporción y características histológicas del músculo estriado y colágeno capa externa en la pared vaginal</i> .....	54
8.5. <i>Descripción histológica y comunicación química de los ganglios, nervios y neuronas en el tejido paravaginal en región pélvica de la coneja</i> .....	55
8.6. <i>Expresión de receptores de estrógenos alfa y beta en neuronas ganglionares en el tejido paravaginal</i> .....	57
8.7. <i>Implicaciones de la inervación y la función epitelial y muscular en la vagina</i> .....	58
<b>9. <u>Conclusiones</u></b> .....	<b>60</b>
<b>10. <u>Perspectivas</u></b> .....	<b>61</b>
<b>11. <u>Referencias</u></b> .....	<b>62</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>69</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>70</b>
<b>Publicaciones</b> .....	<b>71</b>

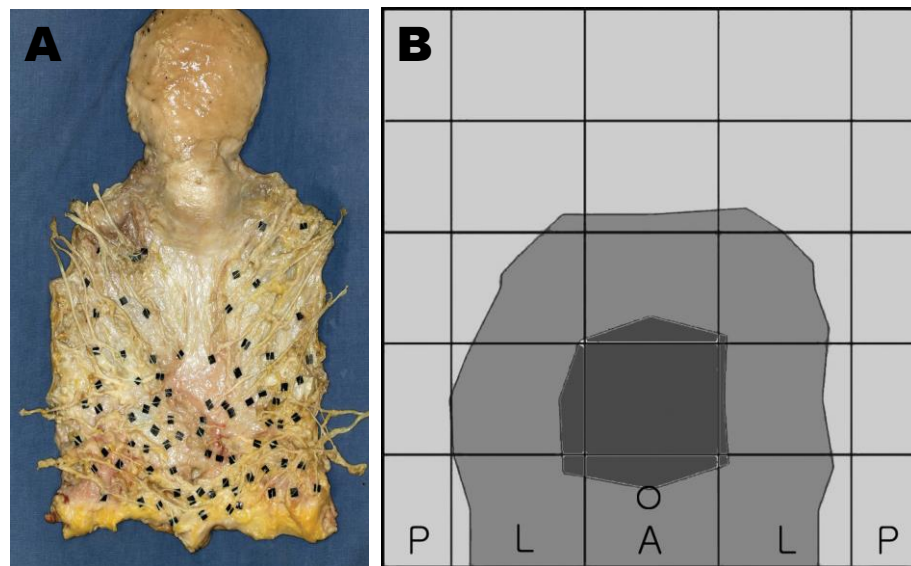
## Resumen

En mamíferos, la vagina es controlada por las fibras nerviosas autonómicas y somáticas. Esta inervación coordina la fisiología vaginal durante la respuesta sexual mediante los componentes tisulares en el tracto urogenital. Tanto la inervación como los componentes del tracto urogenital son afectados por la gestación, el parto y la multiparidad. En rata, la gestación y el parto promueven la disminución de fascículos nerviosos intramurales en la vagina y uretra, respectivamente. Por otra parte, se han reportado modificaciones histológicas y funcionales en la vagina, por efecto hormonal (ovariectomía) y mecánico (distensión vaginal). En el modelo de multiparidad en coneja, se ha descrito cambios en la morfología de la pared vaginal y en los ganglios paravaginales. Desafortunadamente, la complejidad que engloba la multiparidad dificulta evidenciar el efecto de los cambios hormonales durante las gestaciones y el efecto de la distensión vaginal debida al parto. Por lo que, el objetivo de este trabajo es analizar el efecto del historial reproductivo de la coneja, desde el final de la gestación y hasta el día 20 posparto, sobre la organización neural e histológica de la pared vaginal pélvica. Los resultados indican que la gestación y el parto no afectan el espesor de las capas de la pared vaginal, ni la proporción de músculo liso y estriado con respecto al colágeno en la capa interna y externa de la pared vaginal. Sin embargo, se observan modificaciones en la distribución de la musculatura lisa y de colágeno. Por otra parte, la cuantificación de estructuras de tipo neuronal, haces nerviosos y ganglionares por campo, son similares en cada grupo con respecto al grupo virgen. La gestación y el parto disminuyen el área transversal de los ganglios paravaginales y el área del soma de las neuronas, sin embargo, 20 días después del parto se recupera ambos parámetros. De manera cualitativa se observa que la gestación disminuye la inmunorreactividad de receptores de estrógenos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y tirosina hidroxilasa en las neuronas de los ganglios paravaginales, este efecto se restablece después del parto. Estos resultados sugieren la coordinación neuro-hormonal para controlar la fisiología vaginal que antecede al parto. Además, las modificaciones en la inervación paravaginal en la región pélvica observadas en la gestación y el parto se restablecen en un periodo posparto tardío. Se sugiere que las modificaciones observadas en el modelo de multiparidad se deben al número consecutivo de eventos reproductivos.

## 1. Introducción

### 1.1. Fisiología vaginal

La vagina es un órgano tubular localizado en la cavidad pélvica y conecta a los órganos genitales internos con los externos. Está implicada durante la excreción de fluidos vaginales, funciona como receptáculo de espermatozoides durante la cópula y como canal de expulsión del feto durante el parto. En mujeres, la porción distal (~9.2 mm) de la vagina es dos veces más gruesa que la porción proximal (~4.5 mm). Así mismo, el espesor de la capa mucosa (~3.6 mm) y muscular (~5.6 mm) tiene un espesor dos veces mayor que en la región distal (Song y cols. 2009). En la pared anterior de esta última región es donde se presenta un plexo nervioso conspicuo (Figura 1). En la mujer, la fisiología de la vagina es influenciada por varios factores, incluyendo la edad, el estatus hormonal (ciclo reproductivo), cambios en el pH (semen, infecciones, menstruación) y el control neural. Éste último ejerce un efecto sobre la relajación de músculo liso vascular y vaginal, para producir un aumento en el flujo sanguíneo y una filtración de fluidos hacia el lumen, respectivamente (Aughton y cols. 2008, c y Levin 1978). En este sentido, cualquier alteración que ocurra en la inervación del conducto vaginal podría provocar trastornos reproductivos (Maggi y cols. 1988).



**Figura 1.** Inervación vaginal en mujeres. A) Lumen vaginal. Los cuadros muestran la localización de nervios. B) Análisis de la densidad de haces nerviosos en la pared vaginal. Las zonas más oscuras muestran mayor presencia de nervios. A, pared anterior. L, pared lateral. P, pared posterior. O, orificio uretral (Song y cols. 2009).

### *1.2. La coneja como modelo de estudio, descripción histológica y anatómica de la vagina*

En la mayoría de las especies (por ej. hiena, gata, vaca, perra y coneja) un solo conducto cumple con funciones de uretra y vagina. En la coneja, la vagina es un tejido tubular localizado en el área pélvica, 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. De acuerdo con su posición en la cavidad pélvica, el tracto vaginal se divide en tres segmentos denominados abdominal, pélvico y perineal (Martínez-Gómez y col. 1997). El segmento abdominal es la porción cercana a la vejiga y al cérvix. El segmento pélvico es la porción situada dentro de la cavidad pélvica, se encuentra rodeada por el plexo venoso y en cuyo lumen desemboca la uretra. Este segmento también está rodeado por las glándulas de marcaje vestibulares. El segmento de la vagina que protruye caudalmente de la cavidad pélvica se denomina vagina perineal. Esta última división es análoga a la de otros estudios que han regionalizado al tracto vaginal de la coneja en tres porciones: anterior, medio y posterior (Oh y cols. 2003, Giraldi y cols. 2002, Al-Hijji y cols. 2000).

La organización histológica del conducto vaginal en la coneja consta de cuatro capas distintas (Rodríguez-Antolín y cols. 2009, Alexander y cols. 2004). El epitelio escamoso estratificado forma la capa superficial. A continuación se encuentra la lámina propia, compuesta de colágeno y elastina, que contiene un rico aporte de canales vasculares y linfáticos (Figura 2). La tercera es la capa muscular o capa interna, que contiene fibras de músculo liso orientadas en dirección circular y longitudinal. La última capa, llamada capa externa, consiste de tejido conectivo areolar y un gran plexo de vasos sanguíneos (Oh y col. 2003, Rodríguez-Antolín y cols. 2009, Xelhuantzi, en preparación).

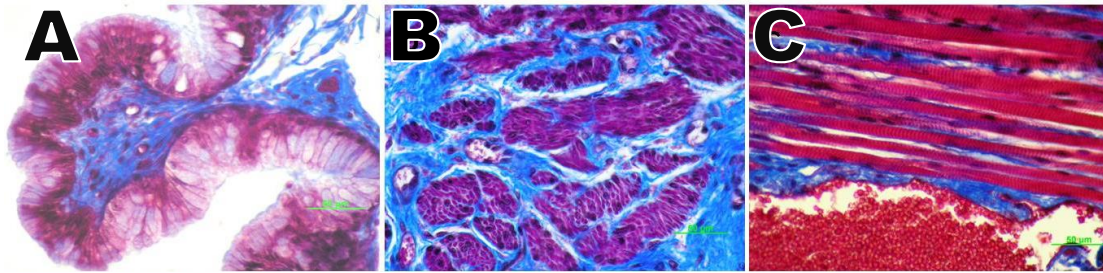


Figura 2. Pared vaginal de la coneja. A) Epitelio cilíndrico en la capa mucosa. B) Paquetes de músculo liso en la pared intermedia. C) Vasos sanguíneos y fibras de músculo estriado en la capa externa. Barra 50  $\mu$ m (Xelhuantzi, en preparación).

### *1.3. Estructura y función de la inervación vaginal*

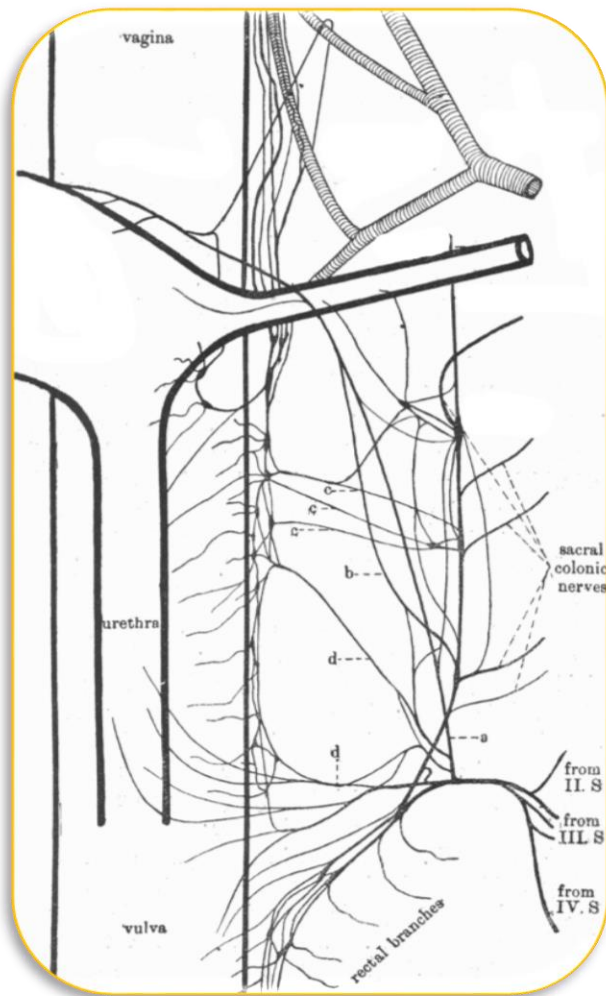
En los mamíferos, la vagina es controlada por las fibras nerviosas parasimpáticas, simpáticas, y sensoriales. Las fibras sensoriales están presentes en tejido conectivo y la dermis (Ghatei y cols. 1985, Giraldi y cols. 2002). Mientras que las fibras autonómicas simpáticas y parasimpáticas, inervan músculo liso de la pared vaginal y de los vasos sanguíneos (Giraldi y cols. 2002). Los ganglios simpáticos poseen gran variedad de receptores y neurotransmisores específicos, como catecolaminas y óxido nítrico. Estos últimos y otros neurotransmisores son considerados como mediadores del eje neuroendocrino (Brann y cols. 1997). A través de la inervación de axones simpáticos, provenientes de la cadena ganglionar simpática principal y de los ganglios mesentéricos superior y suprarrenal (Keast 2006).

En la vagina de la coneja, como en la mayoría de las hembras de mamíferos incluyendo la mujer, el plexo pélvico está formado por diferentes ramificaciones derivadas de los ganglios de las últimas lumbares (Figura 3), sacras y a través del nervio hipogástrico (Langley y Anderson 1896, Giraldi y cols. 2002, Ting y cols. 2004). La inervación autonómica vaginal se complementa con la proveniente de ganglios autonómicos adosados a la pared vaginal como los paracervicales (Houdeau y cols. 1995) y los paravaginales (Kanagasuntheram y Verzin 1964, Owman y Sjoberg 1966, Houdeau y cols. 1995, Giraldi y cols. 2002, Castelán y cols. 2008).

Varios reportes sobre la inervación pélvica en diferentes especies establecen que, además de los neurotransmisores autonómicos clásicos, ACh y NA, existen otros neurotransmisores y neuromoduladores (no-adrenérgicos, ni colinérgicos), liberándose en el tejido vaginal y paravaginal. Entre éstos puede mencionarse el VIP (péptido intestinal vasoactivo), el NPY

(neuropéptido Y), el NO (óxido nítrico) y la sustancia P, entre otros (Mitchell y Satauber 1990, Al-Hijji y cols. 2000, Giraldi y cols. 2002; Jöbling 2011).

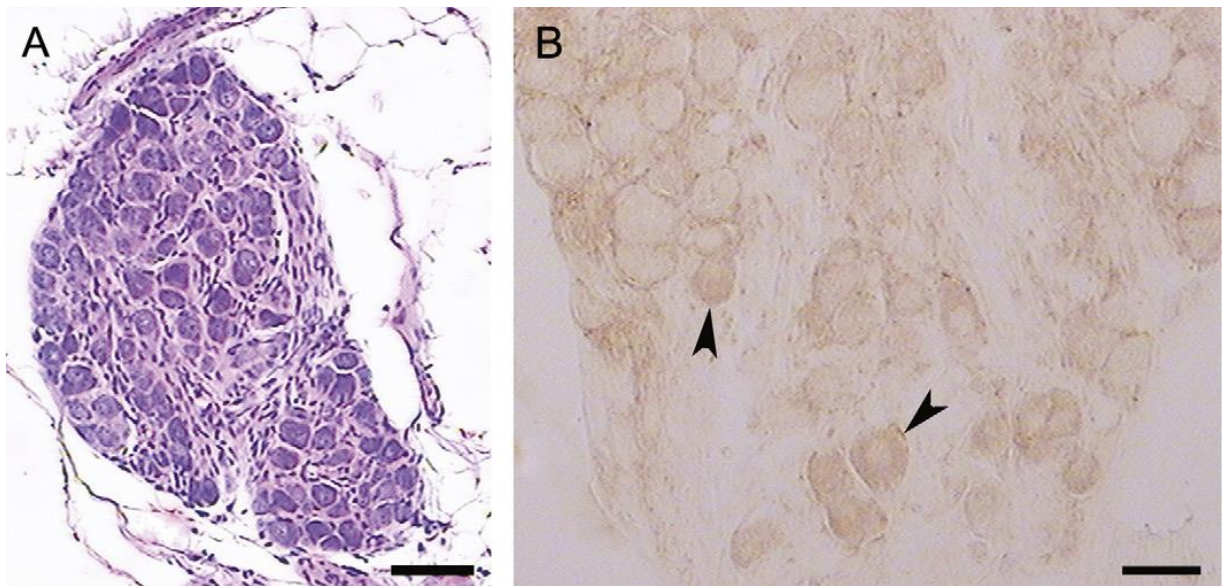
En la vagina de la rata, el músculo liso está ricamente embebido por axones simpáticos noradrenérgicos (inmunorreactivos a TH), predominantemente derivados de los ganglios de las últimas lumbares, las sacras y del nervio hipogástrico (Giraldi y cols. 2002, Ting y cols. 2004). Además, se ha descrito que los axones sensoriales que inervan a la vagina se originan a partir de los ganglios de la raíz dorsal lumbar y del nervio hipogástrico. Evidenciado mediante el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP), el cual se ha reportado que inerva la musculatura vaginal mediante la relajación (Ziessen y col 2002).



**Figura 3.** Esquema del plexo pélvico en conejo, a) rama vesical, b) hebra vesical, c) nervio pélvico, d) filamentos del nervio pélvico. S, proveniente de la raíz dorsal de las vértebras sacras, L, proveniente de la raíz dorsal de las vértebras lumbares (Langley y Anderson 1896).



En la hembra del cobayo se ha descrito que el ganglio paracervical está constituido de diferentes grupos de estructuras ganglionares con diversos tamaños, los cuales se encuentran a diferentes intervalos dentro del tejido paracervical y paravaginal alineados paralelamente desde el útero hasta la región superior de la vagina. Estos grupos de ganglios no están dispuestos simétricamente y varía la disposición entre individuos (Mitchell y Satauber 1990). El estudio histológico del ganglio paracervical en cobayo, muestra una delgada cápsula de tejido conectivo y en el parénquima se exhiben varios somas neuronales con un citoplasma basófilo, un núcleo con cromatina laxa y presentan uno o dos nucléolos, estas observaciones son similares a las reportadas en el ganglio celiaco en rata (Vallcaneras y cols. 2009), estas neuronas además presentan inmunorreactividad a los receptores de andrógenos en esta especie (Figura 4).



**Figura 4.** Micrografía del ganglio celiaco en rata macho. A) Tinción de Hematoxilina-eosina. Barra=100  $\mu\text{m}$ . B) Inmunihistoquímica contra anti-receptores de andrógenos. Barra= 50  $\mu\text{m}$  (cabezas de flecha muestran soma neuronal (Vallcaneras y cols. 2009).

## 2. Antecedentes

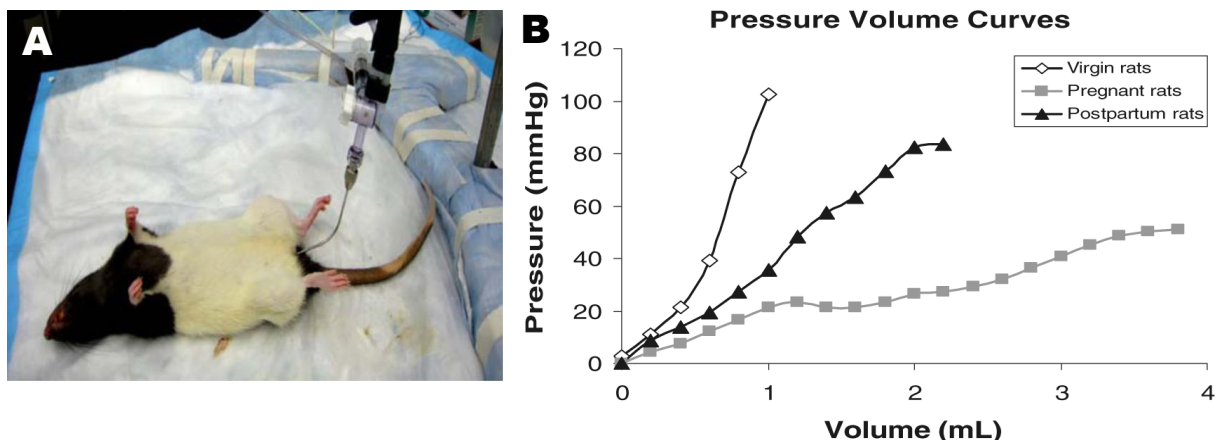
### 2.1. *Mantenimiento de la gestación*

En la mayoría de mamíferos el cuerpo lúteo en el ovario es la estructura que secreta la mayor cantidad de progesterona durante el inicio de la gestación promoviendo su establecimiento y mantenimiento a través de la producción proveniente de la placenta (Bowen-Shuuver y Gibori, 2003). La progesterona juega un rol esencial en el mantenimiento del embarazo al establecer la quiescencia uterina. La membrana fetal tiene un importante rol en la iniciación y mantenimiento del parto al ser el sitio de mayor síntesis y metabolismo de las prostaglandinas (Myatt y Sun 2010). El incremento de la síntesis de prostaglandinas ocurre en el parto a término y pre-termino (Myatt y Sun 2010). El músculo liso del útero mantiene bajos niveles de contractilidad espontánea durante la gestación, pero responde a estímulos que de manera coordinada favorecen la salida del feto durante el parto. Otras proteínas como las sintetasas del óxido nítrico (NOS) inducibles deben disminuir su expresión al contribuir a la relajación del músculos liso, necesaria durante la gestación (Arthur y cols. 2008). Un incremento en los niveles de estradiol regulan hacia abajo la expresión de las NOS en la vagina y útero durante el parto (Al-Hijji y cols. 2000).

Estudios en diferentes especies, incluyendo humanos, han mostrado que el embarazo está asociado a la pérdida progresiva de inervación uterina simpática a través de la degeneración de las terminales axónicas (Brauer, 2008). En la gestación, disminuye el área de las fibras de colágeno y el fenotipo de las células de músculo es transformado de contráctil a sintético. En el periodo posparto tardío estas características se observan similares a las observadas antes de la gestación (Daucher y cols. 2007). Además se ha reportado un incremento del área de la capa submucosa vaginal de ratas gestantes a término con respecto de las gestantes en el período temprano. Este cambio previo al parto, probablemente favorece la distensión mecánica (Liao y Smith 2011). La capacidad de distensión vaginal incrementa durante el embarazo (Alperin y cols. 2010). Este hallazgo caracteriza una importante adaptación maternal (Figura 5). La capacidad de la vagina para distenderse con un incremento mínimo de presión durante el embarazo está fuertemente vinculada a la reducción de riesgo de daño tanto a la madre como al feto durante el parto. En eventos donde la máxima capacidad para distenderse es excedida como



el caso de fetos de gran tamaño, la vagina y los tejidos que la rodean se dañan y es posible que no tengan una recuperación efectiva (Alperin y cols. 2010).



**Figura 5.** Distensión vaginal asociado a la experiencia reproductiva. A) Modelo de distensión vaginal en rata. B) Curva de volumen-presión intra-vaginal en ratas vírgenes, gestantes a término y 4 semanas posparto (Alperin y cols. 2010).

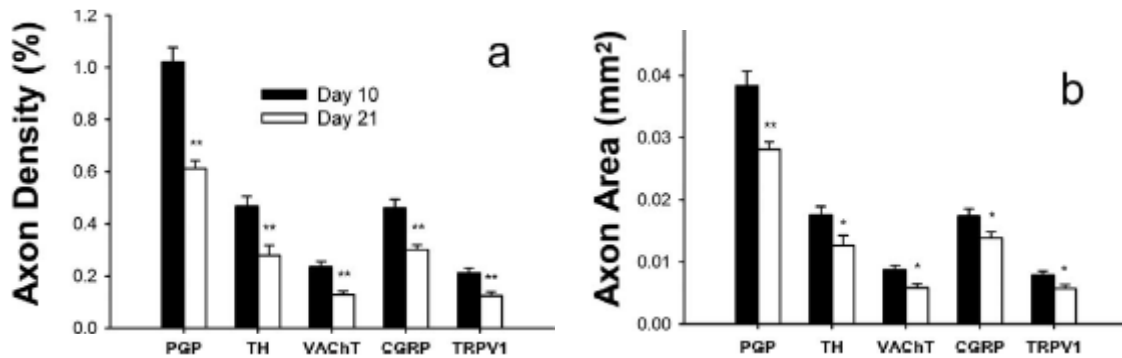
Estudios en la vagina de ratas gestantes, revelan diferencias considerables en la composición celular. Esto incluye, incremento del área superficial, reducción de la densidad de paquetes de colágeno y cambio en el fenotipo de contráctil a sintético (Daucher y cols. 2007). Estos hallazgos podrían estar relacionados con los niveles hormonales durante la gestación. Por un lado, la concentración de andrógenos en el suero incrementa considerablemente durante la segunda mitad de la gestación en rata, a partir de la síntesis de hormonas de la placenta y su posterior vaciamiento al sistema circulatorio (Gibori y Sridaran 1981). Estudios realizados en mujeres revelan que los niveles de estradiol y progesterona son significativamente mayores en mujeres con embarazo a término, mientras que, la oxitocina se incrementa significativamente en el parto a término (Yuan y cols. 2009).

Por otra parte, también se ha observado en ratas gestantes, el cuerpo lúteo expresa constitutivamente  $3\beta$ -hidroxiesteriode-dehidrogenasa que interviene en la síntesis de progesterona, esta enzima es regulada por prolactina. Mientras que la  $20\alpha$ -hidroxiesteriode-dehidrogenasa, la cual, cataboliza a la progesterona, es regulada hacia abajo durante la gestación por prolactina y lactógenos placentarios. Antes del parto la concentración de progesterona en circulación disminuye debido al incremento de la expresión de la enzima  $20\alpha$ -hidroxiesteriode-

dehidrogenasa (Stocco y cols. 2007). En la rata, se sugiere que en el día 21 de gestación la presencia de androstenediona en el ganglio que inerva al ovario, probablemente causa el incremento de diferentes neurotransmisores activando la síntesis de enzimas que degradan la progesterona (Vallcaneras y cols. 2009).

## 2.2. *Impacto de la gestación sobre la innervación vaginal*

La innervación simpática modula el flujo sanguíneo mediado por la vasoconstricción noradrenérgica. En roedores gestantes a término se ha caracterizado una reducción de la innervación en la pared vaginal. En el cobayo, al final de la gestación un decremento en el número de neuronas que expresan VIP, TH y NPY en el ganglio paracervical; sin embargo no se observan diferencias en la actividad de acetilcolinesterasa, ni en el tamaño neuronal entre gestantes y no gestantes (Mitchell y Satauber 1990). La pérdida de axones autonómicos y sensoriales probablemente contribuye a un mecanismo adaptativo asociado al parto. En ratas al día 21 de gestación, presentan una reducción de la densidad de fibras nerviosas alrededor del 40% comparada con ratas gestantes en la etapa temprana, evidenciado mediante inmunorreactividad al PGP-9.5 (Figura 6). De manera similar se observó una reducción de fibras nerviosas marcadas con tirosina hidroxilasa (TH), transportador de acetilcolina vesicular (VACHT), péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP) y receptor de potencial transitorio Vainilloide tipo 1 (TRPV1) en la pared vaginal de ratas gestantes a término (Figura 6). Estas observaciones reflejan la disminución de la innervación simpática al finalizar la gestación podría afectar el impulso neuro-efector, promoviendo la pérdida del tono muscular y de esta manera facilitar el paso del feto por el canal de parto (Liao y Smith 2011). Se especuló que la disminución de la intensidad de inmunorreacción es modulada por las hormonas gonadales (Mitchell y Stauber 1990). Además, la reducción de la innervación simpática hacia el final de la gestación podría incrementar el flujo sanguíneo protegiendo al tejido vaginal durante los episodios de isquemia provocados por la compresión vascular asociada al parto. Se presume que es una respuesta adaptativa para facilitar el parto (Liao y Smith 2011).



**Figura 6.** Análisis cuantitativo de la inervación vaginal durante la gestación en rata. a) Área de la muestra ocupada por fibras inmunorreactivas expresadas en porcentaje. b) Valores normalizados por el área total ocupada. (Liao y Smith 2011).

### 2.3. Modulación endocrina del tejido vaginal

La concentración sérica de estradiol fluctúa a lo largo de los ciclos reproductivos como el ciclo estral y la gestación en diversas especies de mamíferos. En la rata se ha reportado una disminución en la concentración sérica de estradiol asociada con la experiencia reproductiva (gestación, parto y lactancia), después de uno (Bridges y Byrnes 2006) o múltiples partos (Matt y cols. 1986). Se ha sugerido que la fluctuación de hormonas, como los estrógenos u otras, podría modular la organización histológica del conducto vaginal previo al evento del parto.

Los receptores de estrógenos son abundantes en los tejidos del aparato urogenital inferior (Hextall 2000), en la vagina, los estrógenos inducen proliferación del epitelio vaginal y remodelación vascular a través de los subtipos  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor de estrógenos (Buchanan DL y cols. 1998). Estos receptores actúan como factores de transcripción activados por ligando o como receptores de membrana acoplados a cascadas de señalización intracelular (Papka y Mowa 2003). Se ha descrito que la administración de estradiol, así como de progesterona modifica la histología vaginal en ratas ovariectomizadas (Pessina y cols. 2006). Además, se evidenció la participación de la relaxina sobre el contenido de fibras de colágeno y elastina en la vagina en rata (Zhao y cols. 2000).

La masa de musculatura lisa en el miometrio uterino varía durante las diferentes fases del ciclo estral en la rata. La administración de estrógenos revierte los efectos de la gonadectomía, al aumentar la masa de musculatura lisa en el útero (Zoubina y cols. 2001). En

contraste, la administración de estrógenos no revelan cambios significativos en los estudios morfométricos sobre la musculatura lisa de la pared vaginal de ratas, lo cual implica que otras hormonas gonadales son responsables del tamaño de este tejido (Ting Y y cols. 2004; Liao y Smith 2011).

En mujeres se ha evidenciado que el estatus hormonal contribuye a la disfunción posmenopáusica a través de la inervación (Komisaruk y cols. 2011). El marcador PGP-9.5 se expresa constitutivamente en todos los tejidos neuronales, su densidad incrementa significativamente en tejido vaginal de ratas ovariectomizadas comparadas con ratas en la fase estro de su ciclo (Ting y cols. 2004). Se ha evidenciado que el estradiol es la hormona principal que medía el cambio en la inervación vaginal. En ratas ovariectomizadas se observa un incremento de la inervación vaginal, la cual disminuye con la administración de estrógenos a niveles cuantitativamente idénticos a los observados durante la fase estro (Ting y cols. 2004). En este último modelo, se ha evidenciado que el incremento de inervación simpática provoca la contracción de músculo liso, generando vasoconstricción, incremento en el tomo vaginal, disminución del flujo sanguíneo y lubricación vaginal (Giraldi y cols. 2002). La disminución de estrógenos en suero está asociado con la reducción de la actividad de las sintasas del óxido nítrico en la vagina (Al-Hijji y cols. 2000). En este contexto se han observado diferencias importantes en la neuroplasticidad uterina y vaginal, implicando que diferentes mecanismos operan en estos dos tejidos (Ting y cols. 2004).

## 2.5. *El parto y modelos de distensión vaginal*

El mecanismo del comienzo del parto es una compleja interacción de diferentes vías hormonales, culminando con la actividad contráctil uterina, mediada por la producción de prostaglandinas. Antes del nacimiento, la actividad uterina es asociada con los cambios en el tejido conectivo, resultando en la maduración y dilatación cervical.

La denervación del piso pélvico durante el segundo estado de labor es mayor que la generada durante el embarazo en mujeres, además, puede variar la intensidad del daño dependiendo del tamaño del feto y la capacidad de distensión vaginal (Jozwik y Jozwik 2001).

En el modelo de simulación de trauma de parto (dilatación de globo intravaginal) seguido por ovariectomía, se observa, atrofia en la capa mucosa, incremento del contenido de colágeno y disminución de la capa muscular. A pesar de ello, no se observa diferencia entre el grupo expuesto a la distensión vaginal y el control en el índice de apoptosis (Resplande y cols. 2002). La sensibilidad a la oxitocina aumenta al final del embarazo y durante el parto promoviendo cambios bioquímicos y fisiológicos que facilitan el parto (Arthur y cols. 2008). En estudios realizados en rata muestran que la distensión vaginal en la gestación no regresa en el periodo posparto tardío (Alperin y cols. 2010). Estos hallazgos sugieren que los cambios en el comportamiento biomecánico de la vagina son consecuencia del embarazo y del parto espontáneo (Alperin y cols. 2010). El parto está fuertemente asociado con el desarrollo de incontinencia urinaria debido al daño generado en los tejidos del piso pélvico y estructuras musculares que físicamente soportan a la uretra y órganos responsables de la continencia, como las fibras nerviosas. Un neonato de gran tamaño o una prolongada duración del parto han sido asociadas con el daño en el piso pélvico y con el desarrollo de incontinencia urinaria (DeLancey y cols. 2008)

Estudios muestran que la distensión vaginal o el daño del nervio pudiendo por compresión resultan en un decremento del punto de presión de goteo y disminuye el número de fascículos nerviosos (13%), lo que evidencia un proceso de degeneración que contribuye a la disfunción de los órganos del piso pélvico (Damaser y cols. 2003). Otros estudios en modelos similares de parto generan: daño en el músculo estriado de la uretra, disminución de las células ganglionares en el plexo neural de la vagina y disminución de la sintasa del óxido nítrico neuronal en el músculo estriado de la uretra (Sievert y cols. 2001). El decremento del flujo sanguíneo y el incremento de hipoxia tisular pueden significar que ocurre isquemia tisular durante la distensión vaginal significando un daño en los órganos del piso pélvico (Damaser y cols. 2005). Otro grupo de investigadores aseguran que el embarazo y la cesárea no inducen alteraciones en el número de fibras. Por el contrario, el parto y el trauma vaginal disminuyen el número de fibras significativamente, además, se acentúan las alteraciones en el número de fibras cuando la estimulación de trauma vaginal precede al parto (Rocha y cols. 2007)

En lo que respecta al músculo liso en la vejiga y uretra se sabe que tiene la capacidad de regenerarse. Recientemente se han identificado otros quimioatrayentes, como el factor

quimiotáctico de monocitos 3 (MCP-3) que funciona como molécula de señalización para la migración de células hematopoyéticas que promueve la reparación del daño. Estudios histológicos seguidos de la distensión vaginal muestran un incremento en la expresión de MCP-3 en la uretra y vagina seguido de la distensión vaginal, sugiriendo la iniciación de un mecanismo de daño-regeneración (Woo y cols. 2009).

## 2.6. *El modelo de multiparidad en la coneja*

Condiciones fisiológicas como la cópula (Barberini y cols. 1992) y la multiparidad (Xelhuantzi y cols. en preparación), entre otros, inducen una desorganización de la histología vaginal. En conejas múltiparas se ha observado que en la pared uretral y vaginal existe una mezcla de la submucosa y 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 cuatro capas clásicas de un órgano tubular (mucosa, submucosa, muscular y externa). También presentan una reducción en las tres capas y en el espesor total de la pared uretral y vaginal antes y después de la desembocadura de la uretra en el conducto vaginal (Xelhuantzi 2006). Además, se presenta una disminución en el área de la musculatura lisa a lo largo de los distintos segmentos vaginales, una menor área de musculatura estriada en la vagina pélvica, así como de colágeno y elastina en la vagina pélvica (Xelhuantzi y cols. en preparación). También se ha evidenciado que la multiparidad promueve un desarreglo en la morfología de los ganglios paravaginales, en la coneja. Tal desarreglo no modifica ni el área de los ganglios ni el de los haces nerviosos analizados. En contraste el número de neuronas por campo es menor en la coneja múltipara que en la nulípara (Castelán y cols. prensa).

Además, en coneja múltipara disminuye el porcentaje de musculatura lisa en la pared de la uretra, pero incrementa el número de paquetes de éstos mismo. Estos cambios han sido asociados a los diversos factores que se presentan, como: la gestación, la distensión vaginal durante el parto y el número de partos (Sánchez-Vázquez C. 2011). Estos cambios podrían asociarse a incremento de presión abdominal durante la gestación, además, esto podría explicar

parcialmente las diferencias conductuales respecto a la micción en conejas multíparas vs conejas vírgenes (Quintanilla DL. 2005)

A pesar de las aportaciones que brinda el modelo de multiparidad, este diseño no permite determinar las causas directas de los cambios estructurales de la uretra distal debidas a la exposición de la cópula, gestación, parto y lactancia (Sánchez-Vázquez C. 2011).

### **3. Justificación**

La coneja es un modelo experimental útil para estudiar procesos reproductivos como la gestación y el parto. En este modelo, los niveles de las hormonas gonadales se mantienen constantes hasta que se presentan eventos como la cópula, gestación y el parto, debido a que es una especie ovuladora refleja. En varias especies de mamíferos se ha establecido que las fluctuaciones de hormonas gonadales modulan la organización histológica del conducto vaginal y la inervación paravaginal en el modelo de ovariectomía y restitución hormonal. En conejas multíparas, se ha observado modificaciones histológicas en la pared vaginal y en los ganglios paravaginales. Sin embargo, en este último modelo es difícil determinar la contribución de factores hormonales y mecánicos durante la experiencia reproductiva sobre la organización histológica de la pared vaginal y la inervación paravaginal. Tales factores pueden ser evidenciados al observar la organización histológica antes del parto (debida a las fluctuaciones hormonales), en el periodo posparto temprano (debido a la distensión vaginal) y en un periodo tardío en que probablemente ocurra una recuperación.



#### **4. Hipótesis**

Durante el historial reproductivo de la coneja que incluye el final de la gestación y hasta el día 20 posparto, la organización neural e histológica de la pared vaginal pélvica se encuentra modificada.

## **5. Objetivos**

### *5.1. Objetivo general*

Analizar el efecto del historial reproductivo de la coneja desde el final de la gestación y hasta el día 20 posparto sobre la organización neural e histológica de la pared vaginal pélvica.

### *5.2. Objetivos particulares*

En la vagina pélvica de conejas vírgenes, gestantes a término y primíparas de 3 y 20 días posparto:

- Determinar el espesor de las capas de la pared vaginal.
- Cuantificar la proporción de musculatura lisa.
- Cuantificar la proporción de musculatura estriada.
- Cuantificar la proporción de fibras de colágeno.
- Analizar la morfometría y composición de la inervación paravaginal.

## 6. Metodología

### 6.1. Animales

Se utilizaron conejas (*Oryctolagus cuniculus*) de la raza Chinchilla, de seis meses de edad y mantenidas en condiciones estándar de bioterio con un ciclo de 16 h / 8 h de luz y oscuridad, respectivamente. Los animales fueron alojados en jaulas individuales de acero inoxidable de 50 x 60 x 40 cm, con alimento Purina y agua ad libitum y a una temperatura de  $22 \pm 2$  °C. Las conejas se dividieron en los siguientes grupos (n = 6 por cada uno): I) vírgenes (V); II) gestantes a término (G), III) primíparas 3 días posparto (P3) y IV) primíparas 20 días posparto (P20). El protocolo reproductivo de los grupos G, P3 y P20 comenzó a los 6 meses de edad. El día de la primera cópula será considerado el día 1 de gestación. La gestación de la coneja es de aproximadamente 31 días. El grupo G fue sacrificado el día 30 de gestación. El grupo P3 fue sacrificado 3 días después del parto P20 fue sacrificado 20 días después del parto. El uso y manejo de los animales de experimentación 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. Disección

Las conejas fueron sacrificadas mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (60 mg/ Kg peso, ip.), y se les realizó una incisión sobre la línea media, desde la cavidad abdominal hasta la vagina perineal. De acuerdo con el protocolo descrito por Martínez-Gómez y cols. (1997), los músculos abdominales y el tejido adiposo del área fueron extraídos. Después se removieron los huesos isquion y pubis, así como los músculos obturadores externos e internos. Se ligaron venas y arterias que irrigan al plexo venoso para evitar hemorragias severas y se extrajo el segmento pélvico de la vagina.

### 6.3. Histología

Después de la extracción, la vagina pélvica fue fijada en solución de Bouin-Duboscq (ácido Pítrico 0.39%, formalina 26.66%, Ac. Acético 6.66%, etanol 80%), por 24 h, deshidratada con etanol en concentraciones ascendentes (70, 80, 96 y 100%), aclarada en xileno, infiltrada e incluida en paraplast X-tra (McCormick); para obtener cortes transversales de 7  $\mu$ m con un microtomo (Leica, RM2135). Los cortes se recolectaron en portaobjetos formando series paralelas. Éstos fueron teñidos con tricrómica de Masson para determinar aspectos

histomorfométricos (espesor) de la capa mucosa, intermedia y externa de la pared del conducto vaginal.

En la capa intermedia se evaluó el porcentaje de fibras de colágeno y de paquetes de musculatura lisa. En la externa se determinó el porcentaje de musculatura estriada y de colágeno. En la capa externa se evaluó el número de fibras por campo y el diámetro de las fibras. En los ganglios paravaginales se evaluó el número y área de los ganglios, nervios y neuronas por campo. Se evidenció la identidad neuroquímica por medio de acetilcolina-transferasa y tirosina hidroxilasa en los ganglios paravaginales que fueron identificados previamente mediante  $\beta$ -tubulina III empleando la técnica de inmunohistoquímica descrita a continuación. Se evaluó la presencia de receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  en los ganglios paravaginales mediante inmunohistoquímica.

#### 6.4. *Inmunohistoquímica*

En los ganglios paravaginales para determinar la naturaleza de las células ganglionares, se usó un anticuerpo específico para la enzima tirosina hidroxilasa (TH; enzima que participa en la síntesis de adrenalina, marcador de neuronas simpáticas), y la enzima acetilcolina transferasa (ChAT; que participa en la síntesis de acetilcolina; marcador de neuronas parasimpáticas). Y con el fin de reconocer la identidad neuronal de las células inmunorreactivas anti-TH (abcam, monoclonal) y anti-ChAT se empleó un anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina III, específico de neuronas. En estos mismos ganglios para determinar la sensibilidad a los estrógenos se usó un anticuerpo específico para receptores de estrógenos alfa (RE $\alpha$ ) y beta (RE $\beta$ ). Después de desparafinar y hacer la re-exposición de los antígenos, los cortes del conducto vaginal fueron incubados con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en PBS 0.1 M pH 7.4 durante 30 min. A continuación, se incubaron con una solución 5% de suero normal de cabra (NGS) para anti-Tuj, anti-TH, anti-RE $\alpha$  y anti-RE $\beta$ . Para anti-ChAT se incubaron con suero normal de burro (NDS) cada uno en 0.3% de triton x-100 en PBS, durante 1 hora, para bloquear uniones inespecíficas. Posteriormente, los cortes se incubaron con el primer anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina III (Tuj, 1:500), neuronas; anti-tirosina hidroxilasa (TH, 1:250), neuronas adrenérgicas; anti-colina acetiltransferasa (ChAT, 1:500); neuronas colinérgicas, Receptores de estrógenos (RE $\alpha$  y RE $\beta$ , 1:150); cada uno diluido en una solución de 0.3% triton x-100 en PBS, durante una noche a 4°C para Tuj1, TH y ChAT,

y 3 noches para RE $\alpha$  y RE $\beta$ . Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-IgG biotinilado) diluido 0.3% triton x-100 en PBS, durante 2 h a temperatura ambiente. Después, los cortes se lavaron con PBS y se incubaron con el Complejo avidina-biotina-HRP (ABC), diluido 1:200 en PBS, durante 1 h. Finalmente, se realizó el revelado en una solución de DAB al 0.05% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.02% en PBS, hasta obtener el marcaje de las células. La reacción se detuvo haciendo varios lavados con PBS 0.1 M. Los cortes fueron deshidratados en alcoholes de 70, 96 y 100%, cubiertos con medio de montaje y un cubreobjetos.

#### 6.5. *Análisis histológico en la tinción tricrómica de Masson*

La determinación de las características estructurales de la pared vaginal y tejido paravaginal se analizó en 20 cortes teñidos con tricrómica de Masson. Tomando como referencia a la desembocadura de la uretra como punto de muestreo. Se cuantificó el espesor de cada capa en la pared vaginal, la proporción de musculatura lisa y estriada, la proporción de colágeno. También, se analizó el tejido paravaginal, del número y área de estructuras de tipo neuronales, ganglios y nervios por campo, en cada grupo. Además, se evaluó el perímetro del lumen vaginal siguiendo las anfractuosidades en cortes localizados justo antes de la desembocadura de la uretra. Estos análisis se realizaron mediante microfotografías tomadas con un microscopio de luz visible (*nikon ECLIPSE E600*) y con una cámara digital (*OLYMPUS de 5.1 megapixeles*) utilizando los programas ImageJ y *AxioVision Rel 4.3*.

#### 6.6. *Cuantificación la proporción de musculatura lisa y musculatura estriada*

Para la musculatura lisa y estriada se analizaron microfotografías tomadas con el objetivo 20X y 40X respectivamente en la pared lateral derecha de la vagina pélvica (Figura 7), 10 cortes antes de la desembocadura de la uretra y 10 cortes posteriores a ésta, con una distancia aproximada entre ellos de 70 micrómetros. En las microfotografías el diámetro, número de fibras de musculatura estriada,

#### 6.7. *Cuantificar la proporción de fibras de colágeno*

Se evaluó la proporción de fibras de colágeno en la capa interna y externa, tomando como referencia las mismas regiones y aumentos que se emplearon para evaluar la musculatura lisa y estriada respectivamente.

#### 6.8. *Determinación del espesor de las capas de la pared vaginal.*

Para evaluar el espesor de las capas de la pared de la vagina se tomaron microfotografías con el objetivo de 4X. Se muestreó el lado derecho e izquierdo de la vagina, a la altura de la desembocadura de la uretra, 10 cortes en dirección la región craneal y 10 cortes en dirección caudal (Figura 7). Se graficó el espesor derecho e izquierdo en una sola barra para cada condición.

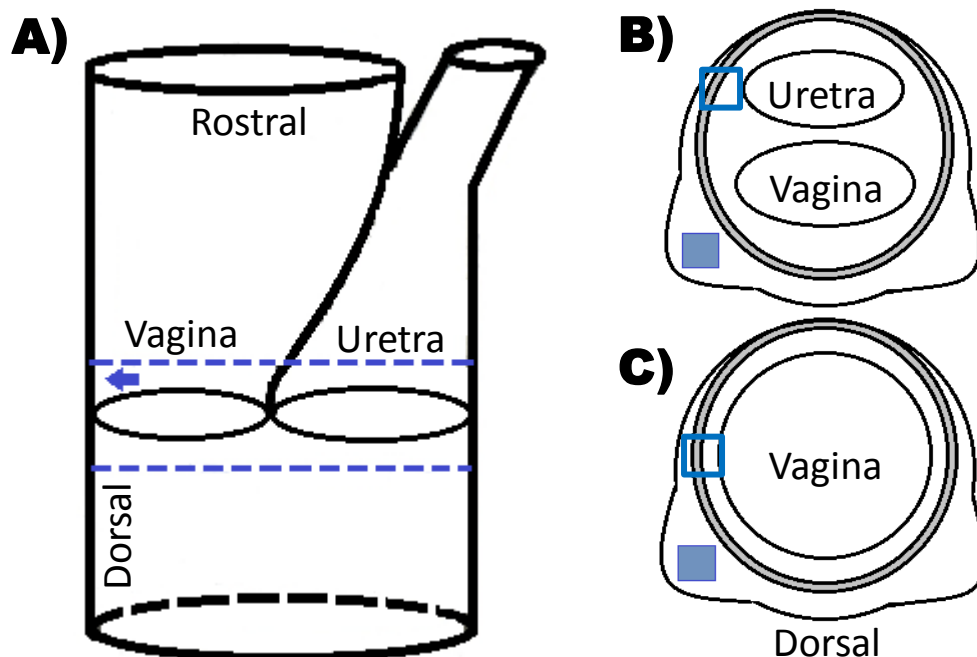
En el espesor de la capa mucosa se consideró la capa epitelial desde la región apical hasta la basal. La capa intermedia se consideró desde la lámina propia hasta el inicio del plexo venoso. Para la medición de la capa externa se consideró desde el plexo venoso hasta la última fibra de la musculatura estriada circular que rodea a la vagina. Dentro de esta última capa se consideró evaluar por separado el plexo venoso y la capa de fibras de músculo estriado. Para evaluar el espesor del plexo venoso se consideró la zona donde se presentaran abundantes vasos sanguíneos y de gran calibre.

#### 6.9. *Determinación de la morfología y composición de la los ganglios paravaginales.*

##### 6.9.1. *Parámetros morfométricos*

Para la evaluación de estos parámetros se eligieron 20 cortes de la vagina pélvica (10 cortes antes de la desembocadura de la uretra y 10 cortes posteriores a ésta), con una separación de 70  $\mu\text{m}$  entre los cortes, registrando sólo el lado derecho del conducto vaginal.

Para evaluar el efecto de la condición sobre el número de neuronas, se cuantificó el número total de somas con núcleo en el área seleccionada previamente para la medición de los ganglios. Los datos presentados son la suma de neuronas, ganglios y nervios por campo en cada individuo. Para el área de los ganglios y nervios, los resultados representar la densidad de nervios y ganglios por campo.



**Figura 7.** Regiones de muestreo en la vagina pélvica de la coneja. A) Vista lateral de la vagina pélvica, flecha indica la región de los ganglios paravaginales. B) Esquema de un corte transversal de la vagina pélvica antes de la desembocadura de la uretra. C) Esquema de un corte transversal de la vagina pélvica después de la desembocadura de la uretra. Los cuadros con relleno muestran la ubicación de los ganglios paravaginales. Los cuadros sin rellenos muestran la zona de muestreo para la evaluación de la pared vaginal.

### 6.9.2. Comunicación química

De manera cualitativa se estimó la intensidad del marcaje en los ganglios paravaginales, entre los grupos experimentales para cada anticuerpo. Se emplearon cortes consecutivos para cada anticuerpo, 10 cortes antes de la desembocadura de la uretra para cada individuo en las diferentes condiciones.

### 6.10. Análisis estadístico

Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar. Para cada parámetro, el análisis estadístico se hizo mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con una  $p \leq 0.05$  y una prueba *post-hoc* de Newman-Keuls con una  $n=6$  para cada grupo. Para los parámetros cualitativos se evaluó presencia o ausencia y se analizó mediante una chi-cuadrada  $p \leq 0.05$  y con una  $n=6$  para cada grupo. En todos los casos se usó el programa de análisis estadístico Prism v4.0 para Windows (GraphPad).

## 7. Resultados

### 7.1. *Peso de la coneja y las crías*

Antes de presentar los resultados correspondientes a los objetivos planteados, se muestra en la siguiente tabla el peso de las crías nacidas y el peso de las conejas en el día del sacrificio. No se observan diferencias estadísticamente significativas en los pesos de conejas, ni entre las crías de las diferentes condiciones experimentales.

Estado reproductivo	Peso de la coneja (Kg)	Número de crías	Peso de las crías (g)
V	4.07 ± 0.15	NA	NA
G	3.94 ± 0.14	NA	NA
P3	3.70 ± 0.13	7 ± 1	55.04 ± 2.7
P20	3.84 ± 0.12	6 ± 1	63.24 ± 1.5

**Tabla 1.** Peso de las conejas y crías: virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20) Los datos representan la media ± ee; NA=No Aplica, n=6. Analizados mediante ANOVA.

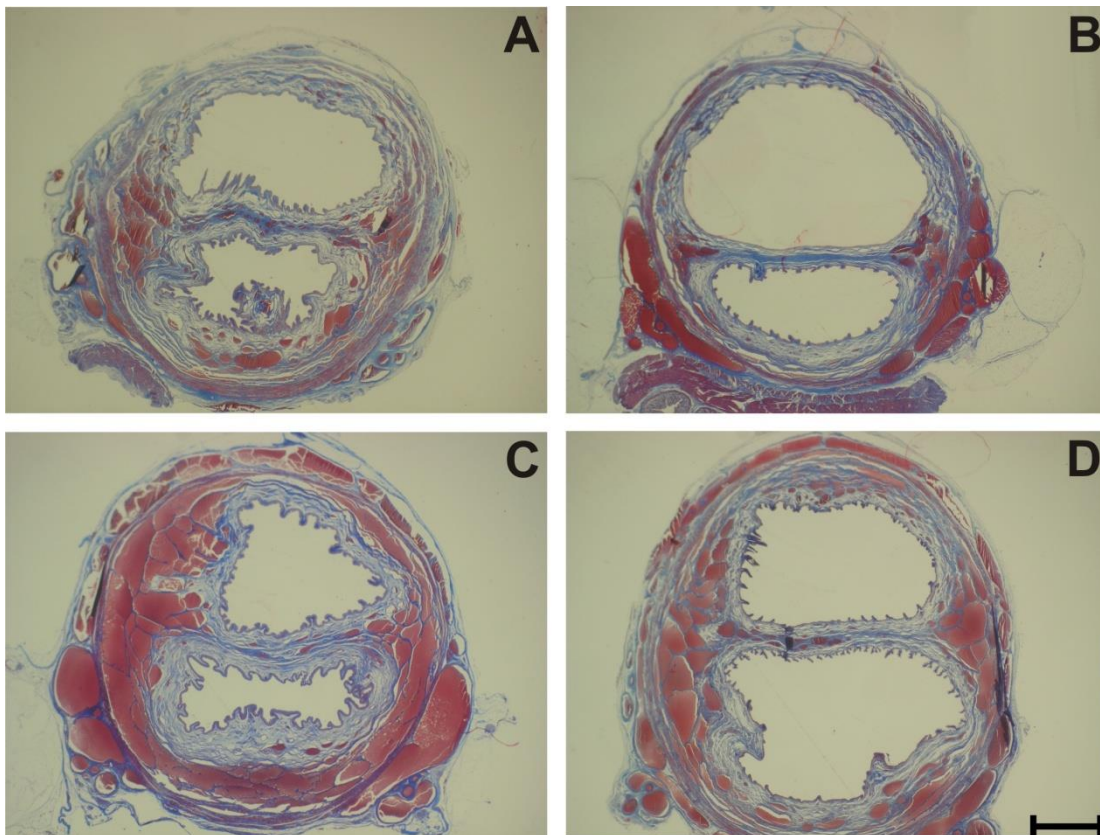
### 7.2. *Descripción histológica de la pared de la vagina pélvica*

Se evaluó diferentes características histológicas de la pared y ganglios paravaginales en la región pélvica de la vagina. En el primer apartado se muestran los resultados obtenidos de la caracterización morfométrica de músculo y colágeno en las capas de la pared vaginal (interna y externa), así como de la capa mucosa en conejas gestantes y primíparas. En el segundo apartado, se exponen los resultados obtenidos de la caracterización morfométrica de la innervación en el tejido paravaginal, así como, la evaluación de la sensibilidad estrogénica y comunicación química del tejido neuronal en las diferentes condiciones reproductivas.

Comenzaremos en el primer apartado con los resultados obtenidos del espesor de las diferentes capas de la pared vaginal, el tipo de epitelio en la capa mucosa, el contenido de músculo y de colágeno, así como, la descripción de la distribución y características morfológicas de músculo, colágeno y vasos sanguíneos en las capas intermedia y externa de la pared vaginal.

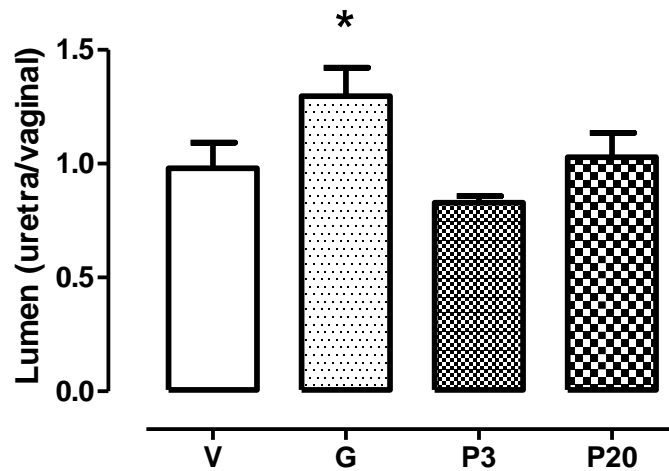


Se analizó la pared de la vagina en la región pélvica y se realizaron diversas observaciones a lo largo del conducto. En los cortes fue posible apreciar diferencias en la superficie del lumen vaginal y uretral (Figura 8). Las observaciones de la capa epitelial muestran múltiples anfractuosidades en conejas primíparas, sin embargo, en conejas gestantes el tamaño de la uretra parece tener un lumen mayor que el de la vagina.



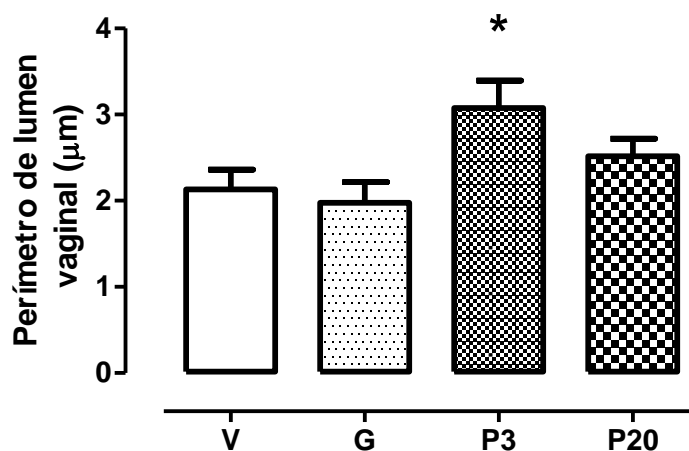
**Figura 8.** Pared lateral de la vagina pélvica en conejas: virgen (A), gestante (B), primípara 3 días posparto (C) y primípara 20 días posparto (D), teñidas con Tricrómica de Masson, barra 200  $\mu$ m.

La cuantificación del perímetro de lumen uretral no mostró diferencias estadísticamente significativas (ver anexo 1). La relación de lumen uretral respecto del lumen vaginal evidencio que en conejas vírgenes la relación es cercana a 1 (Gráfica 1). Mientras que en conejas gestantes la relación incrementó (1.3), pero 3 días posparto se invierte la relación al aumentar el tamaño del lumen vaginal (0.8), 20 días posparto la relación tiene un comportamiento similar al de conejas vírgenes (1).



**Gráfica 1.** Relación del lumen uretra-vagina en la región pélvica de conejas: virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la media  $\pm$  ee, \* $P=0.033$  con respecto del grupo V.

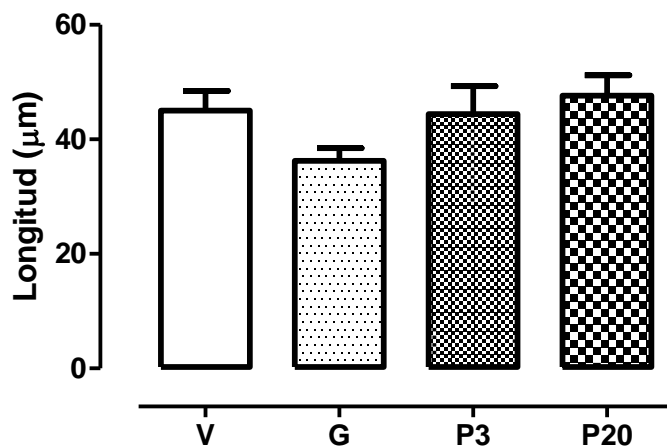
El análisis del perímetro del lumen vaginal a la altura de la desembocadura de la uretra muestra que las conejas primíparas tienen una superficie epitelial mayor que las conejas gestantes y vírgenes (Gráfica 2). En conejas primíparas, 20 días posparto, el perímetro del lumen vaginal tiende a disminuir y se acerca a los valores obtenidos en conejas vírgenes y gestantes.



**Gráfica 2.** Perímetro del lumen vaginal en la región pélvica de conejas: virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la media  $\pm$  ee, \* $P=0.033$ , con respecto del grupo V.

### 7.3. Espesor de la capa mucosa en la pared vaginal

En el grupo virgen se contabilizó un espesor de  $45.01 \pm 3.5 \mu\text{m}$ , durante la gestación se midió un espesor de  $36.25 \pm 2.2 \mu\text{m}$ , mientras que en el grupo 3 días posparto fue de  $44.41 \pm 4.8 \mu\text{m}$  y 20 días posparto se registró de  $47.64 \pm 3.5 \mu\text{m}$ . Los resultados de la cuantificación del espesor de la capa mucosa no muestran diferencia estadísticamente significativa comparada con el grupo virgen (Gráfica 3).

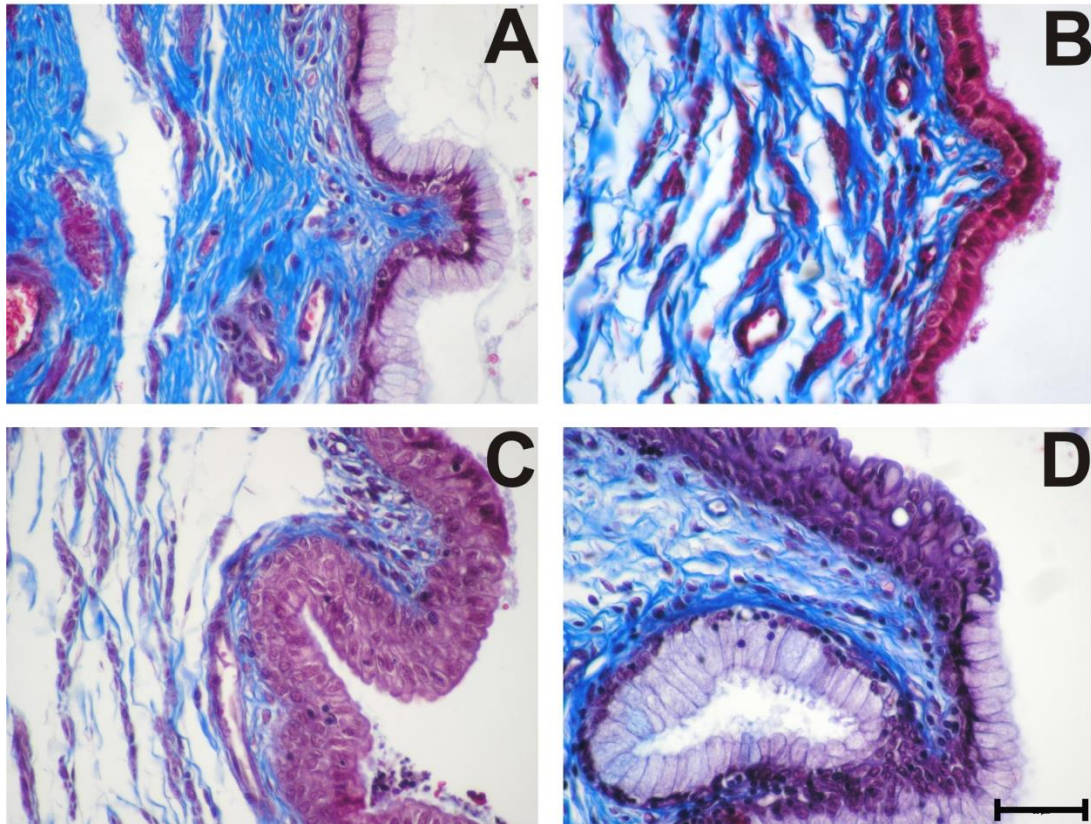


**Gráfica 3.** Espesor de la mucosa de la vagina pélvica en conejas: virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la media  $\pm$  ee,  $P=0.1778$ , con respecto del grupo V.

En la evaluación histológica, el grupo virgen mostró epitelio cúbico estratificado y cilíndrico, este último se observó preferentemente antes de la desembocadura de la uretra, en las paredes laterales de la vagina (Tabla 2). En la gestación a término y el periodo posparto temprano (3 días) sólo se observa cúbico estratificado en toda la región pélvica (antes y después de la desembocadura). En el grupo evaluado 20 días después del parto, se observa epitelio cilíndrico antes de la desembocadura de la uretra, pero en menor proporción que el observado en el grupo virgen (Figura 9).

Tipo de epitelio en la capa mucosa				
Tipo de epitelio	V	G	P3	P20
a) Cilíndrico	3/6 (50%)	0/6 (0%)*	1/6 (16.66%)*	1/6 (16.66%)*
b) Cúbico	3/6 (50%)	6/6 (100%)	5/6 (83.33%)	5/6 (83.33%)

**Tabla 2.** Virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la frecuencia observada, Analizado mediante Chi-cuadrada, \*\*\* $P=0.0001$ ,  $n=6$ .

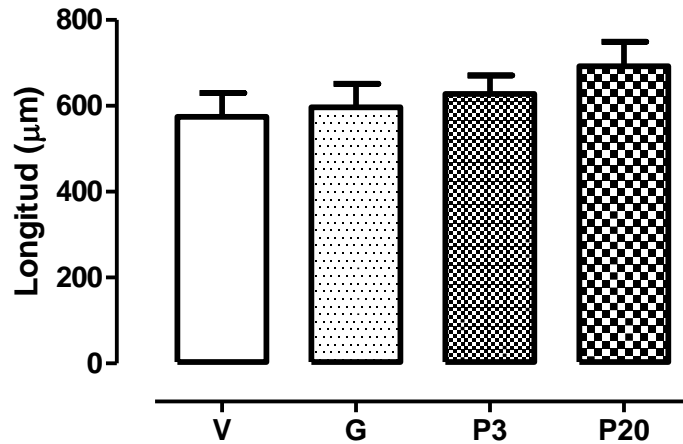


**Figura 9.** Capa mucosa en la vagina pélvica en conejas: virgen (A), gestante (B), primípara 3 días posparto (C) y primípara 20 días posparto (D), teñidas con Tricrómica de Masson. Barra 50  $\mu\text{m}$ .

#### 7.4. *Evaluación de la capa interna en la pared vaginal*

##### 7.4.1. *Espesor de la capa intermedia de la pared vaginal*

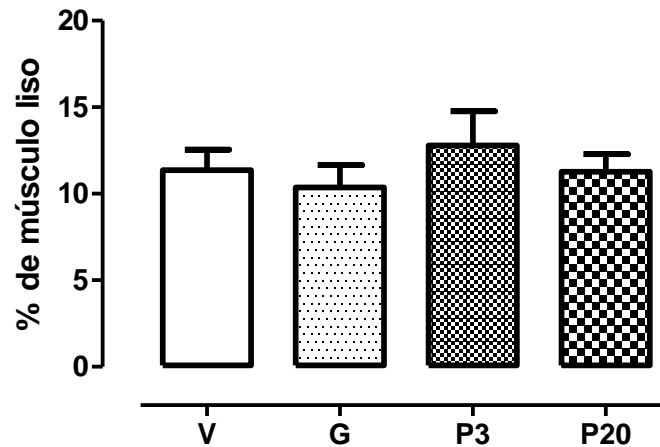
El espesor de la capa intermedia se consideró desde la capa submucosa (inmediatamente después de la zona basal del epitelial) y hasta antes de la zona de plexo venoso, este último compuesto por vasos de mayor calibre en el corte transversal de la vagina. Para el grupo virgen se midió un espesor de  $574.6 \pm 55.5 \mu\text{m}$ , en el grupo gestante se registró un espesor de  $596.9 \pm 54.6 \mu\text{m}$ , en el grupo 3 días posparto fue de  $627.8 \pm 42.7 \mu\text{m}$  y para el grupo evaluado 20 días posparto se encontró de  $692.5 \pm 56.5 \mu\text{m}$  (Gráfica 4). Los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos gestante y posparto comparados con el grupo virgen, analizados mediante ANOVA,  $P=0.4354$ .



**Gráfica 4.** Espesor de la capa muscular interna de la vagina pélvica en conejas: virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la media  $\pm$  ee;  $P=0.4354$ , con respecto del grupo V.

#### 7.4.2. Proporción de músculo liso y colágeno en la capa intermedia

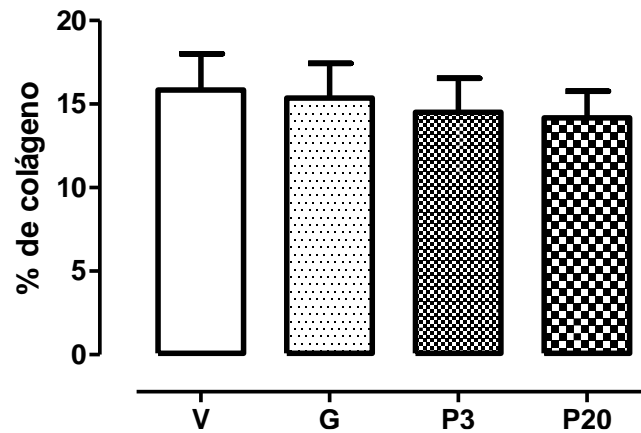
La evaluación de la proporción de músculo liso en la capa intermedia de la pared vaginal, muestra en el grupo virgen un porcentaje de área de músculo liso de  $11.35 \pm 1.2\%$  por campo (Gráfica 5). Hacia el final de la gestación fue de  $10.35 \pm 1.3\%$  por campo, durante el periodo posparto temprano (3 días posparto) se observó un porcentaje de  $12.80 \pm 1.9\%$  por campo, mientras que en el periodo tardío (20 días posparto) se registró  $11.26 \pm 1.0\%$  por campo.



**Gráfica 5.** Proporción de musculatura lisa en la capa muscular interna de la vagina pélvica en conejas: virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la media  $\pm$  ee,  $P= 0.6836$ , con respecto del grupo V.

Los resultados de la musculatura lisa no muestran diferencia estadísticamente significativa entre los grupo gestante y primíparas con respecto del grupo virgen, analizados

mediante ANOVA,  $P= 0.6836$ . La evaluación del porcentaje de colágeno por campo en la capa muscular interna evidencia en el grupo virgen un porcentaje de  $15.85\pm 2.1$  por campo, mientras que en la gestación a término se muestra un  $15.37\pm 2.1\%$  por campo. En el período temprano se muestra un  $14.51\pm 2.0\%$  por campo, y 20 días posparto se encontró un  $11.17\pm 1.6\%$  por campo (Gráfica 6). El análisis de los resultados no muestra diferencia estadísticamente significativa con respecto del grupo virgen,  $P=0.9276$ .



**Gráfica 6.** Proporción de colágeno en la capa muscular interna de la vagina pélvica en conejas: virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la media  $\pm$  ee,  $P= 0.9276$ , con respecto del grupo V.

#### 7.4.3. Características histológicas de la musculatura lisa y colágeno en la capa intermedia

En la capa interna de la pared de la vagina, el grupo virgen muestra una distribución homogénea de musculatura lisa, colágeno y vasos sanguíneos (Figura 8). En este mismo grupo, se observa que las fibras de músculo liso corren transversalmente. De manera cualitativa, en el grupo gestante se encontraron fascículos de músculo liso de menor tamaño respecto al grupo virgen. Esta característica se mantiene hasta 20 días después del parto (Tabla3). La frecuencia de paquetes de musculatura lisa de tamaño mediano y grande disminuye durante la gestación, inmediatamente después del parto y hasta los 20 días posparto.

<b>Tamaño de los paquetes de músculo liso en la capa intermedia</b>				
<b>Tamaño</b>	<b>V</b>	<b>G</b>	<b>P3</b>	<b>P20</b>
<b>a) Pequeño</b>	1/6 (16%)	4/6 (66%)**	2/6 (33%)**	3/6 (50%)**
<b>b) Mediano</b>	6/6 (100%)	6/6 (100%)**	4/6 (66%)**	3/6 (50%)**
<b>c) Grande</b>	6/6 (100%)	3/6 (50%)*	4/4 (66%)*	4/6 (66%)*

**Tabla 3.** Virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la frecuencia observada, Analizado mediante Chi-cuadrada, \*\* $P=0.001$ , \*  $P=0.01$ .

En el grupo gestante sólo algunos de los individuos presentaron alteraciones histológicas en las fibras de colágeno, éstas últimas se observaron con una estructura difusa (50%) o compactada (33%) solo en zonas cercanas a los paquetes de musculatura lisa (Tabla 4). Esta evaluación muestra diferencia estadísticamente significativa entre las conejas gestantes a término y primíparas con respecto del grupo virgen en el colágeno compacto.

<b>Características morfológicas de la estructura de colágeno en la capa intermedia</b>				
<b>Tipo de colágeno</b>	<b>V</b>	<b>G</b>	<b>P3</b>	<b>P20</b>
<b>d) Difuso</b>	2/6 (33%)	3/6 (50%)	2/6 (33%)	2/6 (33%)
<b>e) Compacto</b>	0/6 (0%)	2/6 (33%)*	2/6 (33%)*	1/6 (16%)

**Tabla 4.** Virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la frecuencia observada, Analizado mediante Chi-cuadrada, \* $P=0.01$ ,  $n=6$ .

Cualitativamente, se observa al final de la gestación una mayor presencia de vasos de pequeño calibre con respecto del grupo virgen. Después del parto (3 días) se evidencia con mayor frecuencia vasos de mediano y gran calibre con respecto al grupo virgen. Las observaciones de la vascularización en esta capa, 20 días después del parto revelan resultados similares a los observados en las conejas vírgenes (Tabla 5).

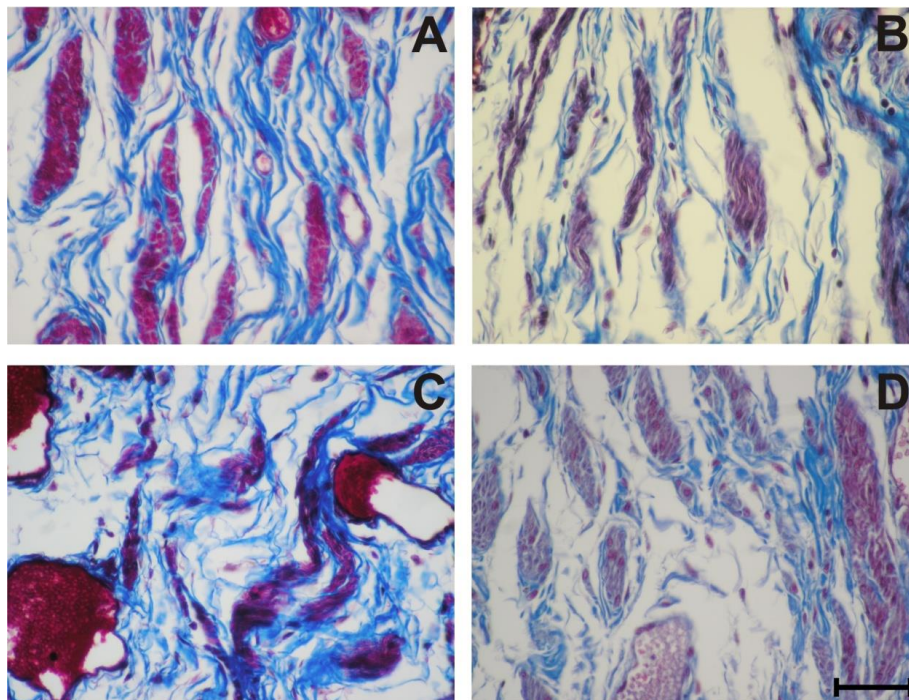


**Tamaño de los vasos sanguíneos en la capa intermedia**

Tamaño	V	G	P3	P20
a) Pequeño	3/6 (50%)	5/6 (83%)**	1/6 (16%)**	3/6 (50%)
b) Mediano	3/6 (50%)	1/6 (16%)**	5/6 (83%)**	3/6 (50%)
c) Grande	3/6 (50%)	4/6 (66%)	4/4 (66%)	4/6 (66%)

**Tabla 5.** Virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la frecuencia observada, Analizado mediante Chi-cuadrada, \*\* $P=0.001$ ,  $n=6$ .

La evaluación de la distribución de los componentes histológicos de la capa intermedia, muestra que al final de la gestación y en el periodo posparto temprano, alteraciones en el tamaño de los paquetes de músculo liso (Figura 10), colágeno compactado en algunas zonas y mayor frecuencia de vasos de pequeño calibre con respecto a las observaciones realizadas en conejas vírgenes. En un período posparto tardío (20 días después del parto), se observan características histológicas similares a las observadas en conejas vírgenes.



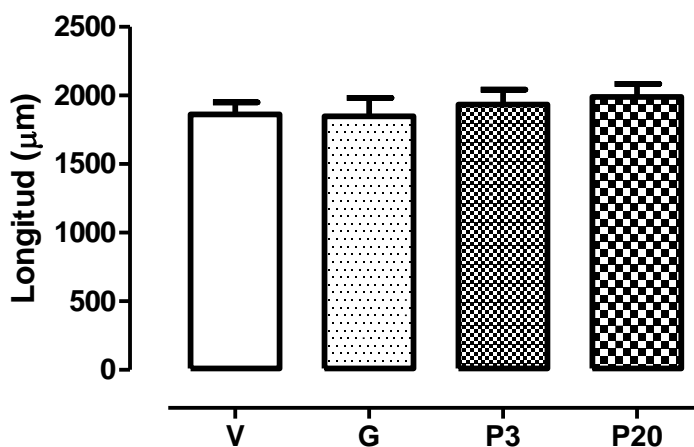
**Figura 10.** Capa muscular interna (músculo liso) en la vagina pélvica en conejas: virgen (A), gestante (B), primípara 3 días posparto (C) y primípara 20 días posparto (D), teñidas con Tricrómica de Masson. Barra 100  $\mu\text{m}$ .



## 7.5. Evaluación de la capa externa en la pared vaginal

### 7.5.1 Espesor de la capa externa de la pared vaginal

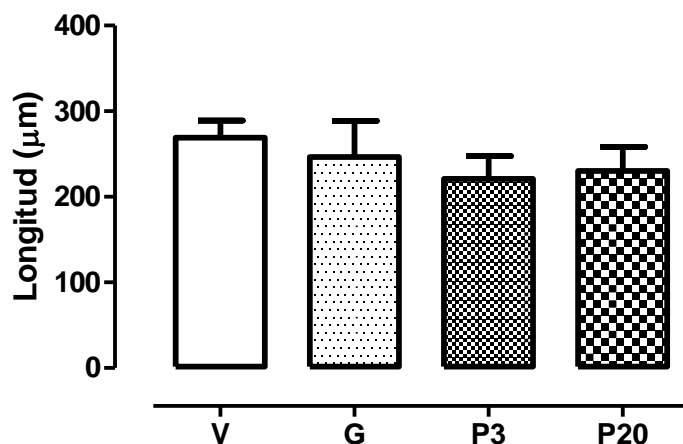
Se evaluó el espesor de la capa externa de la pared vagina, en conejas vírgenes se observó un espesor de  $1862 \pm 88.5 \mu\text{m}$  (Gráfica 7), en el grupo gestante a término se encontró un espesor de  $1849 \pm 134.8 \mu\text{m}$ , en el período posparto temprano (3 días posparto) un espesor de  $1883 \pm 117.4 \mu\text{m}$ , en el período tardío (20 días posparto) un espesor de  $1947 \pm 101.9 \mu\text{m}$ . El análisis de los resultados no muestra diferencia estadísticamente significativa con respecto del grupo virgen, analizados mediante ANOVA,  $P= 0.9321$ .



**Gráfica 7.** Espesor de la capa muscular externa de la vagina pélvica en conejas: virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la media  $\pm$  ee,  $P= 0.9321$ .

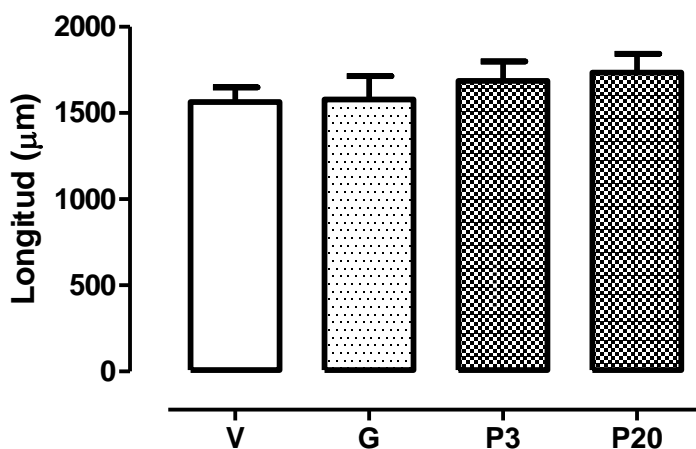
La capa externa de la pared de la vagina, está formada por un plexo sanguíneo abundante y fibras de músculo estriado (únicamente en la región pélvica de la vagina), éstas corren de manera circular rodeando la vagina y uretra (Figura 8). El espesor de ambos componentes estructurales se evaluó de manera independiente.

Los datos obtenidos del espesor de la capa de músculo estriado (Gráfica 8) en el grupo virgen muestra en espesor de  $268.9 \pm 20.2 \mu\text{m}$ , durante la gestación a término el espesor es de  $246.3 \pm 42.5 \mu\text{m}$ , 3 días después del parto es de  $220.8 \pm 26.9 \mu\text{m}$ , y 20 días posparto es de  $230.1 \pm 28.4 \mu\text{m}$ . Estos resultados no muestran diferencia estadísticamente significativa con respecto del grupo virgen, los datos se analizaron mediante ANOVA,  $P=0.7032$ .



**Gráfica 8.** Espesor del músculo estriado en la capa muscular externa de la vagina pélvica en conejas: virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la media  $\pm$  ee,  $P=0.7032$ .

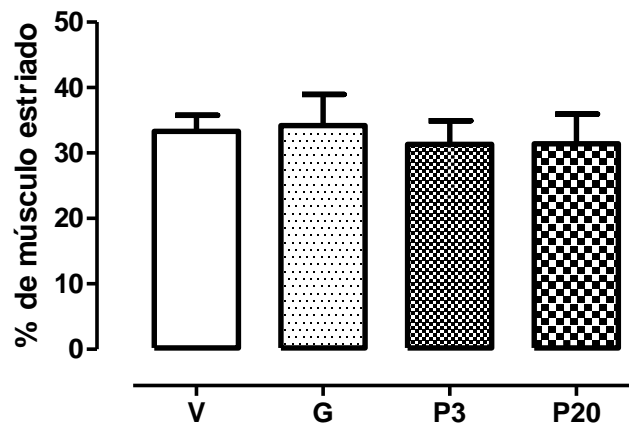
En lo que respecta para el plexo venoso de la capa externa (Gráfica 9), se observó un espesor de  $1565 \pm 84.7 \mu\text{m}$  en conejas vírgenes, en conejas gestantes a término un espesor de  $1580 \pm 133.9 \mu\text{m}$ , mientras que en el periodo posparto se observó de  $1685 \pm 114.0 \mu\text{m}$  y  $1735 \pm 108.7 \mu\text{m}$  a los 3 y 20 días posparto, respectivamente. El análisis de los datos refleja que no existe diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales con respecto del grupo virgen, evaluados mediante una prueba de ANOVA  $P=0.6582$ .



**Gráfica 9.** Espesor del plexo sanguíneo en la capa muscular externa de la vagina pélvica en conejas: virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la media  $\pm$  ee,  $P=0.6582$ .

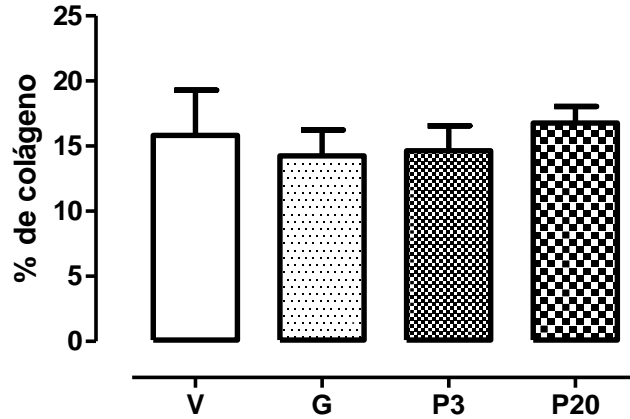
### 7.5.2 Proporción de músculo estriado y colágeno en la capa externa

Se evaluó la proporción de área ocupada por la musculatura estriada y colágeno por campo en la capa externa. Los datos muestran que en conejas vírgenes hay un  $33.33 \pm 2.4\%$  por campo, en gestantes es de  $34.20 \pm 4.7\%$ , después del parto se observa un porcentaje de  $31.33 \pm 3.6$  y de  $31.43 \pm 4.5$  durante el día 3 y 20 posparto, respectivamente (Gráfica 10). Los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con respecto al grupo virgen, analizados mediante una ANOVA,  $P=0.9405$ .



**Gráfica 10.** Proporción de musculatura estriada en la capa externa de la vagina pélvica en conejas: virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la media  $\pm$  ee,  $P=0.9954$ .

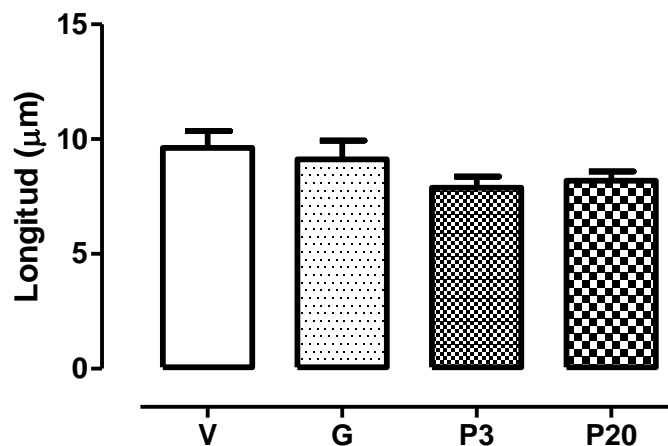
En lo que respecta a la proporción de colágeno entre las fibras de musculatura estriada circular localizada en la capa externa de la pared vaginal (Gráfica 11), se observó que en conejas vírgenes es de  $15.83 \pm 3.5\%$  por campo, durante la gestación a término es de  $14.24 \pm 2.0\%$  por campo, en el periodo posparto es de  $14.64 \pm 1.9\%$  y  $16.78 \pm 1.3\%$ , en el día 3 y 20 después del parto, respectivamente. Los datos fueron analizados mediante ANOVA, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales con respecto del grupo virgen,  $P=0.8610$ .



**Gráfica 11.** Proporción de colágeno en la capa externa de la vagina pélvica en conejas: virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la media  $\pm$  ee,  $P=0.8610$ .

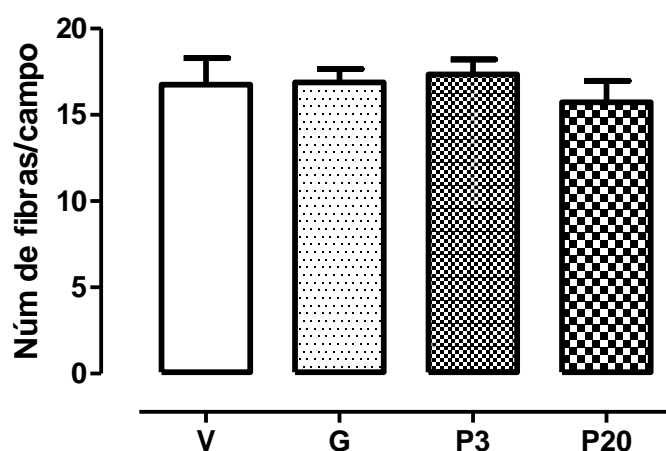
### 7.5.3. Características histológicas de la capa de musculatura estriada en la capa externa

Se evaluó el diámetro de las fibras que componen la musculatura estriada de la capa externa en cortes transversales (Gráfica 12). Se observó que las conejas vírgenes presentan fibras de músculo estriado con un diámetro de  $9.62 \pm 0.7 \mu\text{m}$ , durante la gestación a término se observan con un diámetro de  $9.11 \pm 0.8 \mu\text{m}$ , mientras que en el período posparto se tienen un diámetro de  $7.88 \pm 0.5 \mu\text{m}$  y  $8.18 \pm 0.4 \mu\text{m}$  en el día 3 y 20 días posparto, respectivamente. Los datos se analizaron mediante ANOVA, no muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto del grupo virgen,  $P=0.2203$ .



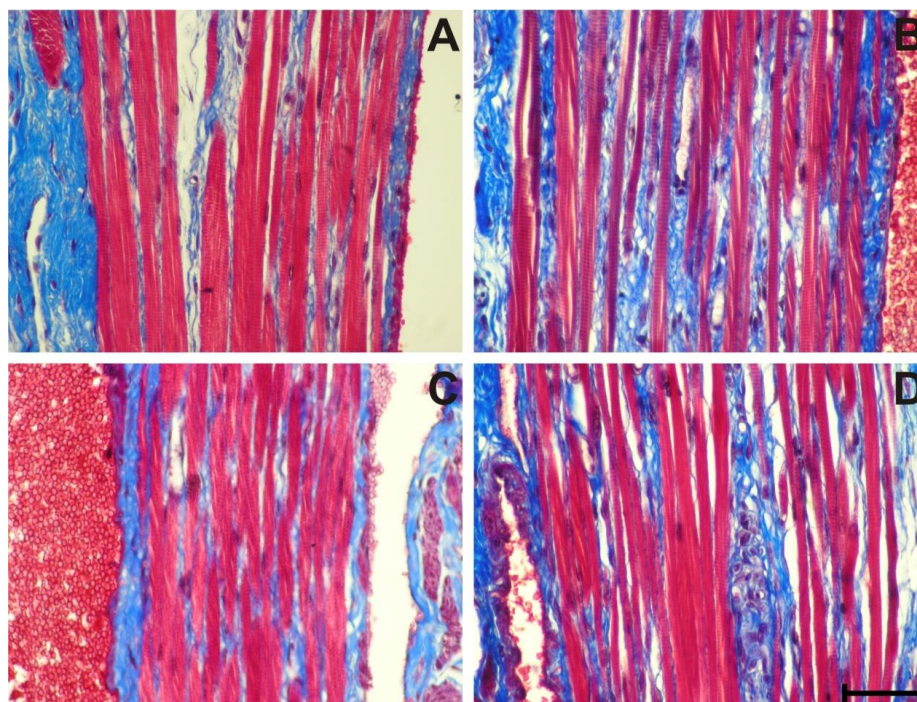
**Gráfica 12.** Diámetro de las fibras de músculo estriado en la capa muscular externa de la vagina pélvica en conejas: virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la media  $\pm$  ee, ANOVA,  $P=0.2203$ ,  $n=6$ .

Además del diámetro de las fibras, se analizó el número de fibras de músculo estriado por campo. Los resultados demuestran que las conejas de grupo virgen tienen en promedio  $16.74 \pm 1.5$  fibras por campo, las conejas gestantes a término presentan un  $16.88 \pm 0.7$ , después del parto presentan  $17.33 \pm 0.9$  y  $15.73 \pm 1.2$  fibras por campo a los 3 y 20 días posparto, respectivamente (Gráfica 13). Los datos fueron analizados mediante una ANOVA, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las condiciones experimentales y el grupo virgen,  $P=0.7921$ .



**Gráfica 13.** Número de fibras de músculo estriado en la capa muscular externa de la vagina pélvica en conejas: virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la media  $\pm$  ee,  $P=0.7921$ .

A continuación se observa una imagen representativa del músculo estriado en la capa externa de la pared vaginal en conejas vírgenes de 7 meses de edad, durante la gestación a término, y en el periodo posparto (3 y 20 días posparto). Se puede observar fibras de musculatura estriada en color rojo, rodeados por fibras el colágeno en color azul y en las regiones laterales vasos sanguíneos (Figura 11).



**Figura 11.** Capa muscular externa (músculo estriado) en la vagina pélvica en conejas: virgen (A), gestante (B), primípara 3 días posparto (C) y primípara 20 días posparto (D), teñidas con Tricrómica de Masson, barra 50  $\mu$ m.

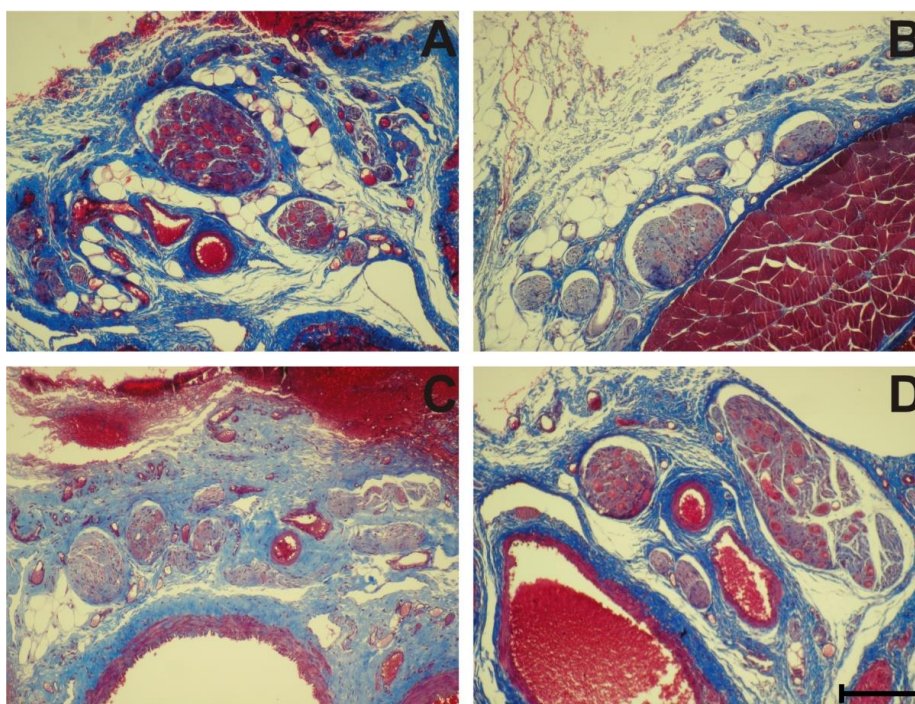
Se evaluó si las fibras de músculo estriado que corren de manera circular alrededor de la vagina y uretra son cortas o largas. En conejas vírgenes se observa que existe la misma proporción de fibras cortas y largas, mientras que en las conejas gestantes a término presentan mayor proporción de fibras largas (66%) que cortas (33%), en tanto que, conejas en el período posparto temprano y tardío, presentan mayor proporción de fibras cortas (66%) que largas (33%). Estos resultados son estadísticamente significativos, se analizaron mediante una Chi-cuadrada,  $P=0.0395$  (tabla 6).

Longitud de las fibras de músculo estriado				
Longitud	V	G	P3	P20
a) Cortas	3/6 (50%)	4/6 (66%)	2/6 (33%)*	2/6 (33%)*
b) Largas	3/6 (50%)	2/6 (33%)	4/6 (66%)	4/6 (66%)

Tabla 6. Virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la frecuencia observada, Analizado mediante, \* $P=0.039$  con respecto al grupo V.

## 7.6 Descripción histológica de los ganglios paravaginales en región pélvica de la coneja

En la pared de la vagina pélvica (dorso-lateral) se encuentran adosados varios ganglios y nervios. Para su análisis histológico se evaluó el área total y número de las estructuras observadas por campo, así como, el número y área de neuronas contenidas en dichos ganglios por campo. Además, se evaluó la expresión de neurotransmisores en las neuronas mediante ChAT y TH. Así como, la sensibilidad estrogénica a través de los receptores de estrógenos ( $\alpha$  y  $\beta$ ). A continuación se presentan los resultados de la evaluación histológica y posteriormente la expresión de neurotransmisores y la sensibilidad estrogénica.

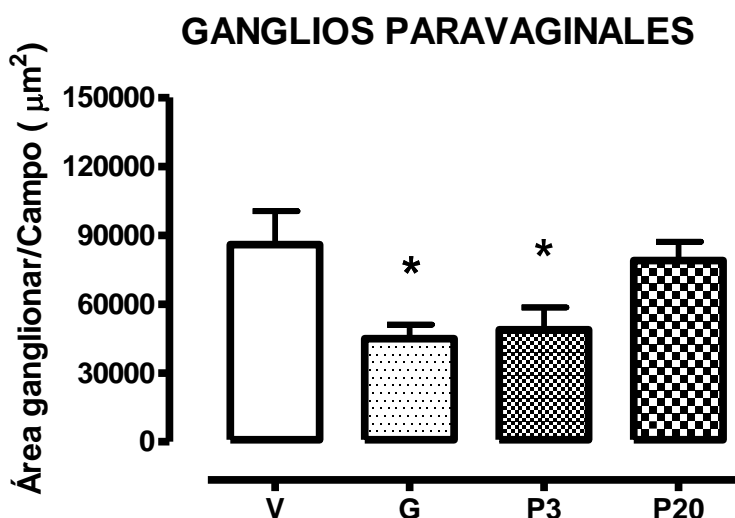


**Figura 12.** Ganglio paravaginal en la coneja del grupo virgen (A), gestante (B), primípara 3 días posparto (C) y primípara 20 días posparto (D). Barra 200  $\mu\text{m}$ .

### 7.6.1 Área ganglionar

Al analizar los campos donde se apreciaban mayor número de ganglios, se observó una disminución en el área total ganglionar por campo durante la gestación a término y en el periodo posparto temprano con respecto del grupo virgen (Figura 12). Sin embargo, 20 días posparto este efecto se restablece y se observa un área ganglionar por campo similar a la observada en conejas vírgenes. Se cuantificó el área ganglionar total por campo, en conejas vírgenes se observó que es de  $85948 \pm 14604 \mu\text{m}^2$ , mientras que en conejas gestantes a término

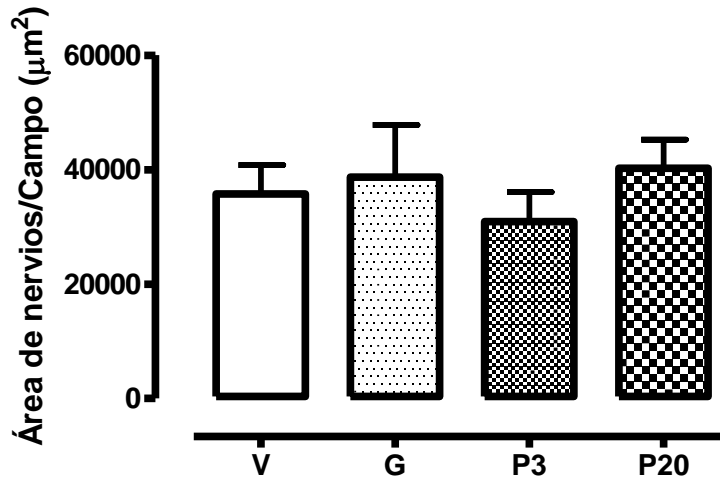
y primíparas 3 días posparto se observa un área de  $45102 \pm 7450 \mu\text{m}^2$  y  $48811 \pm 9686 \mu\text{m}^2$ , respectivamente. Lo que representa una disminución de 47.52%, para el grupo gestante a término, estadísticamente significativo con respecto al grupo virgen (Gráfica 14). Mientras que para el grupo 3 días posparto representa una disminución de 43.2% con respecto al grupo virgen, La disminución en el área total ganglionar se restableció 20 días posparto, mostrando un área de  $78950 \pm 8244 \mu\text{m}^2/\text{campo}$ .



**Gráfica 14.** Área ganglionar total por campo en la vagina pélvica en conejas: virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la media  $\pm$  ee, \* $P=0.0187$  con respecto del grupo V.

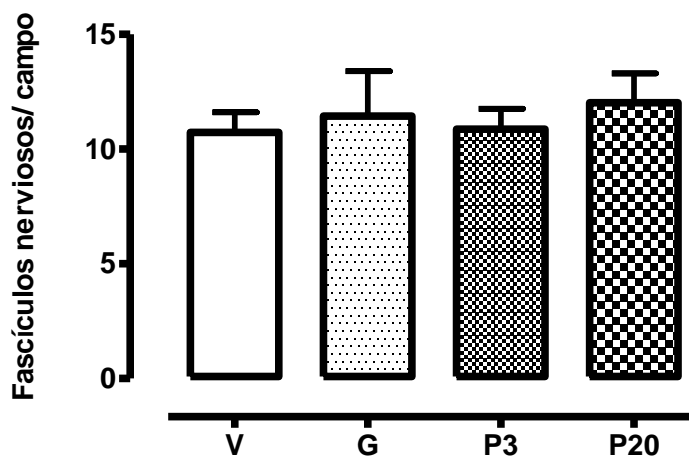
Se registró el área total de los fascículos nerviosos por campo, en conejas vírgenes se obtuvo un área de  $35749 \pm 5045 \mu\text{m}^2$ , durante la gestación a término se contabilizó un área de  $38706 \pm 9113 \mu\text{m}^2$ , en el período posparto se registró un área de  $30907 \pm 5181 \mu\text{m}^2$  y  $40242 \pm 5019 \mu\text{m}^2$  en el día 3 y 20 días después del parto (Gráfica 15). Los datos obtenidos del área de fascículos nerviosos por campo entre los grupos experimentales no muestran diferencias estadísticamente significativa con respecto del grupo virgen, mediante una prueba de ANOVA,  $P=0.74$ .





**Gráfica 15.** Área de fascículos nerviosos paravaginales totales por campo en conejas: virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la media  $\pm$  ee,  $P=0.74$ .

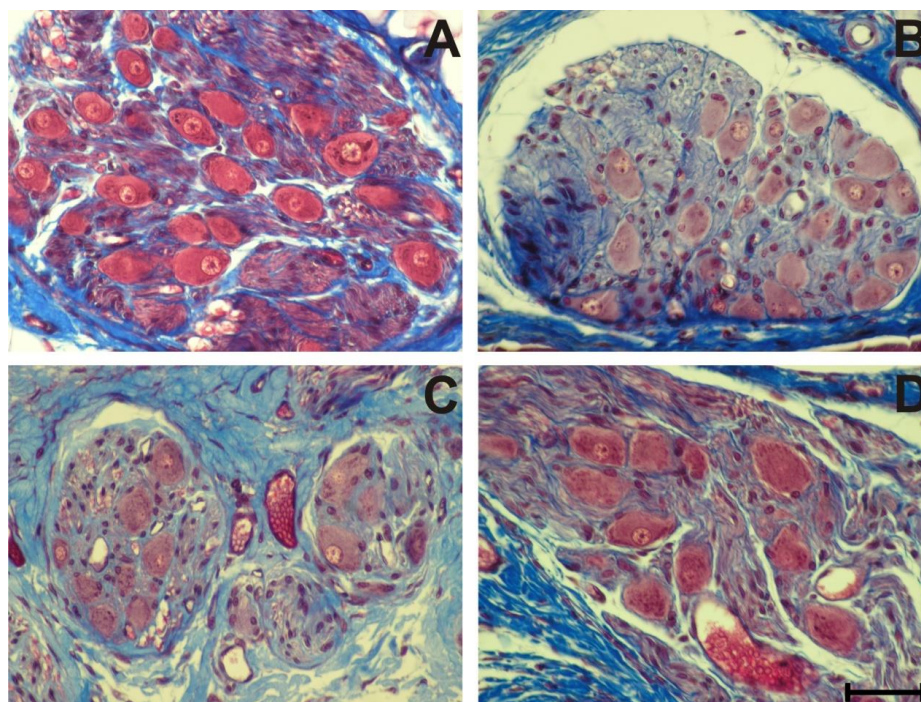
Además de la evaluación del área total de fascículos nerviosos por campo, se cuantificó el número de estas estructuras por campo. En conejas vírgenes se evaluó un  $10.73 \pm 0.9$  fascículos por campo, durante la gestación a término se encontró  $11.43 \pm 1.9$ , en el período posparto se cuantificó  $10.87 \pm 0.9$  y  $12.03 \pm 1.3$  en los días 3 y 20 después del parto (Gráfica 16). El análisis estadístico reveló que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales con respecto al grupo virgen, mediante una prueba de ANOVA  $P=0.8965$ .



**Gráfica 16.** Número de fascículos nerviosos paravaginales en conejas: virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la media  $\pm$  ee,  $P=0.8965$ .

### 7.6.2 Descripción histológica de las neuronas en los ganglios paravaginales

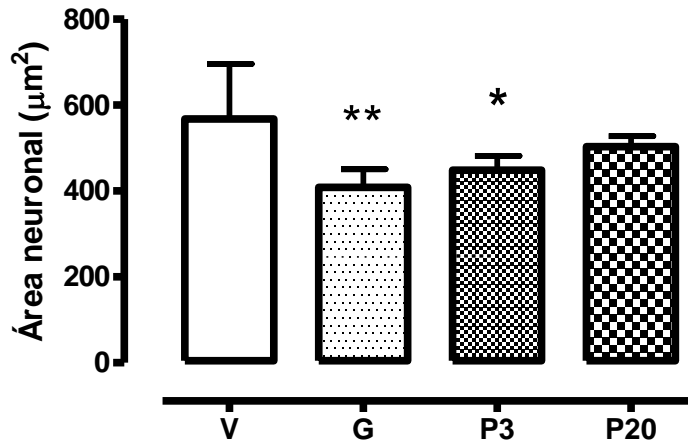
Por medio de la tinción Tricrómica de Masson es posible observar el soma de las neuronas de color rosa, el núcleo traslucido y el nucléolo de color púrpura (Figura 13). La evaluación morfológica de las neuronas contenidas en los ganglios paravaginales mostró un citoplasma basófilo (cuerpos de Nissl) y en algunas neuronas se puede apreciar un núcleo con cromatina laxa y conteniendo uno o dos nucléolos centrales.



**Figura 13.** Ganglio paravaginal en vagina pélvica en la coneja del grupo virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Barra 50  $\mu\text{m}$ .

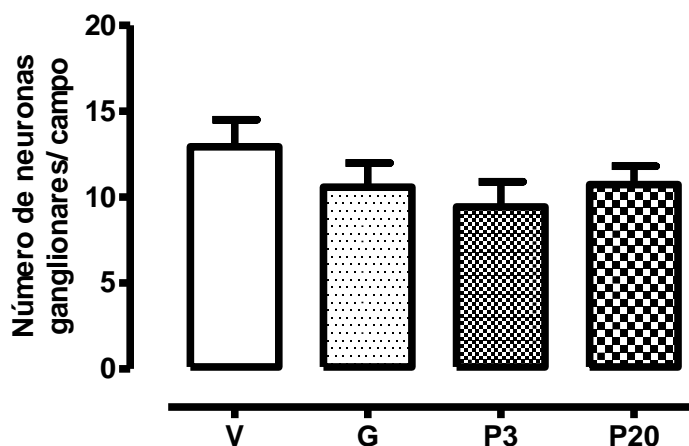
Se evaluó el área del soma de todas las neuronas, en las cuales se distinguiera el núcleo. El área del soma en conejas vírgenes es de  $567.7 \pm 49.7 \mu\text{m}^2$ , mientras que en conejas gestantes a término, disminuyó a  $408.2 \pm 16.7 \mu\text{m}^2$ . Lo que significa un decremento en el área neuronal de 28% con respecto de conejas vírgenes, estadísticamente significativo (Gráfica 17). Durante el período posparto, 3 días después del parto se registró un área de  $448.3 \pm 33.3 \mu\text{m}^2$ , representando una disminución de 21%, con respecto del grupo virgen, estadísticamente significativo. Finalmente, en conejas evaluadas 20 días después del parto, se encontró que el

soma de las neuronas tiene un área de  $503.2 \pm 9.7 \mu\text{m}^2$ , sin diferencia estadísticamente significativa con respecto del grupo virgen. Los datos fueron analizados mediante una prueba de ANOVA,  $P=0.0108/F=4.847$  y una prueba *post hoc*, Neuman-Keuls.



**Gráfica 17.** Área del soma de las neuronas de los ganglios paravaginales de conejas: virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la media  $\pm$  ee,  $**P=0.0032$  con respecto del grupo virgen, ( $F=4.847$ ).

Además del área se cuantificó el número de neuronas contenidas en los ganglios por campo. Se observó que las conejas vírgenes presentan  $12.94 \pm 1.6$  neuronas/campo, durante la gestación a término se encontraron  $10.58 \pm 1.4$  neuronas/campo. En el periodo posparto se registraron  $9.442 \pm 1.4$  y  $10.73 \pm 1.1$  neuronas/campo, durante el día 3 y 20 después del parto, respectivamente. Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA,  $P=0.3690$ , la cual mostró que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales respecto del grupo virgen (Gráfica 18).



**Gráfica 18.** Número de neuronas totales en los ganglios de conejas: virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Los datos representan la media  $\pm$  ee,  $P=0.3690$ .

## 7.7. Neuroquímica ganglionar

### 7.7.1. $\beta$ -tubulina III

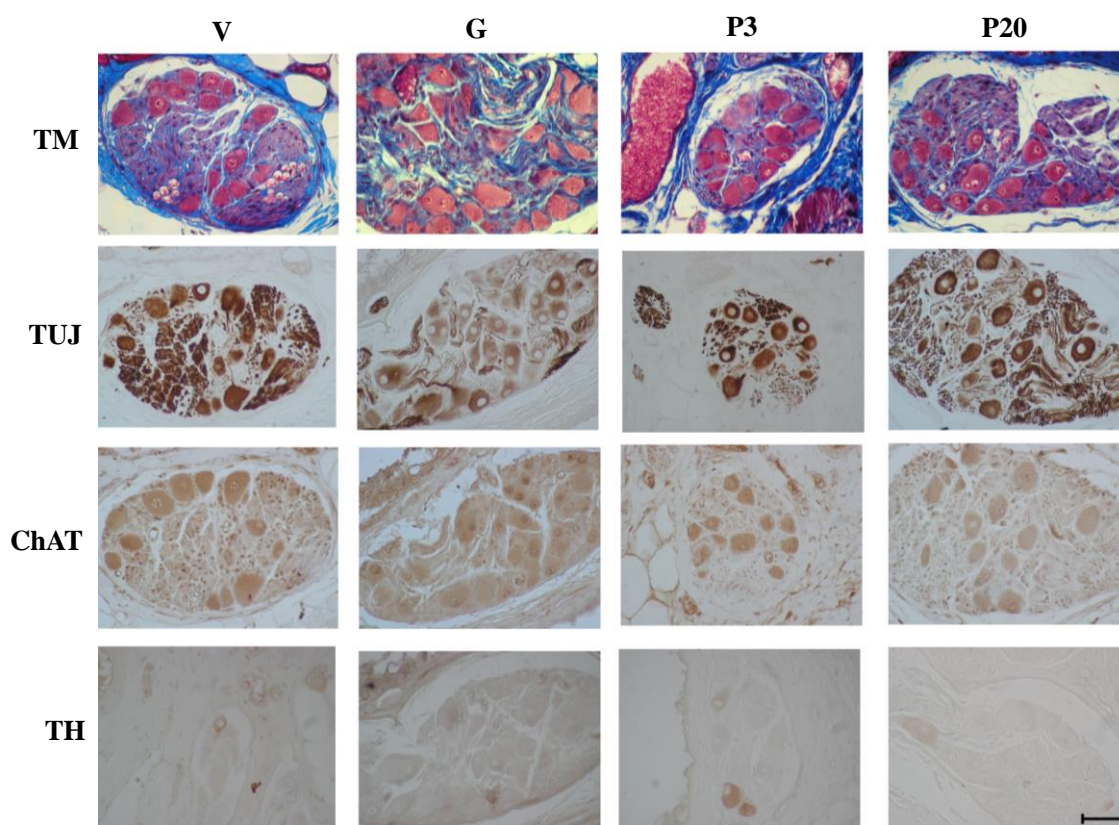
La identificación de la inervación en el tejido vaginal y paravaginal se realizó mediante la inmunorreactividad positiva para anti-  $\beta$ -tubulina III (Figura 14). Con este marcaje se identificó somas, y sus prolongaciones dendríticas, así como, fascículos nerviosos en el tejido paravaginal. Cualitativamente, se observó con mayor frecuencia contactos entre las dendritas y somas en conejas del grupo gestante con respecto al resto de los grupos. En la pared vaginal también fue posible apreciar algunas prolongaciones dendríticas entre los paquetes de musculatura lisa y estriada.

### 7.7.2. Acetilcolintransferasa

Se evaluó al neurotransmisor acetilcolina mediante la técnica de inmunohistoquímica contra acetilcolintransferasa (ChAT; Figura 14). Se identificó inmunorreactividad en los somas de las neuronas contenidas en estos ganglios paravaginales, en todos los grupos (Figura 6). Cualitativamente, se observó una menor inmunorreactividad anti-ChAT en los ganglios de conejas gestantes a término con respecto del número de células observadas en el grupo virgen.

### 7.7.3. *Tirosina hidroxilasa*

En la evaluación de tirosina hidroxilasa (TH) en los ganglios paravaginales mostró pocas neuronas y nervios inmunorreactivos (Figura 14). En conejas vírgenes se observó alrededor de una o dos neuronas por corte. Mientras que en conejas gestantes se observó una evidente disminución de neuronas inmunorreactivas, solo se observaron en dos individuos de las 6 conejas que componen a este grupo. Este efecto parece recuperarse en el período posparto, encontrándose inmunoreactividad a TH, similar a lo observado en el grupo virgen.



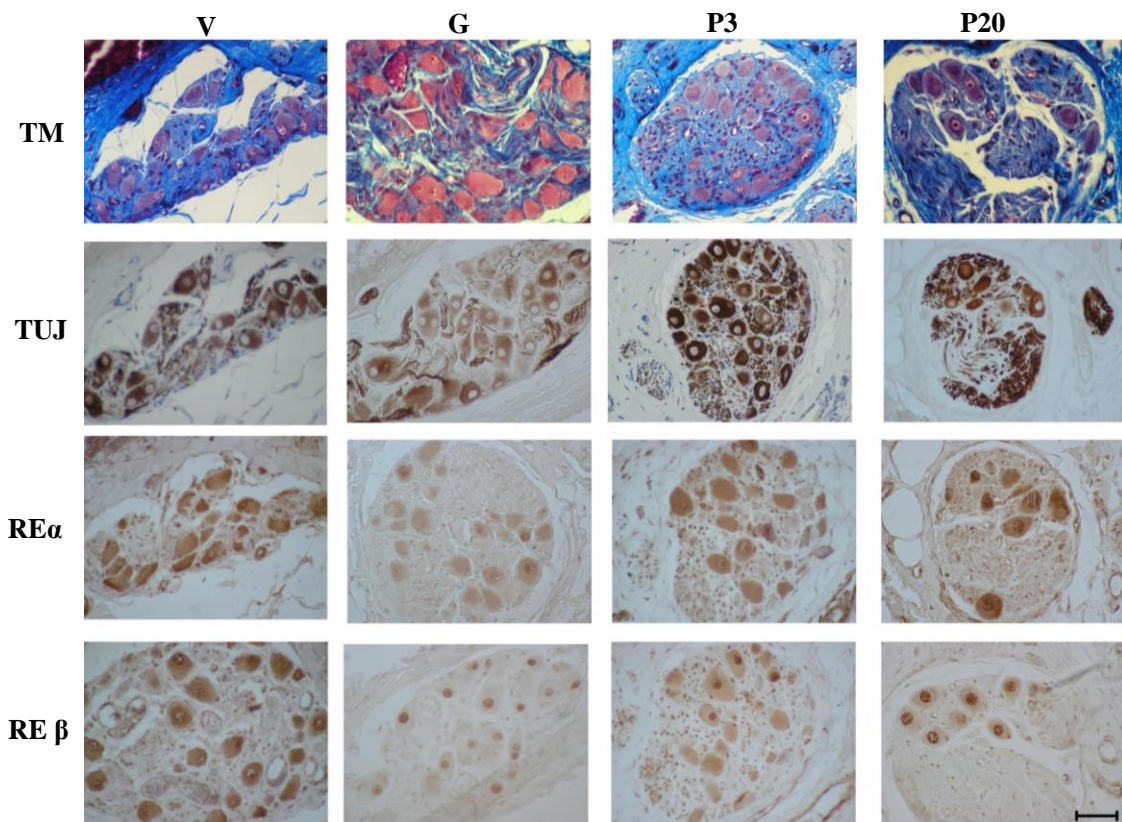
**Figura 14.** Inmunohistoquímica contra  $\beta$ -tubulina III (TUJ), acetilcolintransferasa (ChAT) y tirosina hidroxilasa (TH); además, el mismo ganglio mediante la tinción de Tricrómica de Masson (TM) en el ganglio paravaginal en la coneja del grupo virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Barra 50  $\mu$ m.

### 7.8. *Receptor de estrógenos $\alpha$ y $\beta$*

La expresión de los subtipos  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor de estrógenos fue evaluada en los ganglios paravaginales (Figura 15). Se observó inmunoreactividad en los somas y núcleos



neuronal, así como en la pared de los vasos sanguíneos y fibroblastos. En los ganglios paravaginales de conejas vírgenes, las neuronas muestran un mayor marcaje inmunorreactivo del RE  $\alpha$  en el soma que del receptor beta. Sin embargo, el marcaje inmunorreactivo del RE beta se encuentra mayoritariamente en los núcleos de las neuronas. Con respecto al RE  $\alpha$ , se observa una menor inmunorreactividad en el grupo gestante a término con respecto del grupo virgen. En el período posparto este efecto es restableció, mostrando una inmunorreactividad similar a la del grupo virgen. En el caso del RE beta se observa menor inmunorreactividad en el grupo gestante a término. Este efecto se mantiene durante la el período posparto temprano (3 días posparto) con respecto del grupo virgen. Sin embargo, se restablece la inmunorreactividad en el 20 posparto, similar al observado en el grupo virgen.



**Figura 15.** Inmunohistoquímica contra  $\beta$ -tubulina III (TUJ), Receptor de estrógenos alfa (RE  $\alpha$ ) y Receptor de estrógenos beta (RE  $\beta$ ); además, el mismo ganglio mediante la tinción de Tricrómica de Masson (TM) en el ganglio paravaginal en la coneja del grupo virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20). Barra, 50  $\mu$ m.

## 8. Discusión

### 8.1. *Características histológicas de la pared vaginal en la región pélvica*

En varias especies de mamíferos se ha descrito que la vagina, por su histología, está compuesta por cuatro capas: epitelial, submucosa, muscular (músculo liso) y adventicia (Alexander y cols. 2004; Daucher y cols. 2007; Rodríguez-Antolín y cols. 2009). En conejas multíparas sólo se reconocen tres de estas capas: epitelial, muscular (músculo liso) y adventicia (Xelhuantzi, 2006). Puesto que, se entremezclan los componentes de la capa submucosa y la capa muscular (intermedia). De forma similar se observa en conejas jóvenes ovariectomizadas, por lo que se han descrito las características histológicas de la pared vaginal englobadas en las capas: mucosa, intermedia (músculo liso) y externa (Ramírez-Corona, 2012). Estos resultados sugieren que además de los efectos observados sobre la histología vaginal debida a la experiencia reproductiva (multiparidad), también existen otros cambios debidos a los niveles hormonales (ovariectomía). En la región pélvica del conducto vaginal de las conejas gestantes y primíparas 3 días posparto no se logra diferenciar la capa submucosa de la capa muscular como en la coneja virgen. Este resultado es similar a lo observado en conejas multíparas y ovariectomizadas, por lo que sólo se evaluó el espesor de las capas mucosa, interna y externa en todos los grupos. Lo cual sugiere que estos cambios histológicos deben estar asociados a la función que desempeña cada uno de estos componentes en cada capa. En conejas primíparas evaluadas 20 días posparto, se observan características histológicas semejantes a las observadas en conejas vírgenes. Esto sugiere que la fisiología vaginal se restablece después del primer parto y que los cambios observados antes del parto podrían ser un mecanismo adaptativo que preparan el tejido para disminuir afectaciones generadas durante la distensión vaginal en el parto. Sin embargo los efectos observados en los modelos de multiparidad y ovariectomía no son iguales en cada una de las capas analizadas. Por lo cual se evaluaron varias características histológicas en cada capa, como se muestra a continuación.

### 8.2. *Espesor de la capa mucosa en la pared vaginal*

Múltiples investigaciones indican que los estrógenos promueven la proliferación epitelial en la vagina de varias especies de mamíferos. En mujeres, se ha evidenciado que los receptores

de estrógenos en el epitelio vaginal varían a lo largo del ciclo menstrual, mientras que en células del estroma se exhibe consistentemente receptores nucleares durante el ciclo (Gould y cols. 1983). La proliferación epitelial en órganos reproductivos es mediada por la interacción de las células del estroma con el epitelio en la capa mucosa. A través lo receptores de estrógenos tipo  $\alpha$ , los cuales median la mitogénesis (Cunha y cols. 2004). Sin embargo, en el estroma se encuentran varios receptores a hormonas como la progesterona, esta última inhibe la proliferación epitelial generada por estradiol en útero de ratón (Kurita y cols. 1998). Se ha reportado un pico en los niveles de estradiol sérico en día 30, mientras que los niveles de progesterona tienen un pico máximo en el día 20 y bajan hasta los niveles basales un día después del parto (Beyer y cols. 2007). En nuestros resultados, la coneja gestante a término no presenta proliferación epitelial en el día 30 de gestación, a pesar del incremento de los niveles séricos de estradiol. Este efecto podría ser mediado por la concentración sérica de progesterona durante la gestación que inhibe la proliferación epitelial generada por el pico en los niveles séricos de estradiol.

Por otra parte, se observó que al final de la gestación el epitelio es de tipo cúbico y no hay la presencia del de tipo cilíndrico. Mientras que en la coneja joven intacta se ha reportado que existen varios tipos de epitelio en cada región del conducto vaginal, en la región pélvica se observa epitelio cilíndrico (Xelhuanzi 2006; Rodríguez-Antolín y cols. 2009; Ramírez-Corona 2011). Por lo que sugerimos que la secreción vaginal disminuye durante la gestación a término en la coneja. Tal como se ha observado durante la ovariectomía en conejas, esta última disminuye la actividad secretora del epitelio, la lubricación y causa atrofia vaginal, pero la administración con estrógenos revierte este efecto (Min 2004). Además, las anfractuosidades aumentan en la pared vaginal 3 días posparto, este último resultado se asocia al parto, probablemente como consecuencia de la distensión vaginal durante la expulsión de las crías. En conejas vírgenes la relación del perímetro del lumen uretral respecto del perímetro del lumen vaginal es cercana a 1. Sin embargo, durante la gestación el lumen uretral se hace más grande. Después del parto, se observa que el perímetro del lumen vaginal aumenta con respecto del grupo virgen y gestante, lo que se refleja en una disminución de la relación del lumen uretral respecto al vaginal. Estos datos podrían relacionarse a la presencia de incontinencia urinaria durante la gestación y después del parto



en mujeres. Por lo que, sería interesante evaluar la función de la expulsión de la orina y patrones de micción durante la gestación.

### 8.3. *Proporción y características histológicas del músculo liso y colágeno capa interna en la pared vaginal*

Varios trabajos han mostrado afectaciones en órganos pélvicos debidos al trauma vaginal y a la disminución de niveles hormonales. En el modelo de distensión vaginal (dilatación de globo intravaginal) después de la ovariectomía en rata ha mostrado un incremento del contenido de colágeno y disminución de la capa muscular (Resplande y cols. 2002). Sin embargo este modelo conjunta dos variables, el factor mecánico producto de la distensión vaginal y el factor hormonal debida a la ovariectomía. En contraste, los resultados obtenidos en conejas gestantes a término y primíparas no demuestran diferencias estadísticamente significativas en el contenido de colágeno y musculatura lisa en la capa intermedia. Lo cual, podría sugerir un mecanismo adaptativo en la función que desempeñan estos componentes tisulares para evitar el daño provocado por la cría durante su paso por el canal de parto. Se ha reportado que durante la gestación en ratón, el porcentaje de colágeno incrementado es estimulado por la relaxina y se propone como un mecanismo que antecede al parto (Zhao y cols. 1998). En los resultados no se observan diferencias respecto a la proporción de colágeno, sin embargo no se descarta la posibilidad de que desempeñe una función diferente durante la gestación y el parto. Esto último debido a que se ha descrito que en la gestación aumenta la capacidad de distensión vaginal como un mecanismo de adaptación maternal (Alperin y cols. 2010). Los cambios observados en la intensidad de la coloración de las fibras de colágeno en la tinción de los grupos gestante a término y primíparas, puede significar un cambio en el tipo de colágeno. Además de manera cualitativa se identificó que en la gestación y el parto modifica la distribución de fibras de colágeno, se observa con mayor frecuencia fibras compactadas en regiones. También se ha descrito que en la gestación disminuye el área de las fibras de colágeno en rata (Daucher y cols. 2007). Estos cambios histológicos pueden significar un mecanismo preventivo durante la gestación para evitar un daño durante la distensión vaginal generada por el parto.

En la rata, se ha observado una disminución en la fuerza de contracción de musculatura lisa en la vagina durante la gestación, pero un incremento hacia el final de esta. El recambio del fenotipo de estas fibras musculares hace suponer una adaptación de las propiedades biomecánicas durante la gestación (Feola y cols. 2011). Además se ha observado que el fenotipo de las células de músculo liso de la vagina en rata es transformado de contráctil a sintético. En el periodo posparto tardío estas características se observan similares a las observadas antes de la gestación (Daucher y cols. 2007). En nuestro trabajo, la evaluación de musculatura lisa no se muestra diferencias estadísticamente significativas en la proporción de musculatura lisa, esto no implica que la función de dichas fibras no se modifique. En ratas ovariectomizadas restituidas con estradiol se observa la restauración de las propiedades biomecánicas respecto de las ovariectomizadas, lo que implica un efecto hormonal sobre la función de estas fibras (Moalli y cols. 2008).

#### *8.4. Proporción y características histológicas del músculo estriado y colágeno capa externa en la pared vaginal*

El espesor de la capa externa de la pared vaginal de conejas gestantes a término y primíparas no muestra diferencias estadísticamente significativas. En conejas jóvenes multíparas se ha mostrado la reducción del espesor de todas las capas, así como el espesor total de la pared de la vagina pélvica (Xelhuanzi 2006). Esto sugiere que el efecto observado en conejas multíparas es producido por las múltiples experiencias reproductivas (cuatro partos). Se sugiere que un período de recuperación entre las gestaciones en el modelo de multiparidad permitiría la recuperación de las características histológicas y funcionales de la vagina. Sí bien se ha descrito que la recuperación de los órganos y fascias en la cavidad pélvica después del parto no es total (Delancey y cols. 2007), es probable que en la coneja el periodo de recuperación entre las gestaciones sea fundamental.

En conejas vírgenes, la capa externa de la vagina (región pélvica) se compone por un plexo sanguíneo, tejido conectivo y una fina capa de musculatura estriada. Estas fibras de músculo estriado que rodean a la vagina (y uretra antes de la desembocadura) se encuentran orientadas de forma circular. Estas fibras forman parte del denominado rabdoesfinter. En conejas gestantes a término, además de estas fibras se observan otras de músculo estriado

justo en región de la desembocadura de la uretra, éstas corren de manera longitudinal en la zona cercana a los ganglios paravaginales. Este músculo también se observa en conejas vírgenes pero su presencia a la altura de la desembocadura de la uretra es vestigial. Por lo que sugerimos que el desarrollo de este músculo estriado en pared de la vagina podría disminuir la longitud de la misma durante la expulsión de las crías. Además, se sugiere que está implicado en el mantenimiento de la pared vaginal, al funcionar como una estructura de sostén y evitar el desgarre de la pared vaginal.

A pesar de que las hormonas gonadales también tienen un efecto sobre el flujo sanguíneo vaginal. Como se ha mostrado en el modelo de ovariectomía en coneja, donde se observa que el flujo sanguíneo vaginal disminuye después de la estimulación del nervio pélvico, mientras que el tratamiento con estradiol revierte este efecto. En nuestros resultados no se observaron cambios significativos en la organización histológica de los vasos sanguíneos de la capa externa en los grupos experimentales con respecto del grupo control. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que el flujo sanguíneo aumente durante la gestación debido a los cambios hormonales evitando así la isquemia tisular debida al parto. Como se observa en el modelo de trauma vaginal en rata, donde se muestra que la distensión vaginal genera isquemia en el epitelio y músculo liso de la vagina y uretral (Damaser y col. 2004). Por otra parte, se ha sugerido que la reducción de la inervación simpática hacia el final de la gestación podría incrementar el flujo sanguíneo protegiendo al tejido vaginal durante los episodios de isquemia provocados por la compresión vascular asociada al parto (Liao y Smith 2011).

#### 8.5. *Descripción histológica y comunicación química de los ganglios, nervios y neuronas en el tejido paravaginal en región pélvica de la coneja*

En mujeres el plexo pélvico esta inervado por el nervio hipogástrico, el nervio esplácnico y el nervio pélvico (Takeda y col. 2005). Clásicamente el nervio esplácnico contiene fibras parasimpáticas presinápticas, mientras que el nervio hipogástrico contiene fibras simpáticas. De acuerdo con el clásico entendimiento de la distribución de los ganglios autonómicos pélvicos en humanos, las células ganglionares parasimpáticas son localizadas cerca de las vísceras pélvicas en el plexo pélvico, mientras que las células simpáticas ganglionares están

presentes en los troncos lumbares y sacros (Butter-Manuel y col. 2002). Además se ha reportado una comunicación química diferencial. Las neuronas simpáticas usualmente son positivas a TH, mientras que los parasimpáticos son positivos a acetilcolina. Recientes trabajos proveen dudas sobre el concepto clásico de la distribución de los ganglios. Se han co-localizado fibras simpáticas y parasimpáticas en el nervio esplácnico que corren en el último ligamento del útero-sacral (Butter-Manuel y col. 2002). De manera similar, se han encontrado la co-localización de neuronas simpáticas y parasimpáticas (positivas a TH y a AChT) en los ganglios paravaginales en coneja (Castelán, en prensa). Por lo que, podemos considerar a la coneja como un modelo representativo de la interacción de estos dos sistemas en un mismo ganglio. En nuestros resultados, se observa que antes del parto la presencia de neuronas inmunorreactivas a TH es menor, lo cual podría estar relacionado con la disminución de la sensibilidad al dolor durante el parto.

En rata se ha descrito que la inervación de la vagina proviene de los ganglios de la raíz dorsal L6 y S1. La región media de la vagina a través del nervio pélvico, la región rostral por nervio hipogástrico (Berkley y cols. 1993) y la región caudal por el nervio pudendo. La función de diferentes fibras aferentes en el mismo órgano está determinada por el territorio que inervan y las propiedades de respuesta (sensoriales). En la coneja se sugiere que la inervación de la vagina pélvica proveniente de la anastomosis de las fibras S2 y S3 se ramifica en múltiples nervios que llegan a los ganglios paravaginales (López 2011). Se han localizado varias estructuras ganglionares adosadas a la pared vaginal, similar a las estructuras ganglionares intramurales observadas en la mujer. Debido a que sólo en la región pélvica se observan estructuras ganglionares adosadas a la pared vaginal, y a la estructura rígida en que se encuentran (pelvis), el efecto del paso de la cría por el canal de parto se ha evidenciado.

Durante el parto se ha observado que la neuroectomía del nervio pélvico interfiere con el reflejo de expulsión del feto (Burden y cols. 1990), mientras que la neuroectomía del nervio hipogástrico atenúa la analgesia en el parto inducida por el embarazo (Cunningham, 1991). En rata se ha caracterizado una reducción de la inervación de la vagina en roedores gestantes a término, la pérdida de axones autonómicos y sensoriales probablemente contribuyen a un mecanismo adaptativo asociado al parto (Liao y Smith 2011). De esta manera contribuyen a la relajación del tono muscular (músculo liso), alteración el flujo sanguíneo y disminución de la sensibilidad al dolor durante el parto. En nuestros resultados

se puede observar una disminución en el área de ganglios por campo y el área del soma neuronal, el número de neuronas por campo se mantiene en la misma cantidad que el grupo virgen. Esto nos sugiere un mecanismo de adaptación que precede al parto, sin embargo, no podemos establecer cuál es el mecanismo mediante el cual genera la reducción de la inervación.

#### 8.6. *Expresión de receptores de estrógenos alfa y beta en neuronas ganglionares en el tejido paravaginal*

Los ganglios paravaginales en la coneja poseen receptores de estrógenos  $\alpha$ , beta (Xelhuanzi y col. 2006) y NOS neuronal que modulan su expresión y actividad con la deficiencia de estrógenos (Yoon y col. 2001; Batra y Al-Hijji, 1998). Los datos del área del soma muestran una disminución en el grupo gestante a término. Esto sugiere que el tamaño neuronal está asociado a los cambios hormonales durante la gestación. Es posible que exista un mecanismo entre los niveles de estradiol y la disminución de intensidad de los receptores de estrógenos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) durante la gestación a término. Durante la gestación a término parece que la neuro-modulación se desarrolla mediante una compleja interacción entre la sensibilidad de los receptores de estrógenos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) que las neuronas presentan y su comunicación química. Diversos trabajos reportan que la ovariectomía disminuye el soma de las motoneuronas (L6 y S1) en la rata. Este efecto es revertido con la administración de estradiol y no con la administración de progesterona en rata (Romero-Cuevas, 2011). Este hallazgo ha sido asociado a la presencia de espinas dendríticas, como se ha observado en el SNC después de la administración de estrógenos en ratas ovariectomizadas, en las cuales se promueve la receptividad sexual (Christensen A y cols. 2011). Además se ha asociado la señalización rápida a través de receptores de estrógenos  $\alpha$  con receptores de glutamato metabotrópicos en los ganglios de la raíz dorsal de L1 y S3 en rata (Chaban V y cols. 2011). Lo que sugiere que el estradiol regula la actividad excitatoria y el número de sinapsis mediando la comunicación neuronal y posiblemente señales nociceptoras como el dolor. Por otra parte, se ha mostrado que los estrógenos participan en las dimensiones de las ramas sensoriales genitales. Se ha observado que la ovariectomía disminuye la longitud del

nervio clitoral que emerge del nervio pudendo en la rata. Este efecto es revertido mediante la administración de estradiol y alcanza una longitud similar a la de ratas intactas (Komisaruk, 1981). Por otro lado, en neuronas del núcleo grácil (ubicado en el límite entre la médula y el bulbo) se ha observado que la ovariectomía aumenta la respuesta excitatoria generada por la distensión vaginal y esta respuesta excitatoria disminuye con el tratamiento de estradiol en concentraciones fisiológicas. Por lo que se ha propuesto que las fibras del nervio pudendo podrían proyectarse desde el núcleo grácil y expresan receptores de estrógenos (Bradshaw H.B. y cols. 2003). Se ha demostrado que la administración subcutánea de progesterona es capaz de atenuar la pérdida neuronal en el núcleo motor del hipogloso y facial por transección unilateral de los nervios hipoglosal y facial. En este trabajo, no se esclarece si la progesterona es efectiva por sí sola, o si es convertida enzimáticamente a testosterona o estradiol y éstas últimas efectúan la sobrevivencia neuronal. Sin embargo, deja en claro que las respuestas diferenciales de pérdida neuronal en los núcleos motores se deben a la dosis de progesterona administrada, así como también al contenido de receptor en dichos núcleos (Yu W-H. A. 1989). Por lo que, se sugiere que los cambios hormonales (estradiol, progesterona y testosterona) durante la gestación modifican el metabolismo de las neuronas de los ganglios paravaginales y con ello su tamaño celular.

#### 8.7. *Implicaciones de la inervación y la función epitelial y muscular en la vagina*

El músculo liso de la vagina está ricamente inervado por axones simpáticos noradrenérgicos con TH inmunoreactiva, predominantemente derivados de los ganglios de las últimas lumbares y sacras y a través del nervio hipogástrico (Ting y cols. 2004, Giraldi y cols. 2002). Contradictoriamente se observaron pocos nervios y neuronas inmunorreactivas a TH en los ganglios adosados a la pared vaginal en la región próxima a la desembocadura de la uretra. En la rata se ha descrito que las células de músculo liso en la vagina son reguladas por el sistema adrenérgico y colinérgico (Giraldi y cols. 2002). El músculo liso es controlado por el sistema nervioso periférico. En la coneja se ha descrito que la inervación de los ganglios paravaginales es de tipo colinérgica y adrenérgica (Xelhuanzi 2006). Las hormonas como el estradiol también contribuyen a la contracción de los órganos reproductores mediante varios mecanismos. Uno de ellos es a través del incremento en la síntesis de óxido nítrico por un

aumento en la presencia y/o actividad de las sintetasas del óxido nítrico (NOS), como se ha observado durante la ovariectomía en la vagina de coneja. Además, la administración de estradiol después de la ovariectomía regula hacia abajo la expresión de las NOS (Yoon NH. Y cols. 2001), lo cual podría promover la contracción y relajación del músculo liso arterial y vaginal. Funcionalmente, se ha observado que la ovariectomía disminuye el flujo sanguíneo intra-cavernoso de la vagina después de la estimulación del nervio pélvico (10 V, 8 ms), sin embargo, se recupera cuando se administra estradiol en concentraciones suprafisiológicas (Park K y cols. 2001). Los resultados muestran una modulación en la inervación de estos ganglios. En la coneja, se observa una disminución en el marcaje contra ChAT hacia el final de la gestación. En la coneja 20 días posparto el marcaje tiende a aparecer aunque con menor intensidad que en el grupo virgen. Esto sugiere una modificación en el sistema colinérgico, probablemente debidos a la distensión vaginal como lo demuestran otros trabajos (Damaser y cols. 2003), En los cuales se observó la degeneración de los fascículos nerviosos que se encuentran en el esfínter externo de la uretra por distensión vaginal y denervación del nervio pudendo en rata. Por otra parte, el tono del músculo liso vaginal y arterial es controlado por receptores adrenérgicos tipos alfa-1 y alfa-2, ambos presentes en la pared vaginal de la coneja. Se ha observado que la estimulación del nervio pélvico después de la administración de antagonistas del receptor adrenérgico alfa incrementa la oxihemoglobina tisular, más alto que los niveles alcanzados durante la estimulación, lo que sugiere que los receptores adrenérgicos facilitan la relajación del músculo liso vaginal y arterial en la coneja (Kim NN y cols. 2002). En las conejas gestantes a término probablemente este efecto se podría asociar con la reducción de la contracción de la pared vaginal y facilitar la expulsión de las crías.

## **9. Conclusiones**

La gestación y la primiparidad solo modifican la distribución de los componentes tisulares en la pared vaginal, sin alterar cuantitativamente los mismos (músculo, colágenos y vasos sanguíneos). En lo que respecta a la inervación, la gestación a término y en el período posparto temprano disminuye el área neuronal y ganglionar en el tejido paravaginal. De manera cualitativa se observa menor inmunorreactividad de receptores de estrógenos alfa y beta durante la gestación a término. Sugerimos que los resultados obtenidos en la coneja gestante representan un mecanismo de adaptación que modula la fisiología vaginal. Estas adaptaciones permiten disminuir las afectaciones provocadas por la distensión vaginal generada durante el parto. Estas adaptaciones favorecen la recuperación estructural y funcional del conducto vaginal.



## 10. Perspectivas

Es evidente la participación de hormonas gonadales a través de sus receptores, los localizados en diferentes extractos celulares, que en conjunto coordinan la fisiología vaginal. Se sugiere que los estrógenos tienen un efecto relevante en la morfología y función de los ganglios paravaginales. Sin embargo, durante la gestación otros sistemas endocrinos son modificados además del sistema inmunológico, osmótico, nervioso y el muscular. Es posible que estos sistemas estén asociados a los cambios observados en la organización histológica de los ganglios paravaginales. Por tanto, se sugiere abundar en los diversos mecanismos que pueden estar implicados en la morfología y función que estos ganglios desempeñan en el tejido paravaginal durante la gestación y en el período posparto. Para ello se proponen lo siguiente:

Evaluar la actividad epitelial (secreción) después de la estimulación de la inervación pélvica asociada a los cambios hormonales durante la gestación y en el período posparto.

Evaluar la fuerza de contracción de la vagina, músculo obturador interno y esfínter externo de la uretra durante la gestación, en la expulsión de las crías y en el periodo posparto.

Evaluar la presencia de factores de crecimiento en el tejido paravaginal secretados por las células glía, y su interacción con las neuronas contenidas en dichos ganglios.

Evidenciar la presencia y actividad de canales de acuaporinas y su implicación en la regulación del tamaño neuronal, asociada a los cambios osmóticos durante la gestación.

Evidenciar y cuantificar receptores de glutamato metabotrópicos implicados en la comunicación y excitabilidad neuronal asociada a los niveles hormonales evocados durante la gestación y el parto en los ganglios paravaginales.

Describir los cambios histológicos y autonómicos de la vagina en la región abdominal durante la gestación y en el periodo posparto.

Evidenciar cambios en la ultraestructura de neuronas en los ganglios paravaginales, así como la presencia de polimorfo nucleares debida a la experiencia reproductiva.

## 11. Referencias

- 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.
- 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.
- Alperin M, Feola A, Duerr R, Moalli P, Abramowitch S (2010). Pregnancy- and delivery-induced biomechanical changes in rat vagina persist postpartum. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 21(9):1169-74. Epub 2010 Apr 28.
- Arthur P, Taggart MJ, Zielnik B, Wong S, Mitchell BF (2008). Relationship between gene expression and function of uterotonic systems in the rat during gestation, uterine activation and both term and preterm labour. *J Physiol.* 15;586(Pt 24):6063-76.
- 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.
- 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 Sci.* 62(23):2093-100.
- Beyer C, Hoffman KL, González-Flores O (2007). Neuroendocrine regulation of estrous behavior in the rabbit: similarities and differences with the rat. *Horm Behav.* Jun;52(1):2-11. Epub 2007 Apr 4. Review.
- Boyles SH, Weber AM, Meyn L. Procedures for urinary incontinence in the United States, 1979–1997. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189: 70–5.
- Brann DW, Mahesh VB (1997). Excitatory amino acids: evidence for a role in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion. *Endocr Rev.* Oct;18(5):678-700.

- 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, Kurita T, Taylor JA, Lubahn DB, Cunha GR, Cooke PS. 1998. Role of stromal and epithelial estrogen receptors in vaginal epithelial proliferation, stratification, and cornification. *Endocrinology*. Oct;139(10):4345-52.
- Burden HW, Price GT, Renegar RH, Hodson CA (1990). Effects of peripheral nerve lesions during pregnancy on parturition in rats. *Anat Embryol (Berl)*.;182(5):499-501.
- Castelán F, Xelhuanzi 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.
- Christensen A, Dewing P, Micevych P (2011). Membrane-initiated estradiol signaling induces spinogenesis required for female sexual receptivity. *J Neurosci*. Nov 30;31(48):17583-9.
- Cunha GR, Cooke PS, Kurita T (2004). Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cytol*. Dec;67(5):417-34. Review.
- Damaser MS, Broxton-King C, Ferguson C, Kim FJ, Kerns JM (2003). Functional and neuroanatomical effects of vaginal distention and pudendal nerve crush in the female rat. *J Urol*. 170(3):1027-31.
- Damaser MS, Whitbeck C, Chichester P, Levin RM (2005). Effect of vaginal distension on blood flow and hypoxia of urogenital organs of the female rat. *J Appl Physiol*. 98(5):1884-90. Epub 2004 Dec 10.
- Daucher JA, Clark KA, Stolz DB, Meyn LA, Moalli PA (2007). Adaptations of the rat vagina in pregnancy to accommodate delivery. *Obstet Gynecol*. Jan;109(1):128-35.

- Delancey JO, Kane Low L, Miller JM, Patel DA, Tumbarello JA (2008). Graphic integration of causal factors of pelvic floor disorders: an integrated life span model. *Am J Obstet Gynecol.* 199(6):610.e1-5.
- DeLancey JO, Morgan DM, Fenner DE, Kearney R, Guire K, Miller JM, Hussain H, Umek W, Hsu Y, Ashton-Miller JA (2007). Comparison of levator ani muscle defects and function in women with and without pelvic organ prolapse. *Obstet Gynecol.* Feb;109(2 Pt 1):295-302.
- Dietz HP (2004). Levator function before and after childbirth. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 44: 19–23.
- Dodd JM, Crowther CA (2010). The role of progesterone in prevention of preterm birth. *Int J Womens Health.* 9;1:73-84.
- Feola A, Moalli P, Alperin M, Duerr R, Gandley RE, Bramowitch S (2011). Impact of Pregnancy and Vaginal Delivery on the Passive and Active Mechanics of the Rat Vagina *Ann Biomed Eng.* January ; 39(1): 549–558.
- Ghatei MA, Gu J, Mulderry PK, Blank MA, Allen JM, Morrison JF, Polak JM, Bloom SR (1985). Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the female rat urogenital tract. *Peptides*; 6:809–815.
- 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.
- Gould SF, Shannon JM, Cunha GR (1983). The autoradiographic demonstration of estrogen binding in normal human cervix and vagina during the menstrual cycle, pregnancy, and the menopause. *Am J Anat.* Oct;168(2):229-38.
- Hextall A (2000). Oestrogens and lower urinary tract function. *Maturitas* 36(2): 83-92.

- 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.
- Langley J. N. and Anderson H. K. (1896). The Innervation of the Pelvic and adjoining Viscera. Part VII. Anatomical Observations. *J Physiol*. October 19; 20(4-5): 372–406.
- Jobling P (2011). Autonomic control of the urogenital tract. *Auton Neurosci*. Nov 16;165(1):113-26. doi: 10.1016/j.autneu.2010.07.004. Epub 2010 Aug 19.
- 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, Pessina MA, Munarriz R, Goldstein I, Traish AM (2004). Effects of ovariectomy and steroid hormones on vaginal smooth muscle contractility. *Int J Impot Res*. Feb;16(1):43-50.
- Komisaruk BR, Frangos E, Whipple B (2011). Hysterectomy improves sexual response? Addressing a crucial omission in the literature. *J Minim Invasive Gynecol*. May-Jun;18(3):288-95.
- Kurita T, Young P, Brody JR, Lydon JP, O'Malley BW, Cunha GR (1998). Stromal progesterone receptors mediate the inhibitory effects of progesterone on estrogen-induced uterine epithelial cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology*. Nov;139(11):4708-13.
- Liao Z, and Smith PG (2011). Adaptive Plasticity of Vaginal Innervation in Term Pregnant Rats. *Reproductive Sciences* 2011 18: 1237.

- López Juárez R (2011) Caracterización anatómica e inervación de la musculatura estriada de la pared de la vagina en la coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*). Tesis de licenciatura, Tlaxacla, México. Universidad Autónoma de Tlaxcala-UNAM.
- 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.
- 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.
- 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.
- Moalli PA, Debes KM, Meyn LA, Howden N, Abramowitch SD (2008). Hormones Restore Biomechanical Properties of the Vagina and Supportive Tissues After Surgical Menopause in Young Rats. *Am J Obstet Gynecol.* 199(2): 161.e1–16.
- Myatt L, Sun K (2010). Role of fetal membranes in signaling of fetal maturation and parturition. *Int J Dev Biol.* 54(2-3):545-53. Review.
- 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.
- Osman I, Young A, Ledingham M, Thomson A, Jordan F, Greer I, Norman J (2003) Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol Hum Reprod*;9:41–45.
- 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.
- Park K, Ahn K, Lee S, Ryu S, Park Y, Azadzi KM (2001). Decreased circulating levels of estrogen alter vaginal and clitoral blood flow and structure in the rabbit. *Int J Impot Res.* Apr;13(2):116-24.
- Pessina M, Hoyt RF, Goldstein JI, and Traish AM (2006). Differential Effects of Estradiol, Progesterone, and Testosterone on Vaginal Structural Integrity. *Endocrinology* 147(1):61–69.
- Ramírez-Corona (2011) Contribución de los estrógenos en la organización histológica de la vagina pélvica de la coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*) Tesis de Maestría en Centro Tlaxcala Biología de la Conducta, UATX-UNAM.
- Resplande J, Gholami SS, Graziottin TM, Rogers R, Lin CS, Leng W, Lue TF (2002). Long-term effect of ovariectomy and simulated birth trauma on the lower urinary tract of female rats. *J Urol.* Jul;168(1):323-30.
- Rocha MA, Sartori MGF, De Jesus Simões Herrmann V, Baracat E. C, Rodrigues G (2007). Impact of pregnancy and childbirth on female rats' urethral nerve fibers. *Int Urogynecol J* 18:1453–1458.
- Rodríguez-Antolín J (2007) Estudio histológico del aparato urogenital inferior en la coneja doméstica: Relación con la multiparidad y la edad. Tesis de Doctorado en Neuroetología. Universidad Veracruzana.
- Rodríguez-Antolín J, Xelhuantzi N, García-Lorenzana M, Cuevas E, Hudson R 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.
- Sievert KD, Bakircioglu ME, Tsai T, Dahms SE, Nunes L, and Lue TF (2001) The effect of simulated birth trauma and/or ovariectomy on rodent continence mechanism. I. Functional and structural change. *J Urol* 166:311–317.

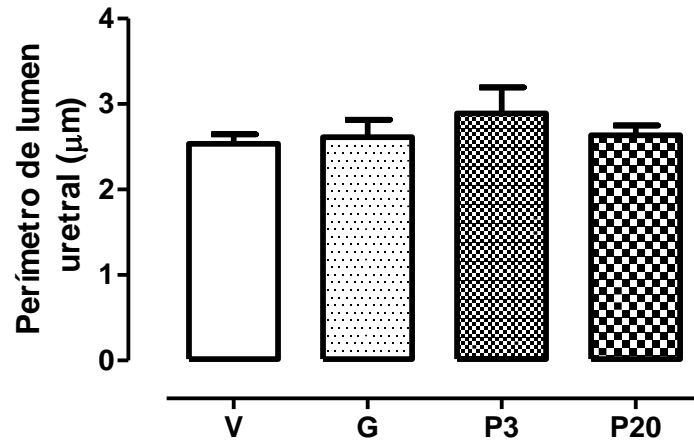
- Song YB, Hwang K, Kim DJ, Han SH (2009). Innervation of vagina: microdissection and immunohistochemical study. *J Sex Marital Ther*; 35(2):144-53.
- Ting AY, Blacklock AD, and Smith PG (2004). Estrogen Regulates Vaginal Sensory and Autonomic Nerve Density in the Rat. *Biology of reproduction* 71, 1397–1404.
- Vallcaneras SS, Casais M, Delgado SM, Filippa V, Mohamed F, Sosa Z, Rastrilla AM (2009). Androgen receptors in coeliac ganglion in late pregnant rat. *Steroids*. Jun;74(6):526-34. Epub 2009 Feb 21.
- Wagner G and Levin R (1978). Vaginal fluid. *The human vagina*. Hafez ESE and Evans TN. Amsterdam, Elsevier=North Holland Biomedical Press: 121-137.
- Woo LL, Hijaz A, Pan HQ, Kuang M, Rackley RR, Damaser MS (2009) Simulated childbirth injuries in an inbred rat strain. *Neurourol Urodyn*; 28(4):356-61.
- Xelhuantzi N (2006) Estudio histológico de la uretra distal y la vagina pélvica en conejas jóvenes nulíparas y múltíparas. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- 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, Kwon SW (2001). Effects of estrogen on nitric oxide synthase and histological composition in the rabbit clitoris and vagina. *Int J Impot Res*. Aug;13(4):205-11.
- Zhao L, Samuel CS, Tregear GW, Beck F, and Wintour EM (2000). Collagen Studies in Late Pregnant Relaxin Null Mice. *Biology of Reproduction* 63, 697–703.
- Zhao S y Sherwood OD (1998). Monoclonal Antibodies Specific for Rat Relaxin. X. Endogenous Relaxin Induces Changes in the Histological Characteristics of the Rat Vagina During the Second Half of Pregnancy *Endocrinology*, Vol. 139, No. 11.



## Abreviaturas

ACh	Acetilcolina
CGRP	Péptido Relacionado al Gen de la Calcitonina
ChAT	Colina-Acetil Transferasa
G	Gestante
NA	Noradrenalina
NOS	Sistasa de Óxido Nitríco
NPY	Neuropeptido Y
P20	Primípara de 20 días posparto
P3	Primípara de 3 días posparto
PGP-9.5	Proteína Producto del Gen 9.5
TH	Tirosina Hidroxilasa
TRPV1	Receptor de Potencial Transitorio Vainilloide tipo 1
V	Virgen
VAcHT	Transportador de Acetilcolina Vesicular
VIP	Péptido Intestinal Vasoactivo

## Anexos



**Anexo 1.** Perímetro del lumen uretral en conejas: virgen (V), gestante (G), primípara 3 días posparto (P3) y primípara 20 días posparto (P20)

## Publicaciones



curso internacional bases biológicas de la conducta

### Efecto de la gestación y el parto sobre la organización histológica de la vagina pélvica de la coneja

Laura G. Hernández Aragón<sup>1</sup>, Eréndira Ramírez Corona<sup>1</sup>, Nicté Xelhuantzi<sup>2</sup>, Margarita Martínez Gómez<sup>3</sup> y Francisco Castelán<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx).

<sup>2</sup>Doctorado en Ciencias Naturales, UATx.

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

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

La vagina es un tejido tubular músculo-membranoso que participa en la cópula y el parto de las hembras de mamíferos. La estrecha relación anatómica y funcional que tiene con otros órganos y tejidos del aparato urogenital inferior indica que también está involucrada en la micción. Distintos hallazgos sugieren que la fisiología vaginal se relaciona con conductas reproductivas y de expulsión de orina. En nuestro grupo hemos encontrado que la multiparidad (cuatro partos) afecta la histología e inervación vaginal de la coneja. Es probable que tal efecto se deba a la distensión ocurrida durante la labor de parto, aunque el efecto de la gestación es desconocido. Así el cambio de posición de vísceras pélvicas inducido por el desplazamiento uterino y las modificaciones hormonales hacia el final de la gestación podrían afectar la histología vaginal. En este proyecto se pretende identificar la contribución de la gestación sobre la organización histológica de la vagina pélvica, segmento que contiene musculatura lisa y estriada, colágeno e inervación, y que no están presentes uniformemente en otros segmentos vaginales. Se utilizarán 18 conejas que serán divididas (n=6, c/u) en vírgenes, gestantes sacrificadas el día 30 de la primera gestación y primíparas sacrificadas 20 días postparto. Las características histológicas se analizarán en cortes transversales teñidos con tricrómica de Masson. La inervación vaginal será evaluada mediante marcaje inmunohistoquímico que revele información acerca del tipo y distribución de nervios y ganglios localizados en la vagina pélvica. Los resultados obtenidos serán analizados mediante un ANOVA de dos vías y una prueba *post-hoc* de Tukey-Kramer.

Con financiamiento de CONACyT (becas a LGHA y ERC; proyecto a MMG) y SEP-PROMEP (proyecto a FC).

## Efecto de la gestación y el período posparto sobre la morfología de los ganglios paravaginales del plexo pélvico de la coneja



Hernández Aragón LG<sup>1</sup>, Xelhuantzi N<sup>2</sup>, Sánchez García O<sup>1</sup>, Ortega A<sup>3</sup>,  
Martínez Gómez M<sup>4,5</sup>, y Castelán F<sup>3</sup> (Avalado por Castelán F).

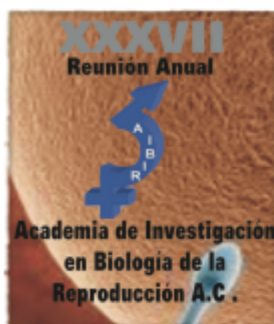
<sup>1</sup>Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx); <sup>2</sup>Doctorado en Ciencias Naturales, UATx; <sup>3</sup>Depto. de Genética y Biología Molecular, Cinvestav-IPN; <sup>4</sup>Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, UATx; <sup>5</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

En vertebrados, la fisiología vaginal depende en gran medida de la inervación autonómica proveniente del plexo pélvico. Ésta controla órganos participantes en funciones de reproducción y excreción. En la mujer se ha propuesto que la reproducción modifica la morfología del plexo pélvico, lo que estaría relacionado con episodios de dolor pélvico e incontinencia urinaria, entre otros signos clínicos. En nuestro grupo hemos observado que la multiparidad promueve cambios en la morfología de los ganglios paravaginales de la coneja, incluyendo una disminución en el número de neuronas ganglionares. La multiparidad dificulta establecer el efecto debido al estado hormonal de la gestación y el de la distensión vaginal debida al parto. Por tanto el objetivo de este trabajo fue evaluar ambos efectos sobre la organización histológica de los ganglios y nervios del tejido paravaginal pertenecientes al plexo pélvico de la coneja. Con tal fin se utilizaron 24 conejas (*Oryctolagus cuniculus*) de la raza Chinchilla, divididas en grupos de nulíparas, gestantes a término y primíparas no lactantes sacrificadas en los días 3 y 20 postparto. La vagina fue sometida a la técnica histológica y analizada mediante tricrómica de Masson e inmunohistoquímica para receptores de estrógenos. Los resultados mostraron que la gestación y la primiparidad no modifican el área transversal de ganglios y nervios paravaginales, ni el número de neuronas ganglionares por campo. En las conejas gestantes, el área del soma de las neuronas paravaginales fue menor que en las nulíparas y primíparas. Este mismo comportamiento se encontró al analizar cualitativamente la expresión neuronal de los subtipos alfa y beta del receptor de estrógenos. Nuestros resultados evidencian que la distensión vaginal ocurrida durante el parto no afecta la morfología del plexo pélvico durante los primeros 20 días postparto. El estado hormonal debido a la gestación modifica transitoriamente la morfología de las neuronas paravaginales, lo que podría estar relacionado con la expresión y la función del receptor de estrógenos en ellas.

Con financiamiento de PROMEP-SEP (UATLX-PTC-109 a FC) y PAPIIT-UNAM (228110 a MMG); becas CONACyT a LGHA (248110), NXA (17459) y OSG (248123); beca de Movilidad ECOES-Santander a LGHA.

27-30 de junio de 2012. Pachuca, Hidalgo

## La primiparidad daña el músculo puboccígeo pero no el bulboesponjoso de la coneja doméstica



Octavio Sánchez García<sup>1</sup>, Kenia López García<sup>2</sup>, Laura Hernández Aragón<sup>1</sup>, Margarita Martínez Gómez<sup>3</sup> y Francisco Castelán<sup>4</sup> (avalado por Francisco Castelán).

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

<sup>2</sup>Doctorado en Neuroetología, Universidad Veracruzana;

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

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

En la mujer, los cambios estructurales y funcionales de la musculatura estriada pélvica y perineal debido al parto se asocian con la aparición de prolapsos de órganos pélvicos e incontinencia urinaria de esfuerzo. En la coneja múltipara que ha tenido 4 partos consecutivos hemos encontrado alteraciones funcionales y estructurales en un músculo pélvico, el pubococcígeo (mPc) y uno perineal, el bulboesponjoso (mBe). Una de las hipótesis que nos hemos planteado para explicar esos resultados es que el parto induce el daño de ambos músculos. Con la finalidad de ponerla a prueba el objetivo de este trabajo fue cuantificar el daño muscular mediante la actividad del enzima lisosomal  $\beta$ -glucuronidasa en el mPc y el mBe de conejas nulíparas y primíparas. Teniendo en cuenta que la degeneración y regeneración del músculo estriado requieren diversos procesos celulares que requieren modificaciones histológicas, también hemos cuantificado el número de mionúcleos por fibra, el área transversal de la fibra (ATF) y el dominio mionuclear (DMN) para cada músculo. La actividad del enzima  $\beta$ -glucuronidasa del mPc de las conejas primíparas fue mayor que en el de las nulíparas, mientras que en el mBe no se encontró diferencia. La primiparidad incrementó el número de mionúcleos por fibra y el ATF en el mPc pero no tuvo efecto en el mBe. El DMN del mPc fue menor en las conejas primíparas mientras que el del mBe fue similar que el de las conejas nulíparas. Es probable que la localización anatómica, composición histológica y/o el tipo de contracción del mBe evite el daño caracterizado para el mPc. El daño muscular del pubococcígeo coincide con una organización histológica que sugiere un proceso de regeneración muscular en el período posparto de la coneja primípara.

*Con financiamiento de PROMEP-SEP (UATLX-PTC-109 a FC), PAPIIT-UNAM (228110 a MMG) y becas del CONACyT a OSG (248123), LGHA (248110) y KLG (268423).*

