



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto de la distensión vaginal sobre el aparato
urogenital y su inervación en la rata

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

José Luis Palacios Galicia

Directora

Dra. Yolanda Cruz Gómez

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2015



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto de la distensión vaginal sobre el aparato
urogenital y su inervación en la rata

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

José Luis Palacios Galicia

Comité Tutorial

Dra. Yolanda Cruz Gómez
Dra. Carolina Morán Raya
Dra. Margarita Juárez Romero
Dr. Pablo Pacheco Cabrera

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2015

La presente tesis fue realizada bajo la dirección de la Doctora Yolanda Cruz Gómez, en el Laboratorio de Neurofisiología del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC), Universidad Autónoma de Tlaxcala (Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM).

El proyecto fue desarrollado dentro del programa de la Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, la cual está registrada en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional. Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

Su financiamiento fue otorgado por el CONACyT (Proyecto: YCG 183446; Beca: JLPG 488223).



Maestría en Ciencias Biológicas

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 José Luis Palacios Galicia 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 Cuyo proyecto se titula "Efecto de la distensión vaginal sobre el aparato urogenital e inervación en la rata".

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., AGOSTO 8 DE 2014

DRA. YOLANDA CRUZ GÓMEZ

DRA. CAROLINA MORÁN RAYA

DR. CÉSAR FELICIANO PASTELÍN ROJAS

DR. PABLO PACHECO CABRERA

DRA. MARGARITA JUÁREZ ROMERO

DR. RENÉ ZEMPOALTECA RAMÍREZ

DRA. NICTE XELHUANTZI ARREGUÍN



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



Agradecimientos

- Al posgrado del CTBC, UAT, por la oportunidad de realizar la Maestría en Ciencias Biológicas.
- Al CONACyT por la beca de estudio otorgada.
- A mi directora de tesis la Doctora Yolanda Cruz Gómez por su gran apoyo y comprensión durante mi estancia en la maestría.
- A los miembros del comité tutorial: Doctor Pablo Pacheco Cabrera, Doctora Margarita Juárez Romero, Doctora Carolina Morán Raya, por sus oportunas observaciones y consejos durante los tutorales y en el mejoramiento de este proyecto.
- A Nicté Xelhuantzi Arreguín y a César Pastelín Rojas por sus invaluable enseñanzas en las técnicas empleadas en este estudio.
- A los demás integrantes del Laboratorio de Neurofisiología: Raúl Juárez Mendieta, Nancy Mirto Aguilar, Alfonso Medel Rojas, Jorge Arellano Hernández, José Luis Tlachi López y Ricardo Juárez Mirto por sus comentarios y sugerencias.
- A todos los profesores y compañeros de la Maestría en Ciencias Biológicas por sus enseñanzas dentro y fuera del aula.
- A los directivos, amigos y personal que labora en el CTBC por su valiosa amistad.

Dedicatoria

-A mis padres Constantino Palacios Cuahutle† y María Félix Galicia Netzahual por su cariño, apoyo incondicional, alegrías y tristezas en mi camino académico y familiar.

-A mis hermanas Lilia y Araceli por su linda compañía.

-A mis sobrinos Cristian y Sofía por ser un recordatorio de que se debe de reír en esta vida.

-A mis abuelos, tíos, primos y demás familiares que me han enseñado a compartir lo que está a nuestro alcance.

-A mis amigos que están en los malos y buenos momentos.

Muchas gracias a todos, sin ustedes la vida no sería la misma.

JL

Resumen

Durante el parto de la mujer, el feto distiende el tracto vaginal y a los músculos pélvicos maternos. La distensión de las estructuras pélvicas ha sido asociada a disfunciones urogenitales posparto, tales como la incontinencia urinaria. Se ha creado un modelo de distensión vaginal en rata (DV) para evaluar la lesión inducida por la distensión vaginal sobre el aparato urogenital (AUG) y las estructuras adyacentes, el cual consiste en introducir en la vagina un catéter y distenderlo con cuatro ml de agua destilada. Empleando este modelo, en el presente trabajo se determinó el efecto de la DV sobre la anatomía, histología y fisiología de las estructuras del AUG de la rata hembra y su inervación. Se emplearon ratas hembra vírgenes de la cepa Wistar, con DV durante cuatro horas y DV testigo (SH DV, catéter introducido en la vagina pero sin agua destilada). En el experimento 1 (n=14; 7 DV y 7 SH DV) se determinó el efecto de la DV sobre las características morfológicas del AUG y su inervación. En el experimento 2 se determinó el efecto de la DV sobre las características histológicas de la vejiga urinaria (n=7; 5 DV y 2 SH DV) y del ganglio pélvico mayor (GPM) (n=10; 5 DV y 5 SH DV). En el experimento 3, se determinó el efecto de la DV sobre el transporte axonal de neuronas vesicales sensoriales y posganglionares del GPM (n=4; 2 DV y 2 SH). Los resultados del experimento 1 mostraron que la DV estira a la vagina (SH DV, 9.83 ± 0.25 mm vs DV, 15.83 ± 0.25 mm de ancho, $p < 0.0001$) y distiende a la vejiga urinaria (SH DV, 12 ± 0.53 mm vs DV, 20.17 ± 1.09 mm de longitud, $p < 0.0001$). La uretra no mostró cambios significativos (SH DV 23.07 ± 0.87 mm vs DV, 25.57 ± 0.87 mm de longitud, $p = 0.07$) pero se presionó contra el hueso pélvico, lo que obstruyó la uretra y provocó la distensión vesical. La DV estiró a los nervios que emergen del GPM, al nervio dorsal del clítoris (NDC) y a la rama motora del plexo lumbosacro.

Los resultados del experimento 2 evidenciaron que la DV indujo en la vejiga urinaria infiltración de eritrocitos y leucocitos, pero no afectó las características morfológicas del GPM ni de sus neuronas.

Los resultados del experimento 3 mostraron que las neuronas de la vejiga urinaria se localizaron en la región rostral del GPM. La DV redujo el número de neuronas sensoriales (alrededor del 50%). En contraste, el número de neuronas posganglionares vesicales marcadas a true blue aumentó, alrededor de 560 en los animales SH DV a 1100 neuronas en los animales con DV.

Se concluye que la DV en ratas, es un buen modelo para simular el trauma del parto, ya que estira a estructuras del AUG y a su inervación autonómica y somática directa (uretra y vagina) e indirectamente (vejiga urinaria). En la mujer, estas alteraciones pueden ser los factores causales de las disfunciones urinarias y sexuales que se observan posparto.

Índice

| | Pág. |
|---|------|
| 1. Introducción..... | 1 |
| 2. Antecedentes..... | 2 |
| 2.1 Anatomía del AUG de la rata hembra..... | 2 |
| 2.1.1 Vejiga urinaria..... | 3 |
| 2.1.2 Uretra..... | 6 |
| 2.1.3 Útero..... | 7 |
| 2.1.4 Cérvix..... | 8 |
| 2.1.5 Vagina..... | 9 |
| 2.2 Inervación del aparato urogenital de la rata hembra..... | 11 |
| 2.2.1 Nervio pélvico..... | 12 |
| 2.2.2 Nervio hipogástrico..... | 14 |
| 2.2.3 Nervio pudendo..... | 17 |
| 2.2.4 Ganglio pélvico mayor (GPM)..... | 19 |
| 2.3 Modelo de daño del parto por distensión vaginal..... | 21 |
| 3. Hipótesis..... | 24 |
| 4. Objetivo general..... | 24 |
| 4.1 Objetivos específicos..... | 24 |
| 5. Diseño experimental..... | 25 |
| 5.1 Animales..... | 25 |
| 5.2 Métodos generales..... | 25 |
| 5.2.1 Anestesia..... | 25 |
| 5.2.2 Distensión vaginal..... | 25 |
| 5.2.3 Eutanasia..... | 26 |
| 5.3 Análisis estadístico..... | 26 |
| 6. Experimento 1. Efecto de la DV sobre el AUG y su inervación..... | 27 |
| 6.1 Metodología..... | 27 |
| 6.2 Resultados..... | 28 |
| 6.3 Discusión..... | 36 |
| 7. Experimento 2. Efecto de la DV sobre las características histológicas de la vejiga urinaria y del GPM..... | 39 |

| | |
|---|----|
| 7.1 Metodología..... | 39 |
| 7.2 Resultados..... | 40 |
| 7.2.1 Vejiga urinaria..... | 40 |
| 7.2.2 Ganglio pélvico mayor..... | 43 |
| 7.3 Discusión..... | 48 |
| 8. Experimento 3. Efecto de DV sobre el transporte axonal de las neuronas vesicales: sensoriales y posganglionares del GPM..... | 50 |
| 8.1 Metodología..... | 50 |
| 8.2 Resultados..... | 51 |
| 8.3 Discusión..... | 53 |
| 9. Discusión general..... | 54 |
| 10. Conclusiones..... | 54 |
| 11. Perspectivas..... | 54 |
| 12. Referencias bibliográficas..... | 55 |

1. Introducción

En las mujeres se presentan varias patologías urogenitales tales como incontinencia urinaria, retención urinaria, dolor durante el coito e incapacidad para lograr al climax de excitación. La prevalencia promedio de incontinencia urinaria de 27.6%, rango de 4.8-58.4%, la de retención urinaria de 42% y la de las disfunciones sexuales es de 43% (Kavia et al. 2006; Laumann et al. 1999; Minassian et al. 2003). Existen múltiples factores relacionados con la aparición de estas patologías, entre los cuales se encuentran la edad, la histerectomía, la obesidad, la diabetes, el embarazo y el parto vaginal (Minassian et al. 2003; Peyrat et al. 2002).

El parto es el proceso fisiológico por el cual el feto es expulsado del útero (Snegovskikh et al. 2006). Se divide en tres etapas. La primera corresponde a la dilatación del cérvix, en mujeres nulíparas dura alrededor de seis horas. La segunda a la expulsión de feto y dura alrededor de 50 minutos. La tercera a la expulsión de la placenta, con una duración promedio de 30 minutos (Jones y Larson 2003). La prolongación de algunas de estas etapas conduce al parto distócico (Shields et al. 2007). Esta anomalía es una de los problemas más comunes en mujeres nulíparas y justifican el 50% de las cesáreas (Kjaergaard et al. 2009; Shields et al. 2007). Se ha reportado que inmediatamente después del parto hay una incidencia de retención urinaria del 11 % (Kekre et al. 2011) y que un año después del parto la incidencia de incontinencia urinaria es de 29% (Thom et al. 2011).

El costo anual del tratamiento de la incontinencia urinaria es de 12.4 billones de dólares en los Estados Unidos de América, lo que muestra que además de afectar a la salud de la mujer, también afecta su economía (Wilson et al. 2001).

Para estudiar el efecto de la lesión que ocasiona el parto sobre el aparato urogenital (AUG), se han creado modelos en animales de laboratorio, tal es el caso de la distensión vaginal (DV) en ratas (Cannon et al. 2002; Damaser et al. 2005; Lin et al. 1998). Con este modelo, se ha mostrado que la DV daña a la uretra y a su inervación, y que induce hipoxia en la vejiga urinaria. Sin embargo, el AUG femenino y su inervación comprende a varias estructuras anatómicas, cuyas características no han sido estudiadas después de la DV.

2. Antecedentes

El AUG participa en procesos urinarios, reproductivos y sexuales.

2.1 Anatomía del AUG de la rata hembra

El AUG está formado por la vejiga urinaria, la uretra, el útero, el cérvix y la vagina (Fig. 1).

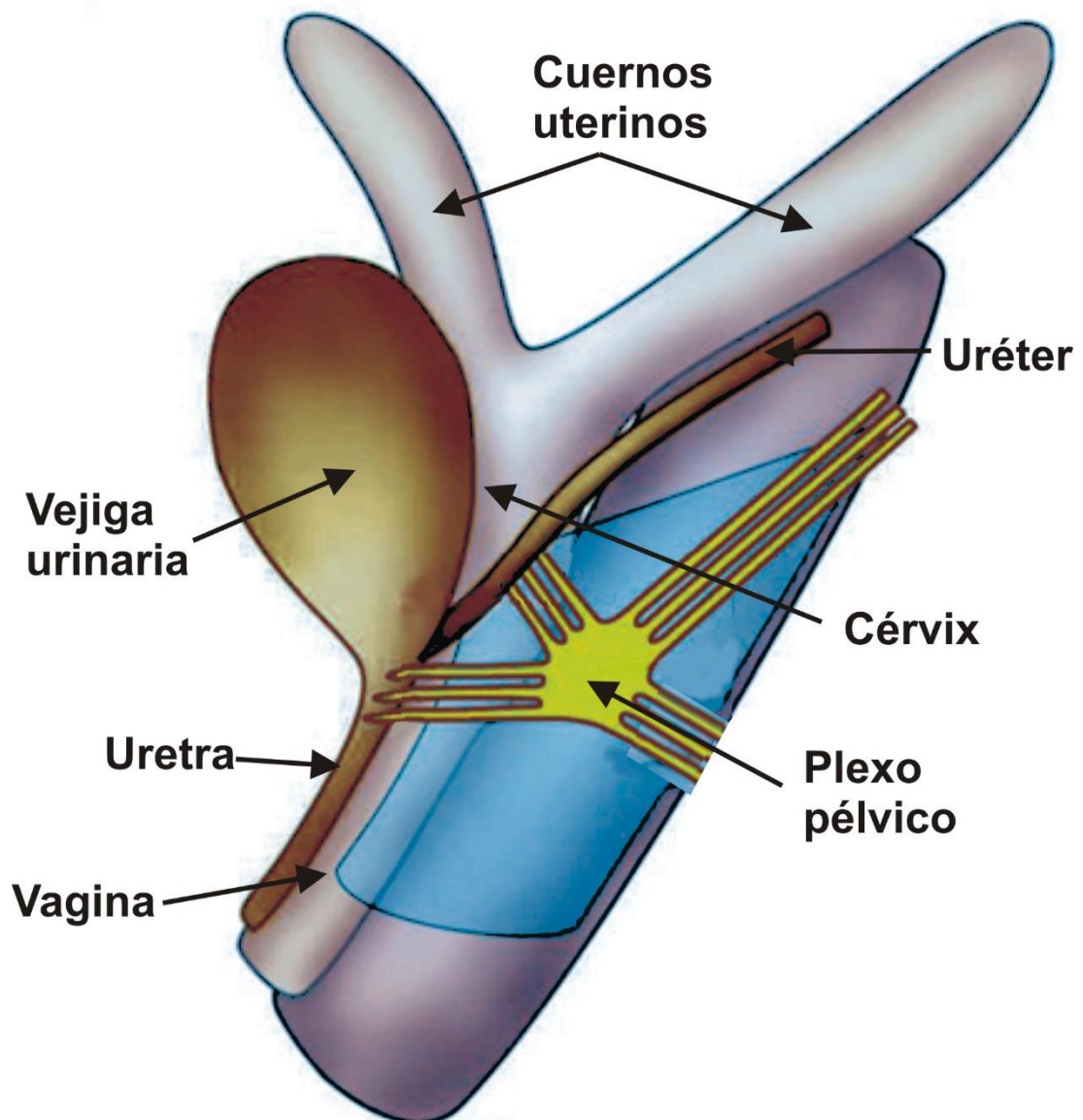


Fig. 1. Esquema del AUG de la rata hembra. Tomado de Castiglione et al. 2012.

2.1.1 Vejiga urinaria

La vejiga urinaria de la rata es un órgano sacular musculoelástico cuya función es el almacenamiento y la expulsión de orina. Cuando está vacía tiene forma de pera y alcanza a medir unos 10 mm de largo y 5 mm en su parte más ancha. Cuando se llena mide 25 mm de largo por 15 mm de ancho. Está situada en la porción inferior del abdomen, craneal al hueso pélvico y ventral al cuerpo uterino y cervix (Hebel y Stromberg 1986). Se le pueden distinguir varios componentes, entre ellos el domo en la parte superior, el cuerpo en la parte media y el cuello en la transición con la uretra (Fig. 2) (Pradidarcheep et al. 2011).

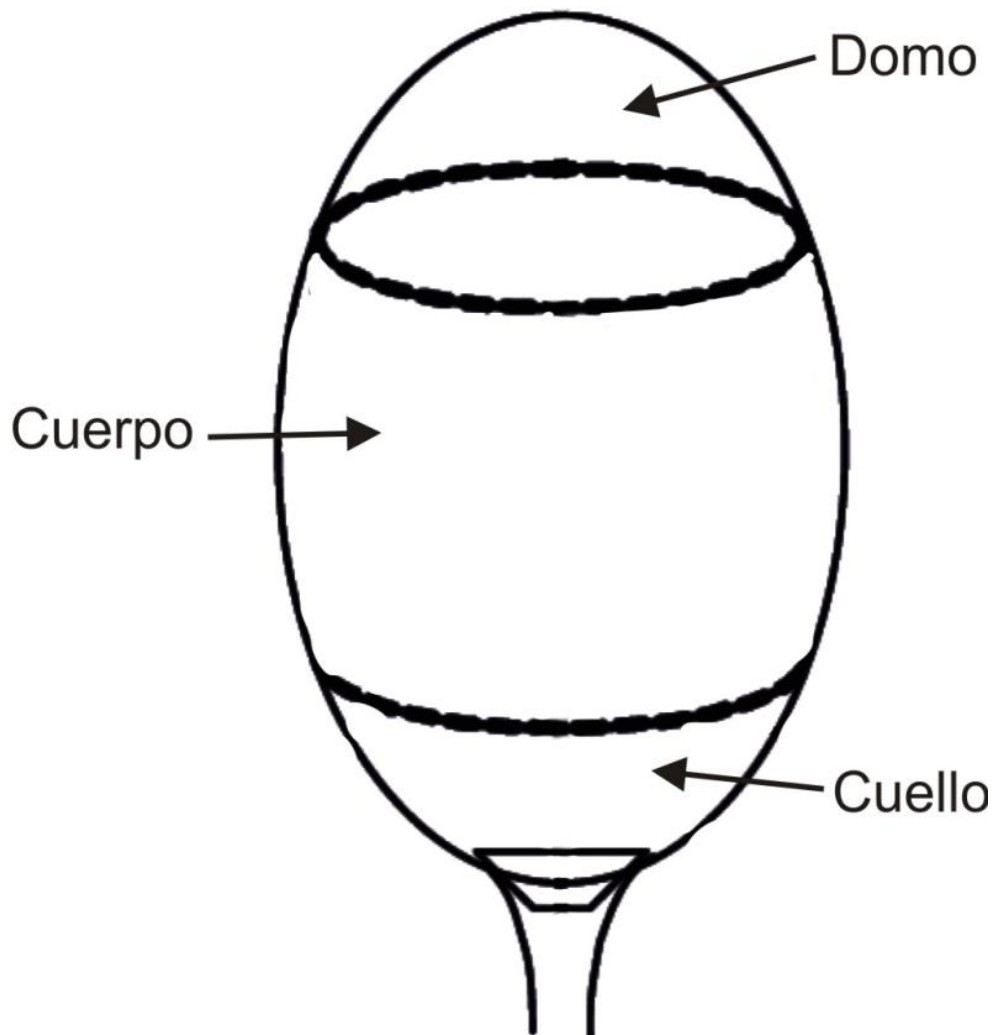


Fig. 2. Regiones de la vejiga urinaria de la rata. Modificado de Nagatomi et al. 2008.

En estudios histológicos se ha mostrado que la pared vesical tiene un grosor de 0.97 ± 0.11 mm (Yu et al. 2009). De su parte más interna a la más externa se encuentra el urotelio, la lámina propia, el detrusor y la adventicia. El urotelio es una capa de epitelio transicional formado de tres subcapas: una compuesta de células hexagonales largas conocidas como células “sombriilla” que contienen pequeñas microvellosidades de glucosaminoglucanos, una de células intermedias y otra de células basales (Fig. 3). Este conjunto de elementos forma una barrera casi impermeable, lo que permite que la vejiga urinaria pueda almacenar a la orina (Birder y Andersson 2013).

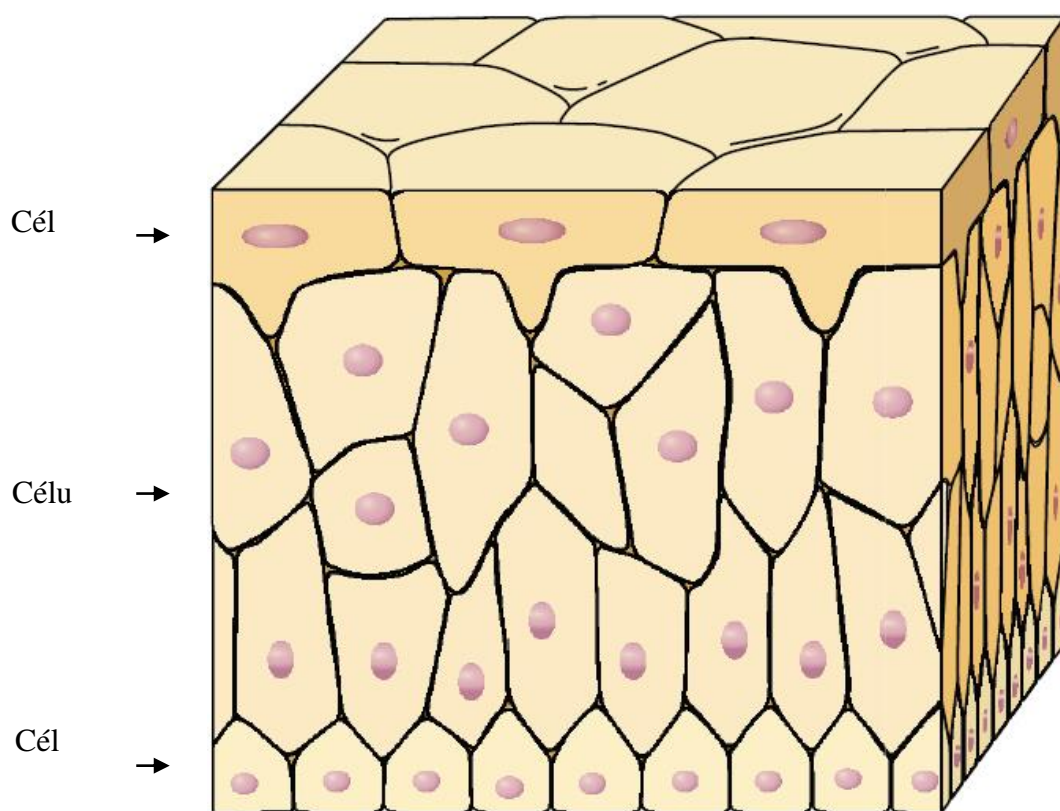


Fig. 3. Dibujo de las múltiples capas de células epiteliales del urotelio. Tomado de Birder y Anderson 2013.

La lámina propia es la capa compuesta de una matriz extracelular que contiene varios tipos de células que incluyen a los fibroblastos, a los adipocitos, a las células intersticiales y a las terminaciones nerviosas sensoriales. También contiene una rica red vascular y canales linfáticos (Aitken y Bägli 2009; Birder y Andersson 2013; Gabella y Davis 1998).

El detrusor es la capa más gruesa de la vejiga urinaria. Está compuesto de músculo liso y representa alrededor del 60 al 70% de la pared vesical. Las células musculares forman fascículos rodeados por capas de colágeno, están arregladas en forma de paquetes y corren en forma longitudinal y circular (Hebel y Stromberg 1986; Gabella y Uvelius 1990; Nagatomi et al. 2005).

La capa adventicia está compuesta de tejido conectivo (Fig. 4).

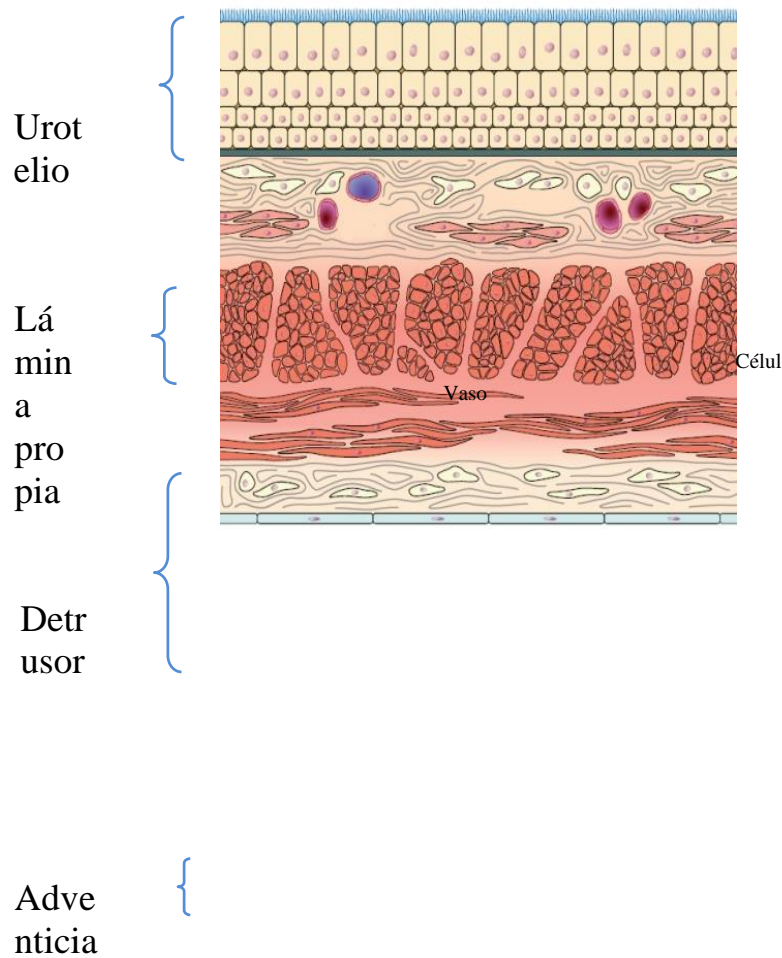


Fig. 4. Dibujo que muestra los componentes de la pared vesical. Tomado de Birder y Andersson 2013.

2.1.2 Uretra

La uretra de la rata hembra es un órgano tubular por el que pasa la orina de la vejiga urinaria hacia el exterior del cuerpo. Mide 22 mm de largo y está localizada ventral a la vagina (Praud et al. 2003). Se divide en tres segmentos, de alrededor de cinco mm cada uno: proximal, medial y distal (Fig. 5) (Lim et al. 2013).

Histológicamente se le pueden observar diferentes capas. De la luz hacia la periferia, se encuentra la epitelial, la del tejido conectivo (también conocido como submucosa), la muscular lisa (capas de musculatura lisa, una longitudinal y la otra circular) y la estriada, el esfínter externo de la uretra (EEU) (Fig. 5) (Kim et al. 2007; Lim et al. 2013; Praud et al. 2003).

El EEU tiene una longitud de 4.5 - 5 mm, inicia a 0.5 mm del cuello vesical y termina a 17 ± 1 mm del meato uretral (Praud et al. 2003). Mide de grosor 0.2 ± 0.03 mm y rodea principalmente a la porción medial de la uretra (Cruz y Downie 2005; Praud et al. 2003), aunque algunos autores señalan que el EEU se distribuye a lo largo de la uretra, principalmente en la parte proximal y medial (Kim et al. 2007; Lim et al. 2013).

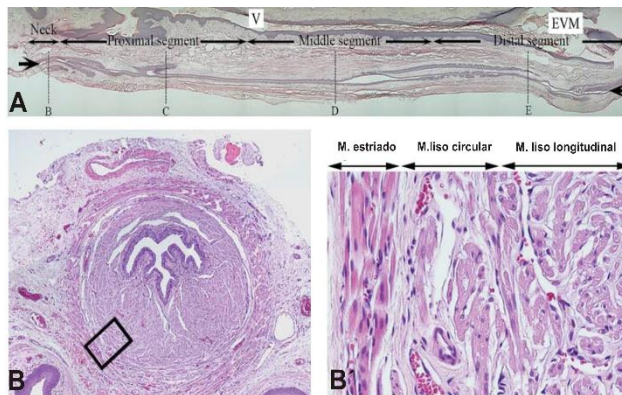


Fig. 5. Anatomía e histología de la uretra de la rata hembra. **A.** Tres segmentos de la uretra. **B.** Corte transversal de la uretra media teñida con Hematoxilina-Eosina. **B'.** Amplificación del recuadro de **B.** **Note** las capas de la uretra. Neck, cuello vesical. V, vagina. EVM, meato vaginal externo. Tomado de Lim et al. 2013.

2.1.3 Útero

El útero de la rata es un órgano muscular que se localiza dorsal a la vejiga urinaria y ventral al recto. Consiste de dos cuernos y un cuerpo, los cuáles están situados en el abdomen y en la pelvis, respectivamente (Baljet y Drukker 1980). Los cuernos miden de 30 a 40 mm de longitud (Hofsteter et al. 2006) y el cuerpo de 7 a 10 mm. En este último segmento los cuernos se fusionan parcialmente (Hebel y Stromberg 1986).

La mucosa rodea a la luz uterina. Es una capa de epitelio columnar simple de 23.85 ± 1.98 μm de grosor cuyas células dan origen a pliegues y criptas (Fig. 6). Le sigue un estroma de 584.05 ± 132.07 μm de grosor, formado por tejido conectivo y vasos sanguíneos. Posterior a éste se encuentra el miometrio, de 336.50 ± 69.45 μm de grosor, formado por

musculatura lisa. Finalmente, se encuentra el perimetrio de $11.30 \pm 2.02 \mu\text{m}$ de grosor (de Almeida Chuffa et al. 2011; Gerez et al. 2005), el cual da lugar al cérvix o cuello uterino.

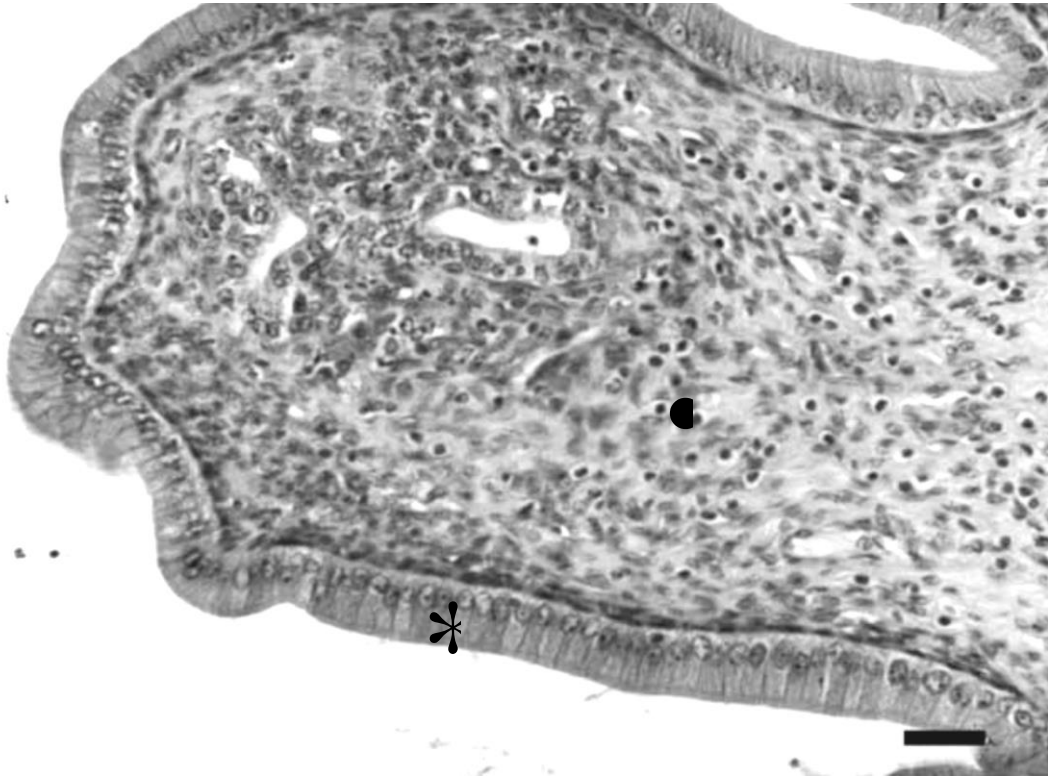


Fig. 6. Microfotografía del útero de la rata. El asterisco indica el epitelio columnar que rodea al lumen y el círculo negro al estroma. Barra = $30 \mu\text{m}$. Tomado de Gerez et al. 2005.

2.1.4 Cérvix

El cérvix es un conducto que se localiza entre la vagina y el útero. Mide $9.51 \pm 1.35 \text{ mm}$ de longitud, 5 mm de ancho y 3 mm de grosor (Barone et al. 2012). Es una estructura más pálida y rígida que los cuernos uterinos. Esta rigidez permite retener al feto durante la gestación (Fig. 7A). El epitelio que rodea al lumen representa el 7.8% del contenido celular total, es de tipo escamoso estratificado no glandular, el cual experimenta cambios cíclicos parecidos a los del epitelio vaginal (Harkness y Harkness 1959). Después del epitelio se encuentra el estroma, compuesto de colágeno, elastina y proteoglicanos, además de vasos sanguíneos y macrófagos (Fig. 7B) (Barone et al. 2012). Esta capa representa el 67.5% del

total celular del cérvix. Finalmente se encuentra una capa de músculo liso que representa el 24.7% del total cervical (Harkness y Harkness 1959).

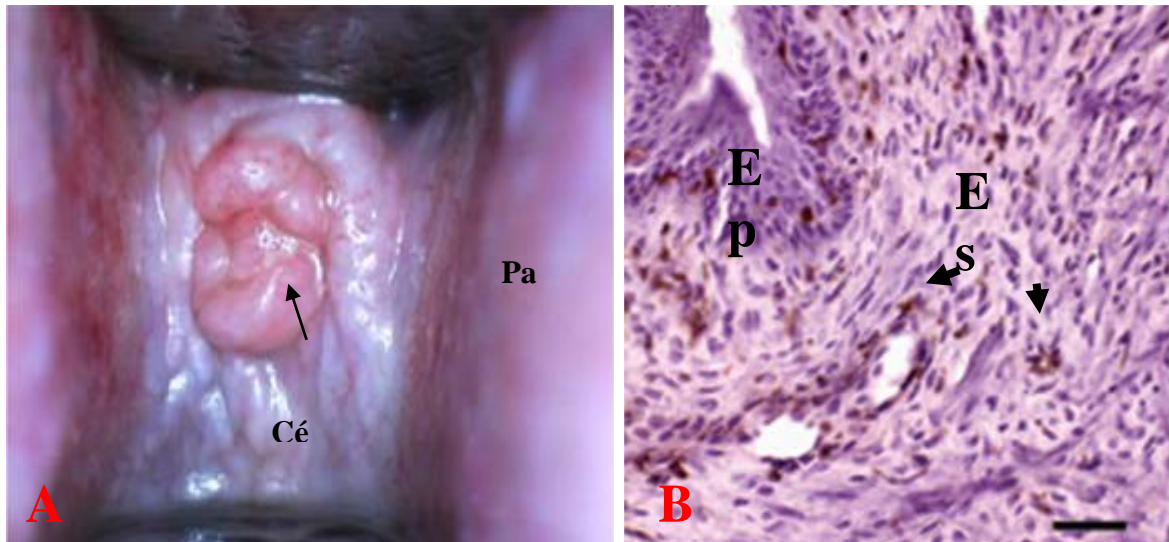


Fig. 7. **A.** Fotografía del cérvix de una rata en el día 13 de gestación. Tomado de Kuon et al. 2011. **B.** Microfotografía del cérvix de la rata. Los macrófagos están señalados con las flechas. Ep, epitelio. Es, estroma. Barra = 50 μ m. Tomado de Boyd et al. 2009.

2.1.5 Vagina

La vagina es un órgano tubular hueco que mide de 15-20 mm de longitud y tiene un diámetro de 3-5 mm (Hebel y Stromberg 1986). Cranealmente se conecta con el cérvix y caudalmente termina en el orificio externo (Fig. 8). Se encuentra dorsal a la uretra y ventral al recto.

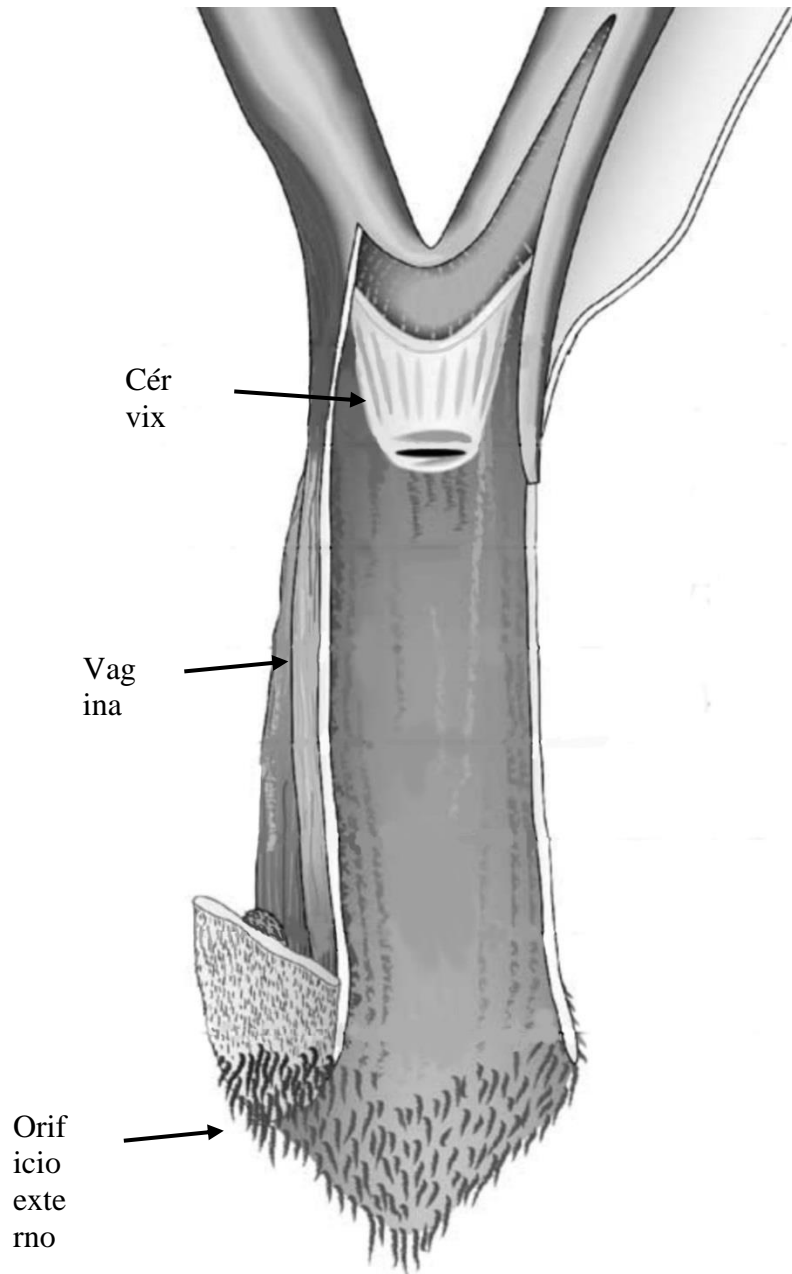


Fig. 8. Dibujo de la anatomía de la vagina de la rata. Tomado de Berger et al. 2005.

La pared vaginal mide 250 μm de grosor (Berger et al. 2005) y está formada por cuatro capas: la epitelial, la subepitelial (lámina propia), la muscular y la adventicia (Fig. 9). La capa epitelial está formada por ocho capas de células escamosas estratificadas queratinizadas de 60 μm de grosor, las células basales contienen núcleos grandes redondos u ovalados, las intermedias son más claras que las anteriores y las más superficiales son las más oscuras y densas (Pessina et al. 2006). La capa subepitelial (también llamada lámina propia) tiene 130 μm de grosor. Está compuesta de colágeno tipo I y III (Moalli et al. 2005). La capa de musculatura lisa tiene 70 μm de grosor. Lo forman fibras circulares y

longitudinales agrupadas en fascículos. Los cuales son más largos en la porción proximal de la vagina (Pessina et al. 2006). La capa más externa es la adventicia.

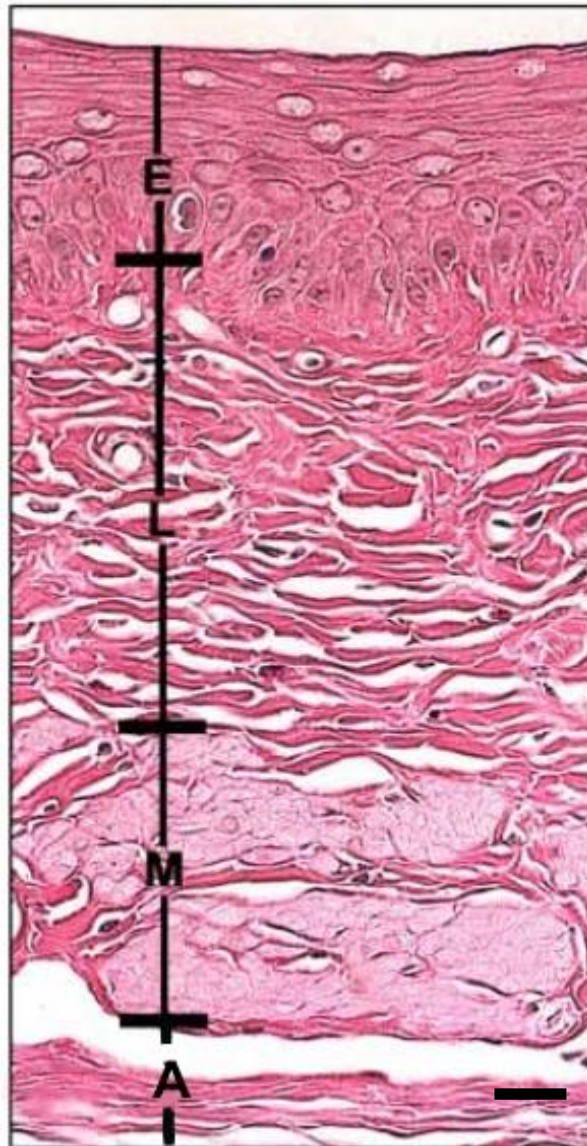


Fig. 9. Fotografía de un corte transversal de las capas de la vagina distal de la rata. E, epitelio. L, lámina propia. M, muscular. A, adventicia. Barra = 50 μ m. Modificado de Berger et al. 2005.

2.2 Inervación del aparato urogenital de la rata hembra

El área pélvica y perineal está inervada por la región espinal lumbosacra, cuyas raíces forman dos troncos, el tronco lumbosacro y el tronco L6-S1 (Fig. 10). De estos troncos surgen los nervios que se dirigen a las vísceras pélvicas, a la piel perineal y a la musculatura estriada (Cruz et al. 2004).

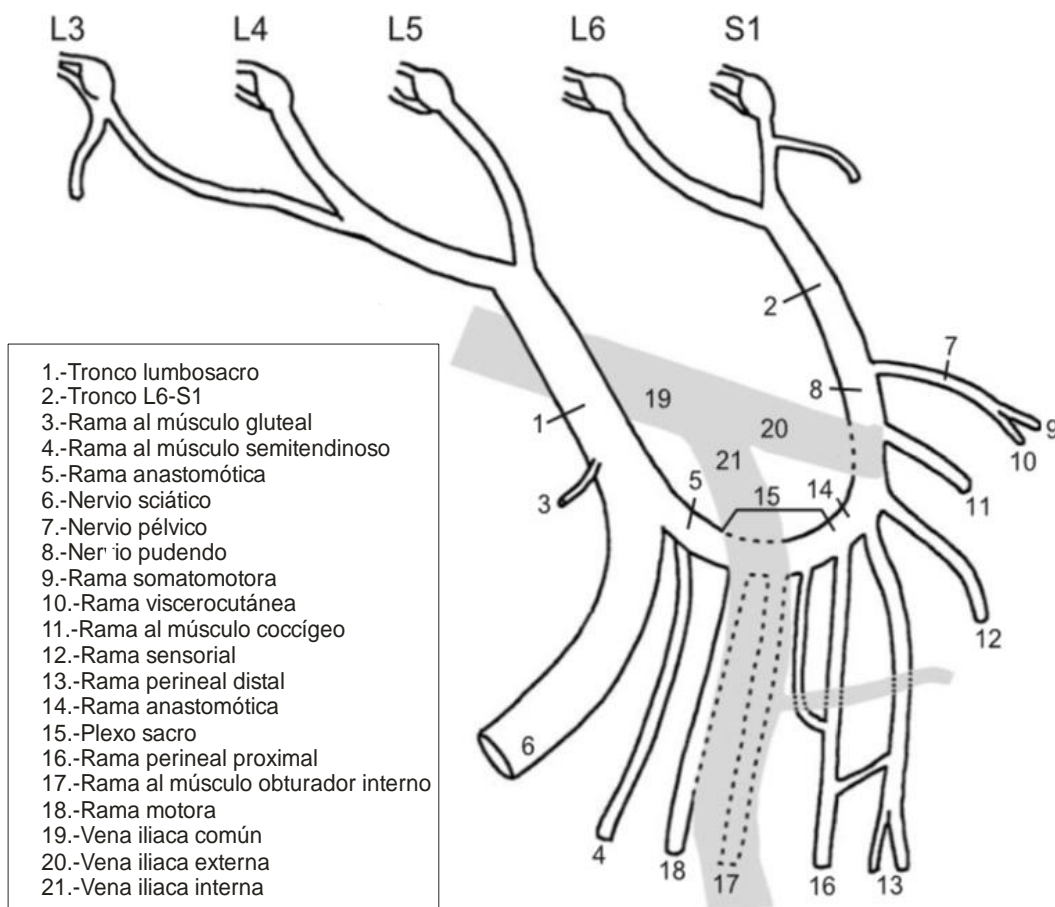


Fig. 10. Esquema de las ramas que emergen de los troncos lumbosacro y L6-S1 de la rata hembra. Modificado de Cruz et al. 2004.

Los nervios que regulan las funciones del AUG de la rata hembra son autonómicos y somáticos. Los autonómicos son el nervio pélvico y el nervio hipogástrico, los cuáles alimentan al GPM. Los nervios somáticos son el pudendo y la rama motora del plexo lumbosacro.

2.2.1 Nervio pélvico

El nervio pélvico surge del tronco L6-S1. Está constituido principalmente por 550 a 810 fibras mielínicas, de alrededor de 2 μm de diámetro (rango de 1 a 10 μm) (Purinton et al. 1973). A la altura de la vena iliaca interna se divide en la rama somatomotora que inerva a los músculos pubo e iliococcígeo, y la rama viscerocutánea que inerva a la vejiga urinaria,

al cérvix, al recto, a la vagina, a la uretra, al clítoris y a la piel perineal (Berkley et al. 1993; Cruz et al. 2004; Pacheco et al. 1989; Peters et al. 1987).

El 98% de las neuronas preganglionares del nervio pélvico se encuentra en el núcleo parasimpático de los segmentos espinales L6-S1. Este núcleo contiene aproximadamente 550 neuronas medianas (11 x 20 μm) (Nadelhaft y Booth 1984). El 95% de las neuronas aferentes del nervio pélvico se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal L6-S1 de las cuales 1,537 inervan a la vejiga urinaria (Nadelhaft y Boot 1984). En este órgano, las fibras sensoriales se comunican con mecanorreceptores (Ishii et al. 2012), las cuales monitorean el volumen de orina y la amplitud de la contracción vesical (Morrison 1999).

Se han inyectado trazadores retrógrados en la pared ventral del domo y de la base de la vejiga urinaria (50% en cada región). Se encontraron neuronas marcadas en los ganglios de la raíz dorsal desde T13 hasta S1, con un mayor número de neuronas marcadas en L1 y L6 (Tabla 1) (Vera y Nadelhaft 1992).

Tabla 1. Neuronas aferentes de la vejiga urinaria de la rata hembra

| GRD | Domo | | | | | | | | | | | Total |
|------|------|-----|-----|-----|----|-----|----|----|----|-----|----|-------|
| | T10 | T11 | T12 | T13 | L1 | L2 | L3 | L4 | L5 | L6 | S1 | |
| R728 | 0 | 0 | 0 | 5 | 85 | 116 | 4 | 0 | 0 | 211 | 5 | 426 |
| R729 | 1 | 0 | 1 | 5 | 72 | 35 | 9 | 1 | 11 | 145 | 4 | 284 |

| | | | | | | | | | | | | |
|--------------|------|-----|------|------|-------|-------|------|------|-----|-------|------|-------|
| R739 | 0 | 0 | 1 | 3 | 65 | 19 | 3 | 1 | 13 | 187 | 7 | 299 |
| R746 | 0 | 0 | 1 | 1 | 25 | 14 | 1 | 0 | 0 | 152 | 7 | 201 |
| Media | 0.25 | 0 | 0.75 | 3.5 | 61.75 | 46 | 4.25 | 0.5 | 6 | 173.8 | 5.75 | 302.5 |
| Base | | | | | | | | | | | | |
| R728 | 0 | 0 | 0 | 2 | 43 | 43 | 4 | 1 | 0 | 254 | 26 | 373 |
| R729 | 0 | 1 | 0 | 4 | 32 | 18 | 2 | 1 | 6 | 206 | 12 | 282 |
| R739 | 0 | 1 | 4 | 3 | 75 | 58 | 4 | 1 | 8 | 301 | 30 | 485 |
| R746 | 0 | 0 | 0 | 2 | 26 | 24 | 0 | 0 | 0 | 97 | 12 | 161 |
| Media | 0 | 0.5 | 1 | 2.75 | 44 | 35.75 | 2.5 | 0.75 | 3.5 | 214.5 | 20 | 325.3 |

Modificado de Vera y Nadelhaft 1992.

2.2.2 Nervio hipogástrico

El nervio hipogástrico es el componente simpático del control autonómico del AUG. Proviene del ganglio mesentérico inferior (Fig. 11) (Langworthy 1965). Se adosa a la pared ventral de la arteria mesentérica inferior y pertenece a una red de plexos simpáticos y ganglios que cubren parcialmente la superficie ventral de la aorta y de la vena cava (Reiner

et al. 1980). Está constituido por 234 a 273 fibras que mayoritariamente son mielínicas de 2 μm de diámetro (Purinton et al. 1973).

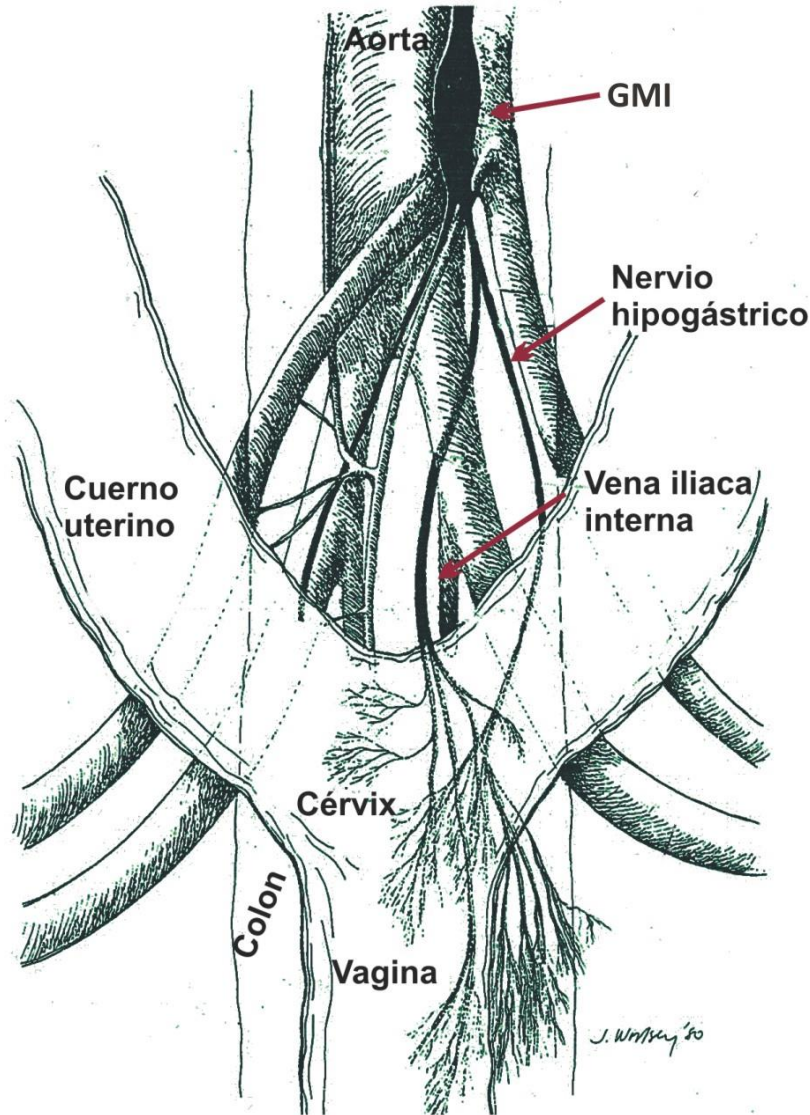


Fig. 11. Esquema del nervio hipogástrico y su inervación al aparato reproductor de la rata hembra (vista ventral). GMI, ganglio mesentérico inferior. Modificado de Reiner et al. 1980.

Las neuronas sensoriales del nervio hipogástrico se localizan en los ganglios de la raíz dorsal de T12-L2 y las neuronas preganglionares en los segmentos espinales de L1-L3, pero principalmente en L1 y L2. El 75% de las neuronas preganglionares se localizaron en el núcleo comisural dorsal de la médula espinal (Tabla 2) (Nadelhaft y McKenna 1987).

El nervio hipogástrico responde a la estimulación mecánica y eléctrica del útero (parte medio-caudal) y cérvix, indicando que este nervio transporta fibras sensoriales que inervan a estos órganos (Peters et al. 1987; Berkley et al. 1993).

El nervio hipogástrico también acarrea inervación motora proveniente de la cadena simpática hacia el domo y la base vesical (77% y 89%, respectivamente). La contribución del ganglio mesentérico inferior a esta inervación motora se encuentra restringida al domo, mientras que las neuronas simpáticas provenientes del ganglio pélvico mayor proyectan exclusivamente a la base (Vera y Nadelhaft 1992).

Tabla 2. Distribución de neuronas eferentes preganglionares y aferentes cuyos axones viajan por el nervio hipogástrico de la rata hembra

| Segmentos espinales | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|-----|---|-----|----|------|---|------|------|------|----|----|---|-------|------|-----|------|
| Hembra | T13 | | | L1 | | | L2 | | | L3 | | | Total | | | Suma |
| | I | M | C | I | M | C | I | M | C | I | M | C | I | M | C | |
| 309 | 0 | 0 | 1 | 6 | 9 | 7 | 13 | 73 | 8 | 0 | 2 | 0 | 19 | 81 | 15 | 115 |
| 325 | | | | 1 | 4 | 1 | 11 | 78 | 6 | 0 | 2 | 0 | 12 | 84 | 7 | 103 |
| 326 | | | | 2 | 6 | 2 | 6 | 38 | 4 | 0 | 0 | 0 | 8 | 44 | 6 | 58 |
| 327 | | | | 1 | 6 | 1 | 7 | 75 | 5 | 0 | 3 | 0 | 8 | 84 | 6 | 98 |
| 328 | 0 | 0 | 2 | 5 | 30 | 4 | 12 | 111 | 11 | 0 | 0 | 0 | 17 | 141 | 17 | 175 |
| Promedio (DS) | | 0 | | | 17 | | | 92 | | | 1 | | 13 | 87 | 10 | 110 |
| % | | 0 | | | 15.4 | | | 83.6 | | | 1 | | 11.8 | 79.1 | 9.1 | 100 |
| GRD | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | T11 | | T12 | | T13 | | L1 | | L2 | | L3 | | Total | | | |
| | I | C | I | C | I | C | I | C | I | C | I | C | I | C | | |
| 309 | 1 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 46 | 16 | 68 | 8 | 0 | 0 | 119 | 22 | 141 | |
| 325 | | | 1 | 0 | 7 | 0 | 25 | 5 | 66 | 1 | 0 | 0 | 99 | 6 | 105 | |
| 326 | | | | | 5 | 0 | 38 | 8 | 46 | 9 | 0 | 0 | 89 | 17 | 106 | |
| 328 | | | | | 18 | 5 | 75 | 46 | 47 | 46 | 1 | 0 | 141 | 97 | 238 | |
| Promedio (DS) | 01 | | 1 | | 10 | | 65 | | 72 | | 0 | | 112 | 36 | 148 | |
| % | 9 | | 1 | | 6.8 | | 43.9 | | 48.6 | | | | 75.7 | 24.3 | 100 | |

Células localizadas en la región intermediolateral de la médula espinal, ipsilateral (I) o contralateral (C) al nervio hipogástrico expuesto a HRP. M. células localizadas en la región media de la médula espinal, en el núcleo comisural gris. DS, desviación estándar. Modificado de Nadelhaft y McKenna 1987.

2.2.3 Nervio pudendo

El nervio pudendo se origina en el tronco L6-S1, caudal al nervio pélvico. Se ramifica y da origen a la rama del músculo coccígeo, a la rama sensorial del nervio pudendo, a la rama perineal distal y a la rama anastomótica que junto con la rama anastomótica del tronco lumbosacro da origen al plexo sacro (Fig. 10) (Cruz et al. 2004).

La rama sensorial del nervio pudendo entra a la fosa isquiorectal, corre dorsal al isquion y termina en un pequeño plexo localizado sobre la vagina (Fig. 12) (Pastelín et al. 2012). Su área transversal es de $25,553 \mu\text{m}^2$ y contiene alrededor de 3,000 axones amielínicos y 1500 axones mielínicos, con un área transversal de $0.3 \mu\text{m}^2$ y $6 \mu\text{m}^2$, respectivamente (Moore y White 1996). Estudios anatómicos, electrofisiológicos e histoquímicos han mostrado que inerva a la vagina, a la vaina clitoral y a la uretra distal (Cruz et al. 2004; Pacheco et al. 1989; Peters et al. 1987; Yoshimura et al. 2003). Los somas de los axones aferentes de este nervio se encuentran localizados en los ganglios de la raíz dorsal L6 y S1, cuyo número es de 735.5 ± 53.4 y 55.9 ± 48.9 neuronas, respectivamente (McKenna y Nadelhaft 1986).

Distal al plexo formado con las ramas provenientes del ganglio pélvico mayor la rama sensorial del nervio pudendo da origen al nervio dorsal del clítoris. Este último, corre caudalmente por debajo del hueso pélvico y se divide en el borde del arco isquiático para inervar a la uretra distal, al clítoris, a la piel perigenital, a las glándulas prepuciales y al orificio vaginal (Pastelín et al. 2012). El área transversal del nervio dorsal del clítoris es de $36.386 \pm 3.198 \mu\text{m}^2$ y está constituido por fibras amielínicas y mielínicas con un área transversal de 0.4 y $8 \mu\text{m}^2$, respectivamente (Moore y White 1996).

El plexo sacro da origen a varios nervios. Uno de ellos es la rama motora, conocida también como nervio motor del pudendo (Moore y White 1996; Kane et al. 2002), pasa por debajo del isquion, lateral a la rama sensorial del nervio pudendo. Se divide en dos fascículos, uno corre caudalmente y llega al esfínter externo del ano, el otro corre medialmente para inervar al músculo isquicavernoso y al EEU (Cruz et al. 2004; Pacheco et al. 1989; Pastelín et al. 2012). La rama motora del plexo sacro tiene un área transversal de $4,561 \pm 3.89 \mu\text{m}^2$ y contiene alrededor de 700 fibras amielínicas vs 200 fibras mielínicas, cuyas áreas transversales son de 0.1 y $10 \mu\text{m}^2$, respectivamente (Moore y White 1996). Sus motoneuronas están ubicadas en dos núcleos espinales de los segmentos L5-L6, el núcleo dorsomedial y el dorsolateral (McKenna y Nadelhaft 1986).

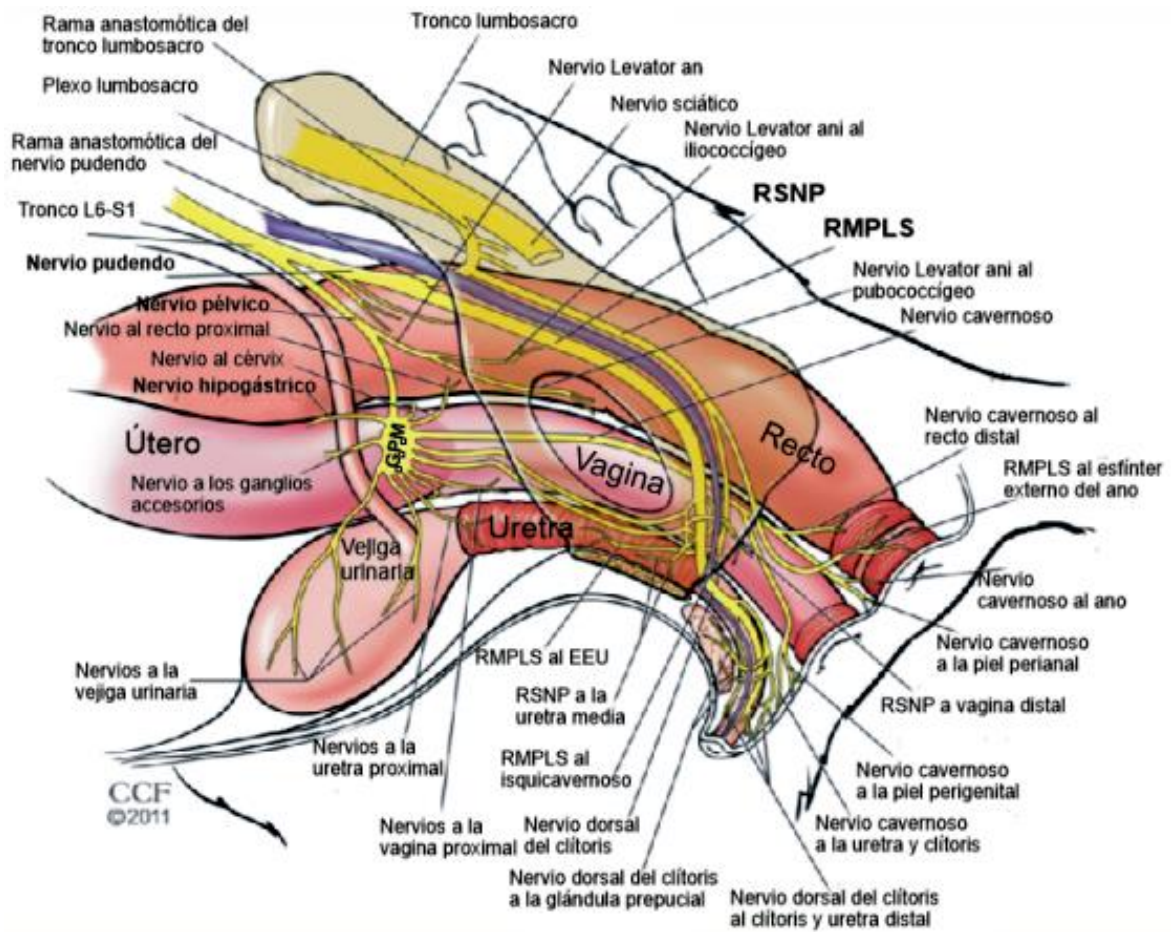


Fig. 12. Aparato urogenital de la rata hembra y su circuito nervioso periférico. RSNP, Rama sensorial del nervio pudendo. RMPLS, Rama motora del plexo lumbosacro. Modificado de Pastelín et al. 2012.

2.2.4 Ganglio pélvico mayor (GPM)

El GPM, también llamado ganglio paracervical, útero-cervical o ganglio de Frankenhauser, es una estructura que está compuesta por una población mixta de neuronas, parasimpáticas colinérgicas y simpáticas noradrenérgicas. Se encuentra lateral a la vagina (Langworthy 1965; Purinton et al. 1973). Sus dimensiones son de 2 X 2 mm (Purinton et al. 1973) y tiene forma triangular aplanada (Baljet y Drukker 1980).

Estudios anatómicos muestran que del GPM emergen ramas que se dirigen al recto, al clítoris, a la uretra, a la vejiga urinaria y la vagina (Langworthy 1965; Purinton et al. 1973). La inervación del útero y del cérvix proviene de pequeños ganglios accesorios que tienen comunicación con el GPM, juntos forman al plexo pélvico (Fig. 13) (Langworthy 1965; Purinton et al. 1973).

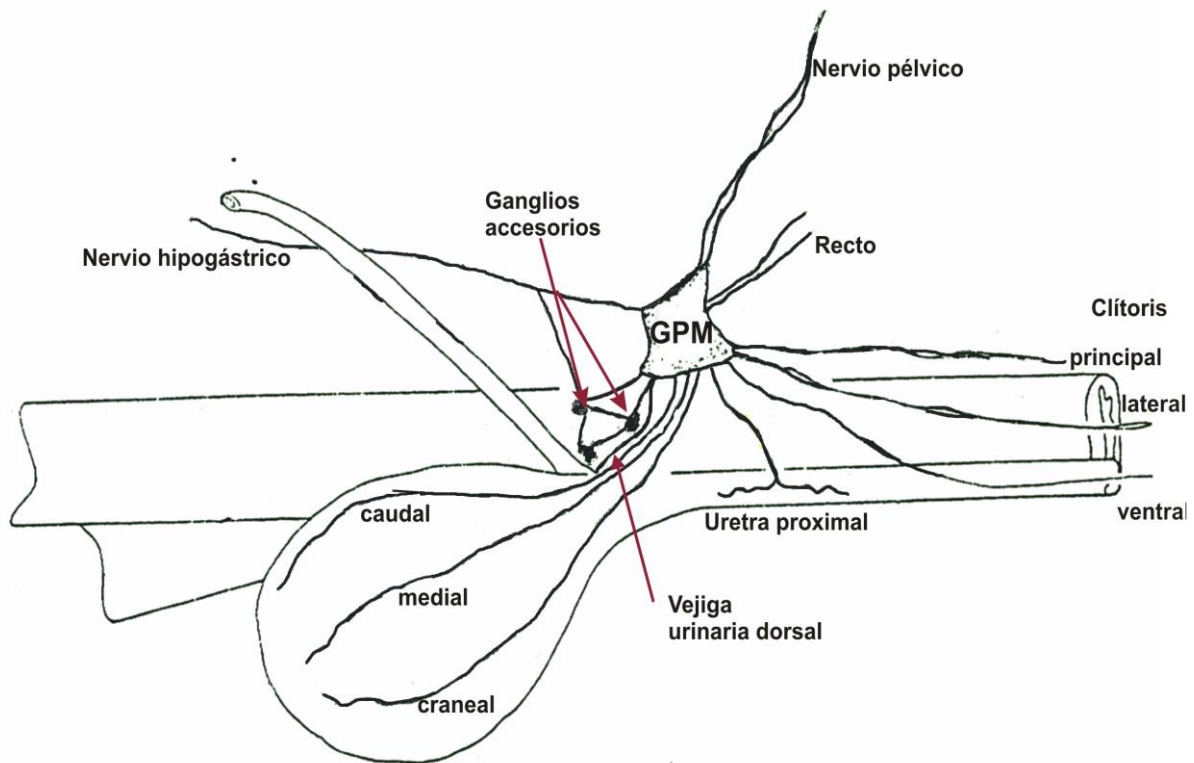


Fig. 13. Esquema de la localización y órganos blanco del plexo pélvico de la rata hembra, el cual está formado por el GPM y los ganglios accesorios. Modificado de Purinton et al. 1973.

Un grupo de nervios que emergen de la región ventral del GPM inerva a la vejiga urinaria. Sus axones viajan por el nervio pélvico (Purinton et al. 1973) y por el hipogástrico (Yoshimura y Chancellor 2003). Los nervios posganglionares del GPM llegan a la vejiga

urinaria a través de 1 a 4 troncos nerviosos y se localizan ligeramente ventral y caudal a los orificios de los uréteres (Uvelius y Gabella 1998).

Greenwood et al. (1985) mostraron que existe dimorfismo sexual en el número de neuronas del GPM, en el macho hay $14,654 \pm 936$ y en la hembra $5,892 \pm 797$. Esta diferencia es atribuible a las hormonales gonadales y al número de axones provenientes del nervio pélvico.

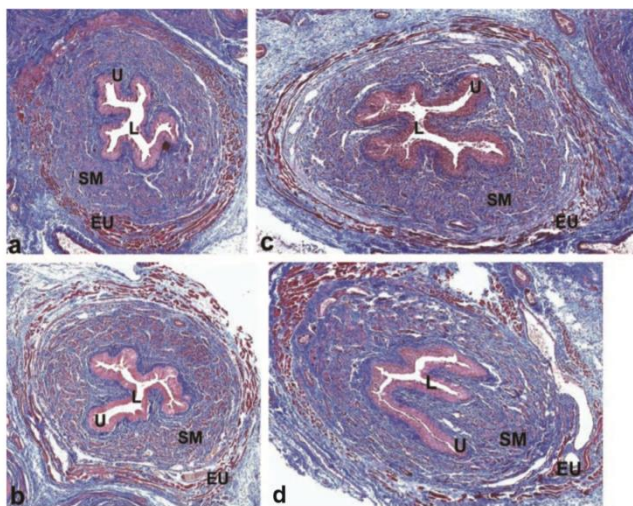
De 5 a 7 días después de la extirpación unilateral del GPM se encontraron áreas de completa denervación en la vejiga urinaria, pero se presentaron grandes áreas donde la inervación sólo fue reducida (Gabella y Davis 1998). Con la extirpación bilateral del GPM, se encontró que los nervios de la pared ventral de la vejiga urinaria rápidamente se degeneraron, mientras que los de la pared dorsal sobrevivieron. Después de una denervación parcial, los axones de los nervios contralaterales al daño cruzan al lado denervado en las anastomosis, mostrando que la inervación vesical tiene un alto grado de plasticidad (Uvelius y Gabella 1998).

2.3 Modelo de daño del parto por distensión vaginal

El modelo de distensión vaginal (DV) en ratas anestesiadas consiste en insertar un catéter Foley dentro de la vagina. Luego el globo es inflado con agua destilada y se deja así por un periodo de 4 horas para distender a la vagina pélvica (Lin et al. 1998), tiempo mayor al de la segunda etapa de un parto normal en mujeres que es de alrededor de 1 hora (Jones y Larson 2003).

El volumen infundido en el globo puede ser de 2 a 5 ml y la duración de la DV de 0.5 a 6 horas. Lin et al. (1998) emplearon en ratas vírgenes un catéter Foley 12 inflado con 2.0 ml de agua, durante cuatro horas. Mostraron que cuatro semanas posteriores a la DV, al anestesiarse al animal, el 46% de las ratas tuvieron signos de incontinencia urinaria de esfuerzo, tales como la expulsión de gotas de orina durante una prueba de estornudo inducido. En estas hembras también disminuyó el grosor de la musculatura lisa y la estriada de la pared uretral, alrededor del 50%. Sievert et al. (2001) utilizaron ratas posparto a las que distendieron la vagina con un catéter Foley 22, inflado con cinco ml de agua durante tres horas, inmediatamente después del parto. Encontraron que cuatro semanas de la DV la capacidad media vesical fue mayor en las hembras con DV que la de las controles (1.4 ml en ratas control a 2.1 ml en ratas con DV), el volumen de orina residual fue de 0.3 ml en ratas control y 1.31 ml en ratas con DV. Además, el 58% de las ratas con DV mostraron signos de incontinencia urinaria de esfuerzo.

Otros autores evitaron que la vagina de ratas vírgenes se desgarre con la DV a través de su predilatación. Insertaron gradualmente diferentes tamaños de dilatadores uretrales. Para la DV emplearon el catéter Foley 10, infundido con 3 ml de agua destilada. Observaron que cuatro días después de 30 min ó 1 hora de DV se presenta adelgazamiento y separación de las fibras del EEU (Fig. 14), así como una menor resistencia uretral a la salida de orina provocado por presión intravesical (31.4 cmH₂O, grupo con DV vs 41.1 cmH₂O, grupo sham) (Cannon et al. 2002; Damaser et al. 2003); disminuye el número de fascículos nerviosos cercanos al EEU, de 45 en los animales sham de DV a 35 en los animales con DV (Damasar et al. 2003). En otros estudios se mostró que la DV induce isquemia de la vejiga urinaria, de la uretra y de la vagina, así como hipoxia del detrusor, del epitelio vaginal y vesical y de la submucosa uretral (Damasar et al. 2005).



Cannon et al. 2002.

Fig. 14. Microfotografías de cortes transversales de la uretra 4 días después de DV sham (a), distensión breve (0.5 h de DV, b), distensión intermitente (cinco ciclos de inflar el globo por 5 minutos y desinflarlo por 1 minuto, c) y distensión prolongada (1 hora de DV, d). U, Uretra. L, Luz. SM, Músculo liso. EU, Esfínter externo de la uretra (Siglas en inglés). En la última microfotografía se observa un desarreglo y adelgazamiento de los paquetes musculares estriados uretrales (señalado con las flechas negras). Tomado de

Jiang et al. (2009) observaron que a cuatro días de la DV durante cuatro horas, la actividad electromiográfica del EEU permaneció abolida. Hubo cierto grado de recuperación a las 3 semanas (Fig. 15).

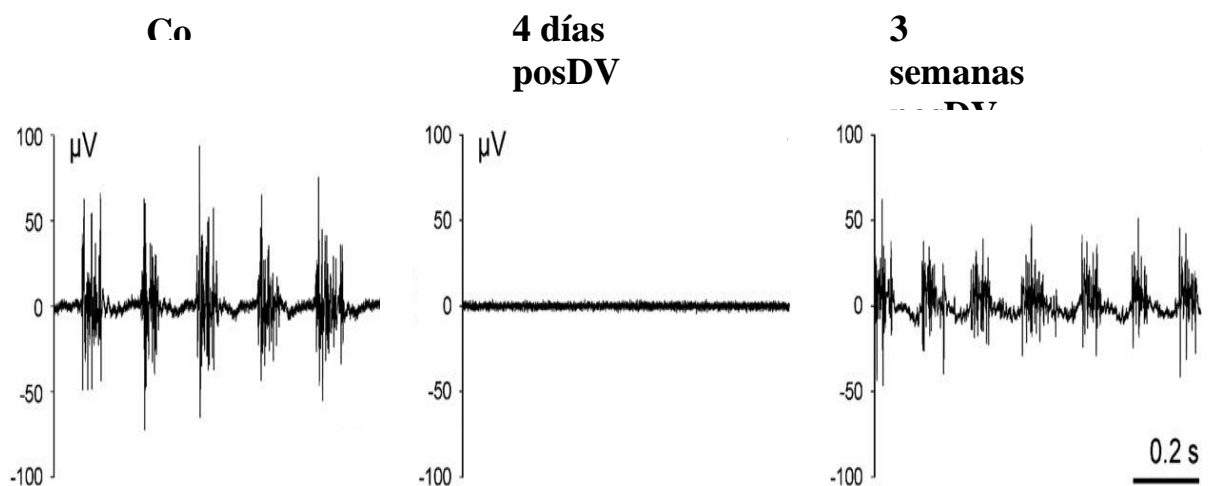


Fig. 15. Electromiogramas del EEU de la rata hembra durante la expulsión de orina inducida, en diferentes condiciones. Tomado de Jiang et al. 2009.

En otros estudios sin predilatación vaginal, la DV con un globo inflado con cuatro ml de agua durante dos horas, indujo signos de incontinencia urinaria de esfuerzo en el 83% de ratas anestesiadas y disminuyó la presión de la uretra media durante el estornudo (72.9 cmH₂O, grupo sham vs 34.1 cmH₂O, grupo con DV) (Kamo et al. 2006).

En general, el modelo de DV produce lesión anatómica de la uretra y de su inervación, lo que disminuye su resistencia. También reduce el flujo sanguíneo de la uretra, de la vagina y de la vejiga urinaria.

En el modelo de DV generalmente se atribuye la aparición de signos de la IU al daño del EEU y de su nervio, la rama motora del plexo sacro, sin embargo, la anatomía e inervación del AUG de la rata hembra muestra que adyacente a la vagina se encuentran nervios somáticos y autonómicos (Fig. 12). Por lo que es necesario conocer si la DV también afecta a otras estructuras del AUG y a otros nervios del área pélvica y perineal de la rata hembra. También es importante determinar el efecto mecánico del globo inflado sobre la uretra.

3. Hipótesis

La distensión vaginal durante cuatro horas ocluirá la uretra evitando que durante ese tiempo el animal expulse la orina, lo que resultará en una sobredistensión vesical y estiramiento de sus nervios. También presionará a los nervios autonómicos, provenientes del GPM, y estirará a los nervios somáticos que se adosan a la vagina de la rata.

4. Objetivo general

Determinar el efecto de la distensión vaginal sobre las características anatómicas del AUG y su inervación, en la rata virgen.

4.1 Objetivos específicos:

- Determinar el efecto de la distensión vaginal sobre las características del AUG y la longitud de los nervios pélvicos y perineales de la rata.
- Conocer el efecto de la distensión vaginal sobre las características histológicas de la vejiga urinaria y del GPM.
- Discernir si la distensión vaginal afecta el transporte axonal de las neuronas posganglionares del GPM y/o sensoriales vesicales.

5. Diseño experimental

5.1 Animales

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar vírgenes de 3 a 5 meses de edad. Los animales se mantuvieron en condiciones de bioterio con ciclo invertido oscuridad-luz 12/12 horas. La luz se programó para apagarse y encenderse a las 8:00 y 20:00 h. El alimento y agua se proporcionó *ad libitum*. La temperatura se mantuvo a 24 °C. Se distribuyeron en tres experimentos.

En el experimento 1 se determinaron las características anatómicas del AUG y la longitud de sus nervios en ratas con DV (n=7) o SH DV (n=7).

En el experimento 2 se determinaron las características histológicas de la vejiga urinaria y del GPM de ratas con DV (n=10) o SH DV (n=7).

En el experimento 3 se localizaron y contaron las neuronas aferentes y eferentes vesicales en ratas con DV (n=2) o SH DV (n=2).

5.2 Métodos generales

5.2.1 Anestesia

Las ratas fueron anestesiadas con la combinación de Ketamina (60 mg/kg) y Xilazina (7.5 mg/kg). Se necesitaron dosis extras aproximadamente cada 40 min.

5.2.2 Distensión vaginal

Se insertó en la vagina de la rata un catéter Foley del número 10, hasta tocar el cérvix, previamente lubricada con aceite mineral. Se suturó el catéter a la piel lateral del orificio vaginal, para asegurar la permanencia del catéter en la vagina, luego se infló con 4.0 ml de agua destilada. En los animales testigo (SH DV) sólo se insertó el catéter en la vagina por las cuatro horas pero no se infundió con el agua destilada.

5.2.3 Eutanasia

Al término de cada estudio las ratas se eutanizaron con pentobarbital sódico (100 mg/kg, vía intraperitoneal).

5.3 Análisis estadístico

Las variables de las hembras con DV y sham fueron comparadas con una t de student, para ello se utilizó Graphpad Prism 5. El valor de significancia fue de $p < 0.05$.

6. Experimento 1. Efecto de la DV sobre el AUG y su inervación

6.1 Metodología

Las ratas fueron anestesiadas, rasuradas de la región abdominal y colocadas en posición supina. Se realizó una laparotomía y con la ayuda de un microscopio estereoscópico se localizó al AUG y posteriormente se le tomaron fotos. Con una jeringa de insulina se midió el volumen de orina almacenada en la vejiga urinaria. Posteriormente, se midió con un vernier la longitud de la vejiga urinaria y de la uretra y el ancho de la vagina distal. Subsecuentemente, se cortó la sínfisis púbica y se retiró el hueso pélvico, se localizó al GPM izquierdo y se realizaron esquemas de los nervios que llegan al AUG izquierdo. Se midió con un vernier la longitud y el ancho del GPM y de los nervios que de él emergen, tomando

como punto inicial los sitios de referencia descritos en la Tabla 3. Posteriormente los animales fueron eutanizados.

Tabla 3. Referencias anatómicas para medir los nervios del AUG

| Nervio | De | A |
|---|---------------------------------|-----------------------|
| Rama viscerocutánea del N. Pélvico | Vena iliaca interna | GPM |
| N. hipogástrico | Uréter | GPM |
| Rama a los ganglios accesorios | GPM | Uréter |
| Ramas a la vejiga urinaria | GPM | Domo vesical |
| Ramas al cuello vesical y uretra proximal | GPM | Cuello vesical/uretra |
| Ramas anastomóticas con la RSNP | GPM | RSNP |
| Nervio cavernoso | GPM | RSNP |
| Rama motora del plexo lumbosacro | Primera bifurcación de la RMPLS | Uretra distal |
| Nervio dorsal del clítoris | Primera bifurcación de la RMPLS | Uretra distal |

6.2 Resultados

Se observó que durante la DV, el globo Foley distiende principalmente la región perineal (Fig. 16).



Fig. 20. Fotografía de la rata hembra en posición supina durante la DV. Catéter Foley (CF) inflado con 4 ml de agua destilada durante 4 horas, dentro de la vagina de la rata. Antes (A) y después (B) de hacer la incisión en la piel.

CF 1 cm

Fig. 16. Fotografías de la rata hembra SH DV y durante la DV, en posición supina. Catéter Foley (CF).

Al remover la piel y la musculatura abdominal notamos que la vejiga urinaria de los animales con DV se hallaba sobredistendida y con hematomas principalmente en el domo y en el cuerpo vesical, ventral y dorsal (Fig. 17).

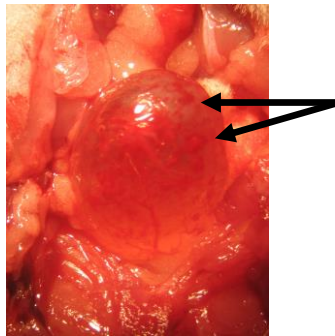
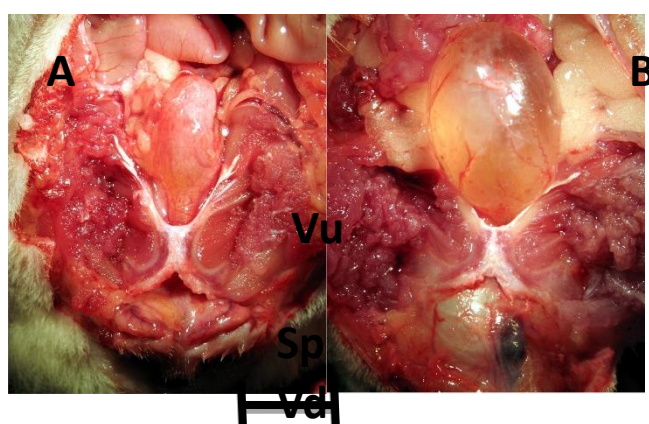


Fig. 17. Fotografía de la vejiga urinaria inmediatamente después de 4 horas de distensión vaginal. Note, los hematomas señalados con las flechas.

La DV aumentó la cantidad de orina vesical (± 0.12 ml vs DV, 1.5 ± 0.20 ml; $p < 0.001$) y estiró a (SH DV, 9.83 ± 0.25 mm vs DV, 15.83 ± 0.25 mm $p < 0.0001$) y a la vejiga urinaria (SH DV, 12 ± 0.53 20.17 ± 1.09 mm de longitud; $p < 0.0001$). La uretra (SH DV, 23.07 ± 0.87 mm vs DV, 25.57 ± 0.87 mm de longitud; $p = 0.07$) pero el globo presionó en su parte medio-caudal contra el hueso pélvico, provocando su oclusión (Fig. 18).



Vu

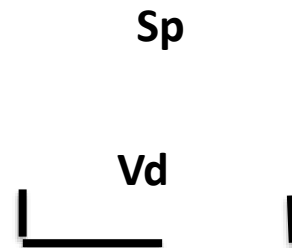
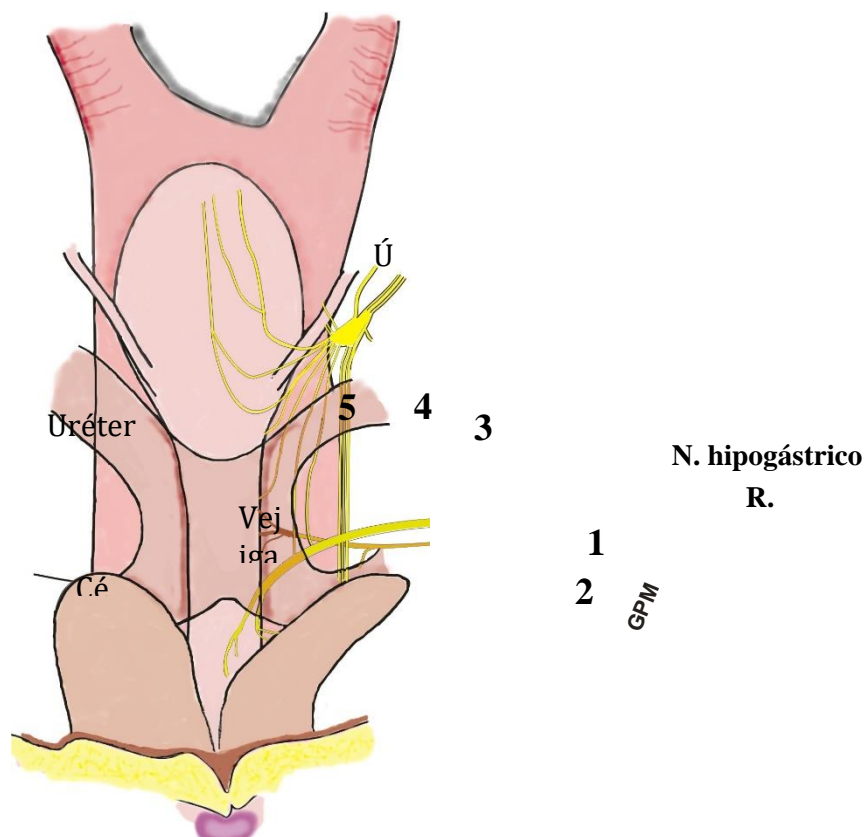


Fig. 18. Fotografías del AUG de la rata hembra SH DV (A) y con DV (B). Vu, Vejiga urinaria. Sp, Sínfisis púbica. Vd, Vagina distal.

Al remover parte del hueso pélvico se observó que varias estructuras nerviosas están en estrecha relación anatómica con los órganos urogenitales. En animales sham, el GPM se localizó lateral al cérvix y al recto, y midió 4.33 ± 0.54 mm de largo y 2.20 ± 0.27 mm de ancho. Se encontró que la rama viscerocutánea del nervio pélvico y el nervio hipogástrico llegan al GPM. De este ganglio emergen 14 ramas (Fig. 21). Siguiendo un orden en dirección contraria al giro de las manecillas del reloj las dos primeras ramas que se originan son la rama accesoria ventral y dorsal, que emergen de la parte craneal del GPM y pasan ventral y dorsal al uréter, respectivamente (ramas 1 y 2), y se comunican con los ganglios accesorios para inervar al cérvix y al útero. Posteriormente emerge un tronco nervioso de la parte craneomedial del GPM, el cual se divide en tres ramas, la rama craneal, medial y caudal que llegan al domo vesical (ramas 3,4 y 5). Caudal a estos, emerge un nervio que se divide en dos ramas, la primera va al cuello vesical y la segunda a la uretra proximal (ramas 6 y 7). Enseguida emergen dos ramas anastomóticas que comunican al GPM con la rama sensorial del nervio pudendo (ramas 8 y 9). Inmediatamente después emergen un conjunto de nervios que acompañan al nervio cavernoso. Estas pasan dorsal a la rama sensorial del nervio pudendo y llegan a la vagina y al recto (ramas 10-13). Por último emerge la rama rectal (rama 14) que inerva al recto.

Caudal al GPM se observaron otros nervios. La rama motora del plexo sacro corre paralelo a la rama sensorial del nervio pudendo. Antes de inervar al EEU, cruza dorsal a la rama sensorial del nervio pudendo y se divide en tres o cuatro ramas. La rama sensorial del

nervio pudiendo correr ventral a la vagina y a la uretra distal. Más caudal, da origen al nervio dorsal del clítoris (NDC). Este último se divide en tres o cuatro ramas principales. Algunos inervan a la uretra y a la vagina distal, a las glándulas prepuciales y al clítoris (Fig. 19).



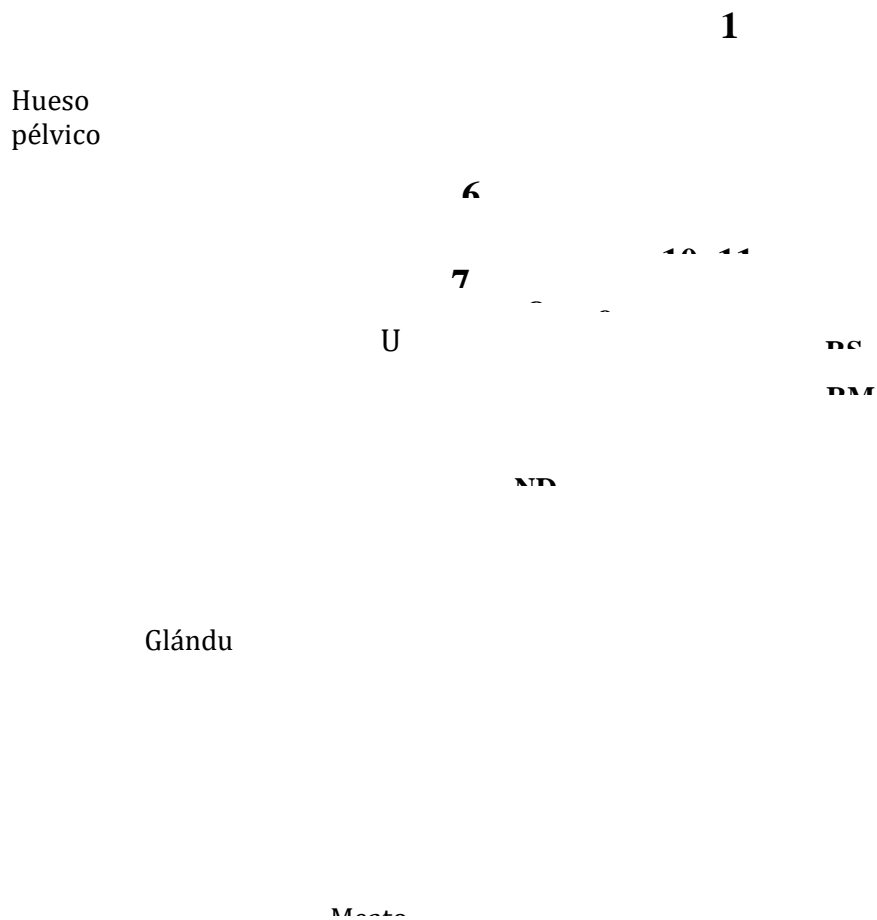


Fig. 19. Esquema de la inervación del AUG de la rata hembra. Las ramas autonómicas emergen del GPM y las somáticas del nervio pudendo y plexo sacro. La inervación es bilateral pero sólo se muestra del lado izquierdo. RSNP, rama sensorial del nervio pudendo; RMPLS, rama motora del plexo lumbosacro; NDC, nervio dorsal del clítoris.

Observamos también que cuatro o cinco fascículos de la rama viscerocutánea, llegan al GPM. Uno de estas se comunica con las dos ramas del nervio hipogástrico y forman un plexo nervioso. El otro pasa directo en el la parte caudal del GPM para dar origen al nervio cavernoso. Dos vasos sanguíneos corren paralelos a la rama viscerocutánea y llegan al GPM, en su región lateral. Los nervios que se originan del GPM medial dan origen a todas las ramas que inervan a los órganos del AUG (Fig. 20).

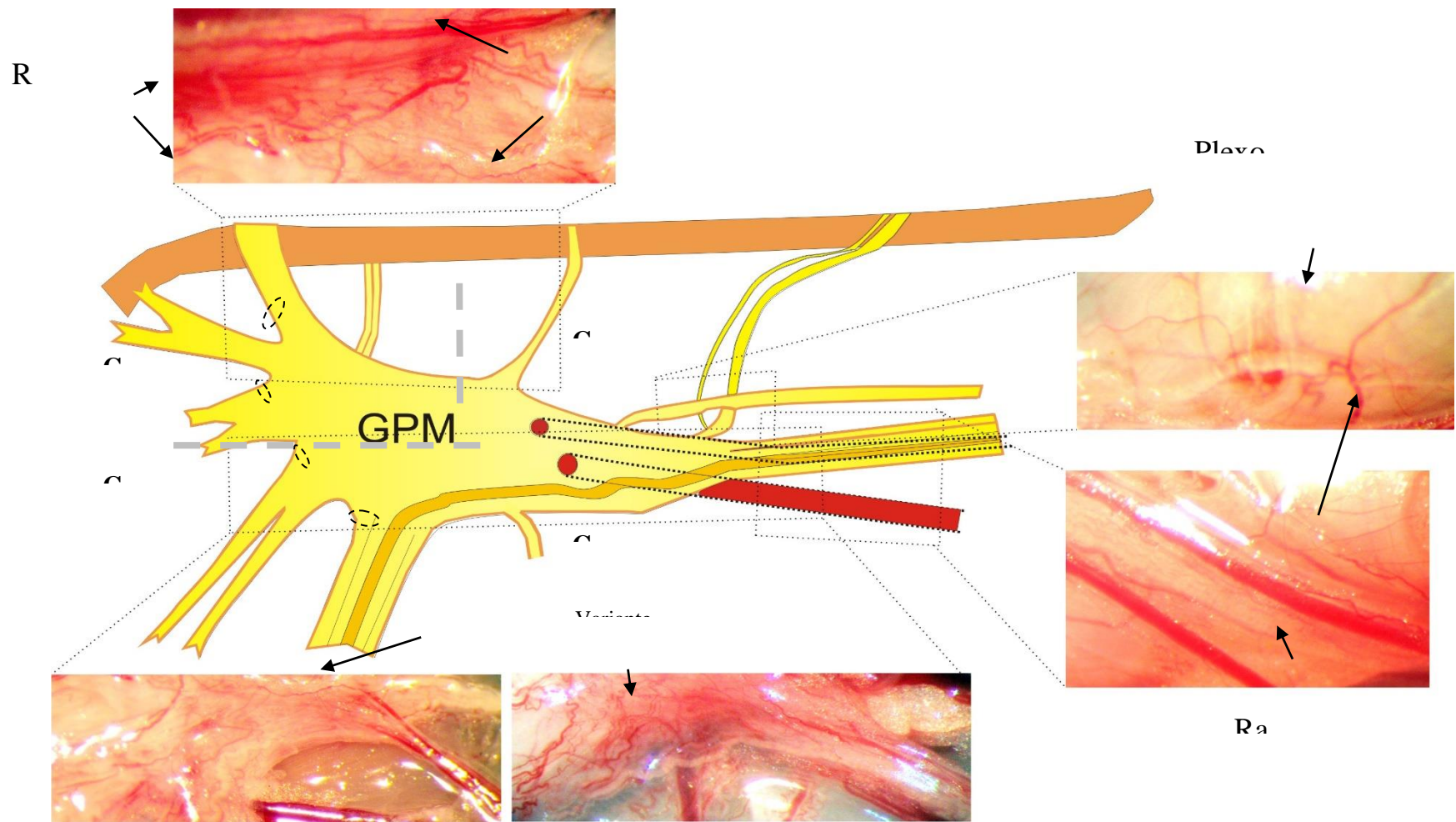


Fig. 20. Esquema del GPM izquierdo de la rata hembra y fotografías representativas de diferentes regiones. Note las regiones del GPM: CrMed, craneomedial. CdMed, caudomedial. CrLat, craneolateral. CdLat, caudolateral.

La DV desplazó al GPM hacia el cuello vesical y estiró a la rama motora del plexo lumbosacro y al NDC. (Fig. 21). Incrementó significativamente la longitud de la rama viscerocutánea, del nervio hipogástrico y de las ramas que emergen del GPM (excepto a las ramas del cuello vesical y uretra proximal). El nervio cavernoso y las ramas que corren paralelo a este pasaron de una posición lateral a una dorsal (Tabla 4).

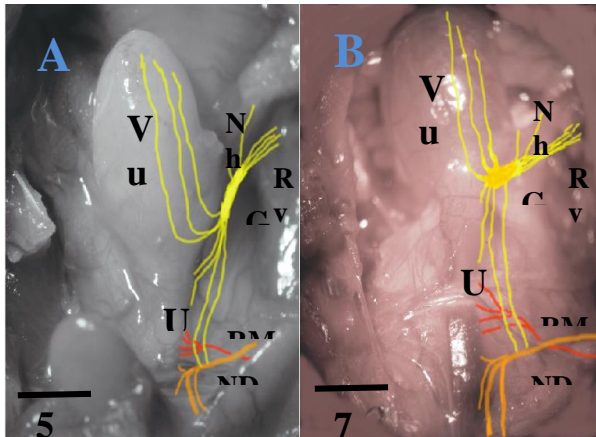


Fig. 21. Fotografías del AUG de la rata SH DV (A) y con DV (B). **Note** el desplazamiento del GPM y el estiramiento de los nervios. Nh, nervio hipogástrico. Rv, rama viscerocutánea. RMPLS, rama motora del plexo lumbosacro. NDC, nervio dorsal del clítoris. Vu, vejiga urinaria. U, uretra.

Tabla 4. Estiramiento de los nervios somáticos, aferentes del GPM y sus ramas que emergen de él (mm).

| | Sham DV | DV | Estiramiento (Δ) |
|----------------------------|------------------|-------------------|---------------------------|
| NDC | 10.1 \pm 1.0 | 13.92 \pm 1.0 | 3.82* |
| RMPLS | 10.76 \pm 1.67 | 15.50 \pm 0.05 | 4.74* |
| Rama viscerocutánea | 1.65 \pm 0.26 | 5.16 \pm 0.44 | 3.51* |
| Nervio hipogástrico | 1.708 \pm 0.25 | 5.21 \pm 0.61 | 3.51* |
| Rama accesoria ventral (1) | 2.0 \pm 0.41 | 4.89 \pm 0.49 | 2.89* |
| Rama vesical craneal (3) | 13.76 \pm 0.89 | 22.25 \pm 0.65 | 8.49* |
| Rama vesical medial (4) | 15.65 \pm 0.26 | 23.79 \pm 0.5 6 | 8.14* |
| Rama vesical caudal (5) | 16.64 \pm 0.44 | 24.52 \pm 0.62 | 7.88* |
| Rama al cuello vesical (6) | 5.70 \pm 0.33 | 6.70 \pm 0.38 | 1.0 |
| Rama uretral proximal (7) | 6.34 \pm 0.48 | 8.12 \pm 0.87 | 1.78 |
| Ramas anastomóticas (8,9) | 10.94 \pm 0.45 | 13.36 \pm 1.7 | 2.42* |
| N. cavernoso (10-13) | 10.37 \pm 0.34 | ----- | ----- |

Valores media \pm error estándar. t de *student*, *p<0.05. Los números en paréntesis indican el número de rama que emerge del GPM, ver Fig. 21.

6.3 Discusión

La clara relación anatómica del canal de parto con el tracto urinario inferior, la musculatura pélvica y los nervios en las áreas pélvica y perineal sugiere que durante la distensión del canal de parto por el feto también se rompen los nervios y los músculos que controlan la función urinaria y sexual.

El modelo de DV ha sido ampliamente utilizado para conocer los mecanismos fisiológicos que se dañan durante el parto e inducen incontinencia urinaria de esfuerzo (Cannon et al. 2002; Jiang et al. 2009; Kamo et al. 2006; Lin et al. 1998; Rocha et al. 2007; Sievert et al. 2001). En el presente estudio observamos que el catéter infundido con agua destilada dentro de la vagina no permanece en la cavidad pélvica sino que se desplaza a la región perineal, afectando así a nervios somáticos como el dorsal del clítoris y a órganos tales como la vagina y la uretra distal. Lesión a estos órganos puede inducir disfunciones sexuales como problemas para llegar al orgasmo, dolor durante el coito y deseo sexual disminuido (Laumann et al. 1999).

Este trabajo muestra una distensión vesical como consecuencia indirecta de la DV, ocasionado por la retención urinaria durante las 4 h de DV, se presume que el globo presiona a la uretra media sobre el hueso pélvico, evitando que el animal expulse orina. Esto sumado al hecho de que la combinación de Ketamina-Xilazina tiene un efecto diurético, lo que aumenta la producción de orina (Watson et al. 2002). Se ha reportado que el abuso de consumo de la Ketamina como una droga alucinógena causa síntomas del tracto urinario inferior, cistitis y necrosis renal (Middela y Pearce 2011). El volumen de la orina almacenada en la vejiga urinaria de los animales con DV concuerdan con la máxima capacidad de llenado vesical que es de alrededor de 1.5 ml, en ratas vírgenes (Acar et al. 2007; Gabella y Uvelius 1990; Lin et al. 1998). La distensión vesical puede ser causal de la aparición de vejiga urinaria hipocontráctil como resultado del daño a su inervación, ya sea a través de la separación de los mecanorreceptores con las fibras de las neuronas sensoriales o del daño a las uniones neuromusculares, o a sus componentes tisulares. Se ha descrito que el 11% de mujeres con partos asistidos con instrumentos quirúrgicos y de más de 700 min de duración de la primera y segunda etapa del parto sufren de retención urinaria posparto (Kekre et al. 2011), caracterizado por la incapacidad de orinar a pesar de un esfuerzo persistente (Haylen et al. 2010). La ausencia de expulsión de orina después de las seis horas posparto obliga a la

utilización del catéter para vaciar a la vejiga urinaria, con riesgo de infecciones urinarias (Kavia et al. 2006).

Nuestros resultados de la longitud uretral en los animales SH DV coinciden con Praud et al. (2003), ya que ellos encontraron que la uretra mide alrededor de 22 mm, del cuello vesical al meato urinario y están en desacuerdo con Kim et al. (2007), ya que ellos encontraron que la longitud uretral es de alrededor de 15 mm. Diferencias entre cepas y método de análisis pueden ser las causantes de esta discrepancia.

Estudios anatómicos y electrofisiológicos previos han mostrado que el modelo de DV daña al EEU y a su nervio por lo que se ha indicado que ese es el principal mecanismo que origina a la incontinencia urinaria de esfuerzo y dicho efecto se recupera en pocas semanas dependiendo del tiempo de duración de la distensión vaginal (seis semanas después de la DV, Pan et al. 2007). Sin embargo, el origen de esta patología puede estar también asociado al daño a la vejiga urinaria y de su inervación.

La inervación autonómica del AUG no ha sido bien detallada. En el presente estudio encontramos que la ubicación del GPM fue similar a lo que reportó Purinton et al. (1973). Aunque ellos mencionaron que éste ganglio es más pequeño (2 x 2 mm), comparado a lo que observamos nosotros (4 x 2 mm). Con respecto a los nervios que emergen del GPM, sólo se han reportado breves descripciones de dichas ramas (Langworthy 1965; Purinton et al. 1973), ya que estas ramas son difíciles de discernir del tejido conectivo y vasos sanguíneos.

En nuestros resultados mostramos que los nervios vesicales corren desde el GPM a lo largo de la vejiga urinaria hasta su domo, corroborando los resultados de Purinton et al. 1973. Estos nervios son colinérgicos ya que emergen del GPM, llegan a la vejiga urinaria a través de uno a cuatro troncos nerviosos y se localizan ligeramente ventral y caudal a los orificios de los uréteres (Uvelius y Gabella 1998). Hemos observado dos ramas que emergen del GPM y se dirigen hacia los ganglios accesorios. Estos son muy importantes ya que se ha reportado que inervan al cérvix y útero (Houdeau et al. 1995).

Este estudio tiene una limitante con respecto a la inervación de la vagina proximal ya que sólo caracterizamos las ramas que emergen del GPM de su parte ventral y no de su parte dorsal, es probable que su inervación provenga de ramas que emergen de esa región del GPM. Se ha sugerido que los nervios que van al cuello vesical y uretra proximal ser adrenérgicos (Tammela et al. 1990).

La lesión de los nervios pélvicos y perineales por la DV se da por dos procesos, el de compresión y el de estiramiento. Por ejemplo, la porción más distal de la rama motora del plexo lumbosacro se estiró un 44%. Este porcentaje es mayor a lo reportado en un modelo de simulación de estiramiento del nervio pudiendo durante la segunda etapa del parto, en mujeres (Lien et al. 2005). En este modelo se encontró que este nervio se estira en diferente porcentaje de acuerdo al punto de fijación asignado, entre más distal sea este punto el porcentaje se va incrementando, de un 8% en el nivel de los forámenes sacros, a un 13% en las espinas isquiales, hasta un 27% en su ramificación donde da origen a varias ramas, incluida la que va al esfínter uretral. Sin embargo, estudios en ratas ha mostrado que el estiramiento de hasta un 74% de este nervio, da como resultado que inmediatamente posterior a la lesión se produce disfunción de este nervio pero a los 30 minutos hay una recuperación en su función (Sajadi et al. 2012).

En modelos de estiramiento de nervios se ha encontrado un decremento de un 55% en el número de microtúbulos y de la proteína tau (molécula que mantiene unidos a los microtúbulos a lo largo del axón) con respecto a los nervios intactos (Kikukawa et al. 2003). En otro estudio se encontró que la región intermodal y nodal aumentan su longitud significativamente, hasta llegar a una ruptura a la altura del nodo de Ranvier (Wang et al. 2010). Por tanto, sugerimos que estos procesos también se presentan con la DV.

7. Experimento 2. Efecto de la DV sobre las características histológicas de la vejiga urinaria y del GPM

7.1 Metodología

En las ratas con DV o SH DV se extirpó la vejiga urinaria y el GPM derecho. Las estructuras colectadas fueron sumergidas en formalina y se procesaron para la tinción de Hematoxilina-Eosina. La parte media de la vejiga urinaria fue seccionada transversalmente (vejiga urinaria) y longitudinalmente (GPM) a 7 μm de grosor. Se tomaron fotos a 5, 40 y 100x (Fig. 22). Con el programa Axiovision 4.8®, se analizaron 3 cortes para medir el grosor de la parte ventral y dorsal de la vejiga urinaria (Fig. 24). Del GPM se midió el área y el perímetro, así como el área y el diámetro de 30 de sus neuronas. Se comparó entre las ratas con DV y los animales SH DV el grosor de cada capa vesical: epitelial, submucosa y muscular, así como el área, y el perímetro del GPM, el área y el diámetro de sus neuronas.

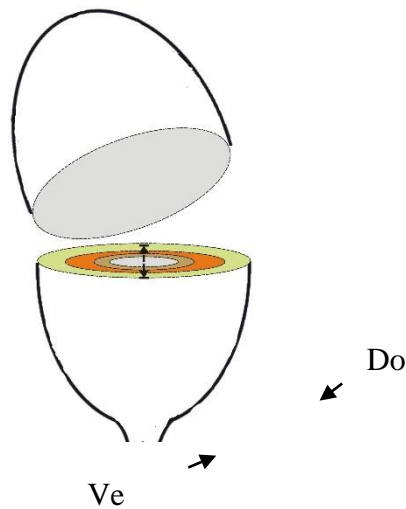


Fig. 22. Esquema de la sección media de la vejiga urinaria de la rata hembra.

7.2 Resultados

7.2.1 Vejiga urinaria

La vejiga urinaria presenta 4 capas. De la luz hacia el exterior la primera capa es la epitelial, compuesta de epitelio de transición dividida a su vez en dos regiones, la superficial y la basal. Estos forman pliegues a lo largo de la luz vesical. Le continúa la lámina propia, compuesta principalmente de tejido conectivo y vasos sanguíneos. Posteriormente se encuentra la capa muscular lisa longitudinal interna y circular externa. Finalmente se encuentra la capa adventicia compuesta de tejido graso (Fig. 23).

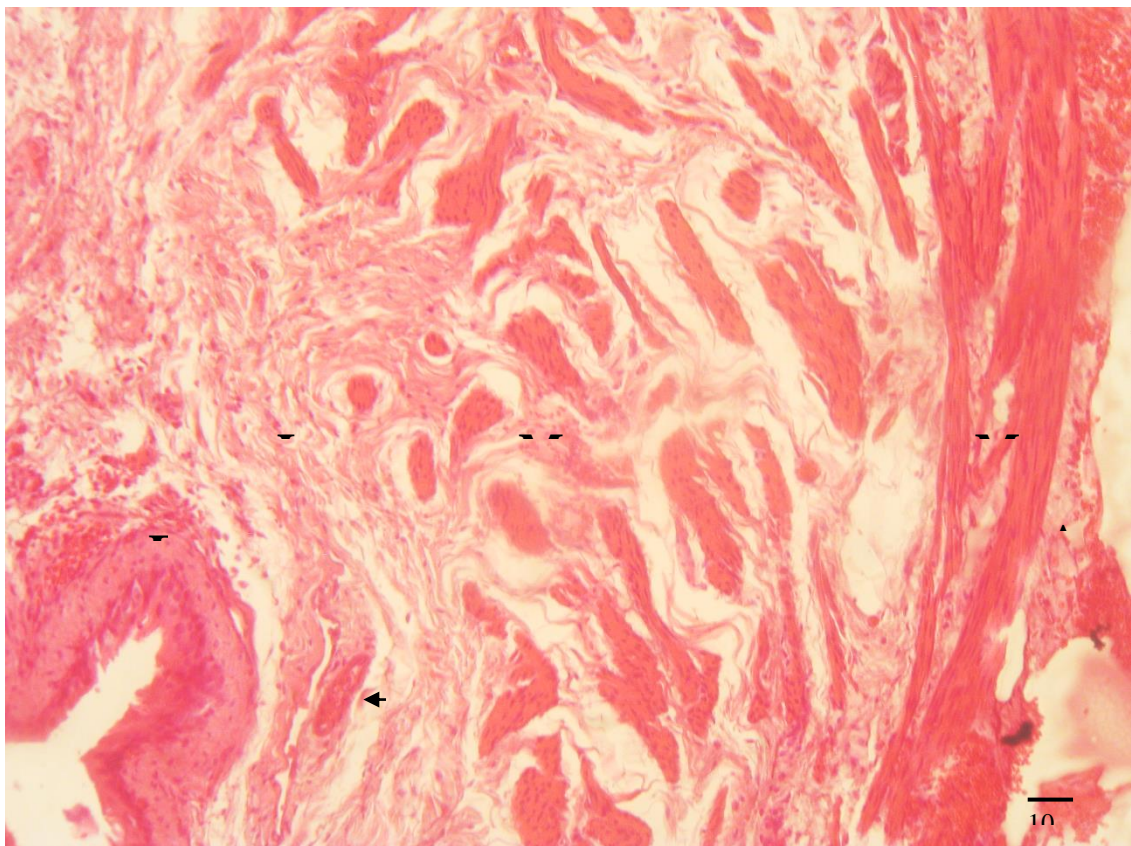
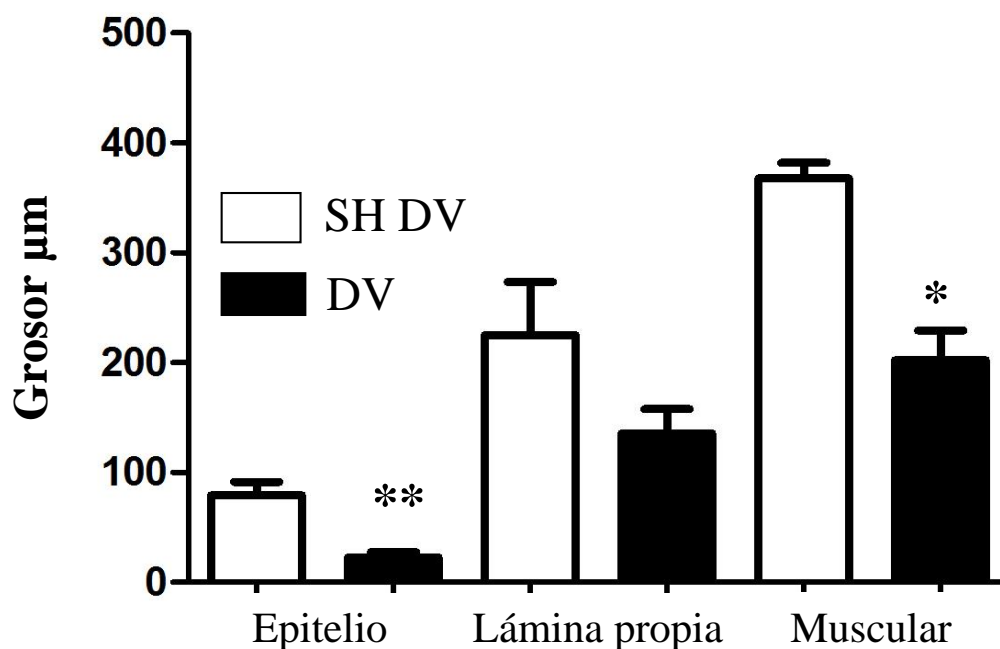


Fig. 23. Fotografía de las capas vesicales de la rata hembra. E, epitelio. Lp, lámina propia, MI, músculo liso longitudinal. Mc, músculo liso circular. Ad, adventicia. La flecha indica un vaso sanguíneo en la lámina propia.

La DV disminuyó significativamente el grosor de las capas epitelial ($p=0.031$) y muscular ($p=0.015$), pero no el de la lámina propia ($p=0.10$) (Tabla 5, Gráfica 1).

| Tabla 5. Grosor de las capas vesicales (μm) | | | |
|--|--------------------|-------------------|--------------------|
| | Epitelio | Lámina propia | Muscular |
| Sham | | | |
| H206 | 66.83 | 176.63 | 353.79 |
| H213 | 91.56 | 273.56 | 381.97 |
| Media \pm E.E. | 79.20 \pm 12.37 | 225.1 \pm 48.47 | 367.9 \pm 14.09 |
| DV | | | |
| H207 | 8.84 | 69.33 | 124.1 |
| H208 | 19.52 | 150.71 | 264.32 |
| H214 | 27.11 | 205.66 | 189.24 |
| H216 | 19.55 | 122.86 | 171.58 |
| H291 | 38.99 | 128.61 | 261.83 |
| Media \pm E.E. | 22.80 \pm 4.98** | 135.4 \pm 22.07 | 202.2 \pm 27.04* |

Capas vesicales



Gráfica 1. Grosor de las capas vesicales de animales SH DV y con DV. Valores representan medias \pm error estándar. *, diferencias significativas con respecto al grupo SH DV.

La DV indujo extravasación de leucocitos y de eritrocitos en la lámina propia vesical (Fig. 24).

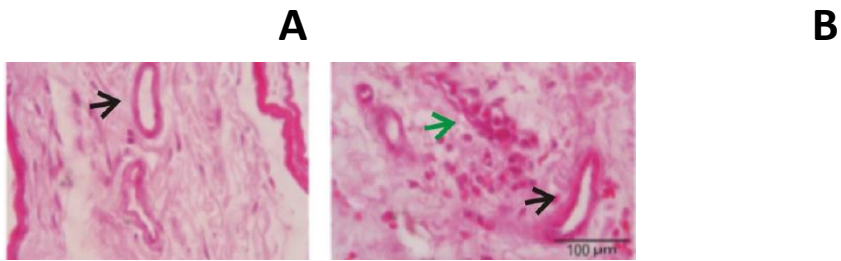


Fig. 24. Fotografías de la lámina propia del grupo SH DV (A) y de DV (B). Las flechas señalan los vasos sanguíneos, leucocitos y eritrocitos. Hematoxilina-Eosina.

7.2.2 Ganglio pélvico mayor

El GPM de la rata hembra es una estructura que contiene somas, axones, células de la glía que rodean a los somas, fibroblastos, tejido conectivo y vasos sanguíneos con eritrocitos (Fig. 25).

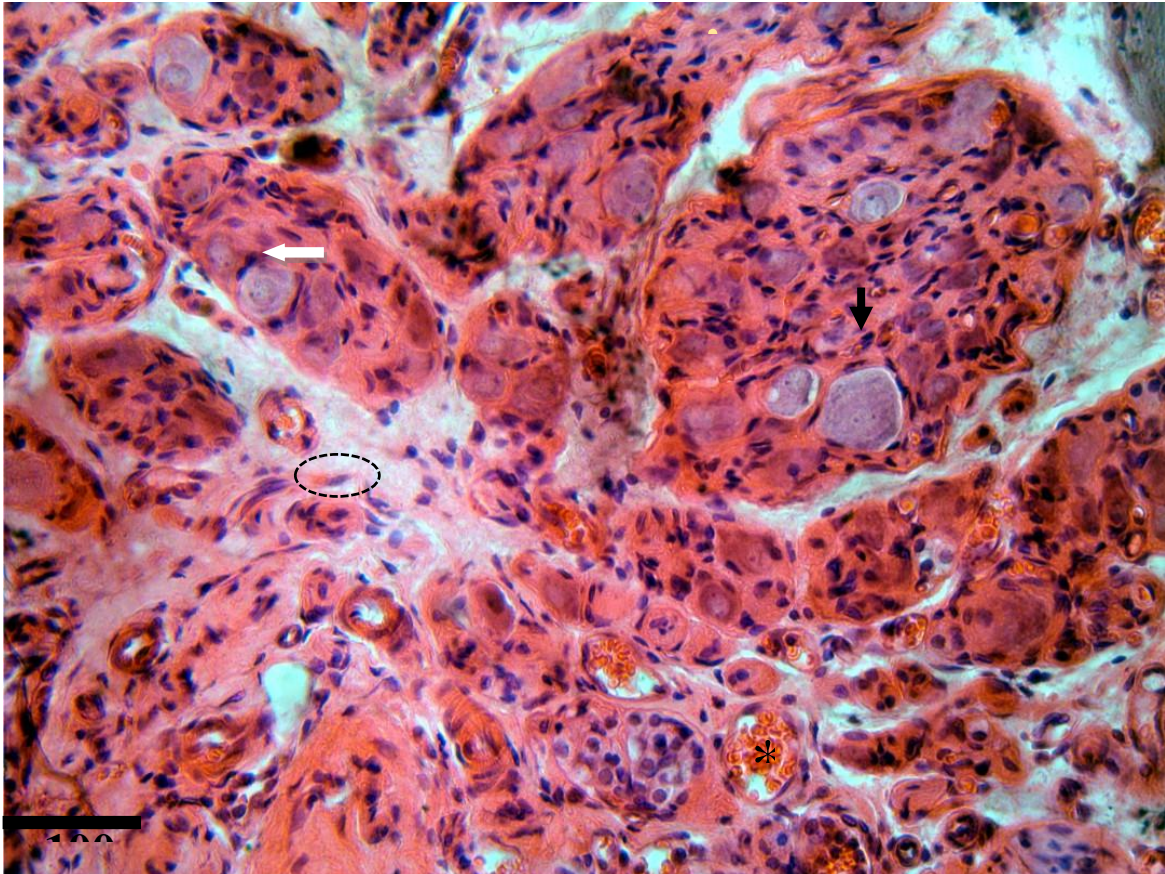


Fig. 25. Fotografía del GPM derecho del animal teñido con Hematoxilina-Eosina. Note los diferentes tipos células que son señaladas con los símbolos: flecha negra, neurona; flecha blanca, células gliales; asterisco negro, vaso sanguíneo con eritrocitos; asterisco amarillo, axones; círculo negro, tejido conectivo; óvalo con línea punteada, fibroblasto.

Al GPM llegan axones de la rama viscerocutánea del nervio pélvico y del nervio hipogástrico. Posee dos regiones con somas, la primera se ubica en donde confluyen el nervio hipogástrico y la rama viscerocutánea del nervio pélvico y la segunda en la parte más medial, cerca de la vejiga urinaria. Sus axones corren entre las dos regiones con somas y en su parte caudal dan origen al nervio cavernoso (Fig. 26). La DV aglomeró la segunda región de somas con los axones que corren en la parte media del GPM (Fig. 26).

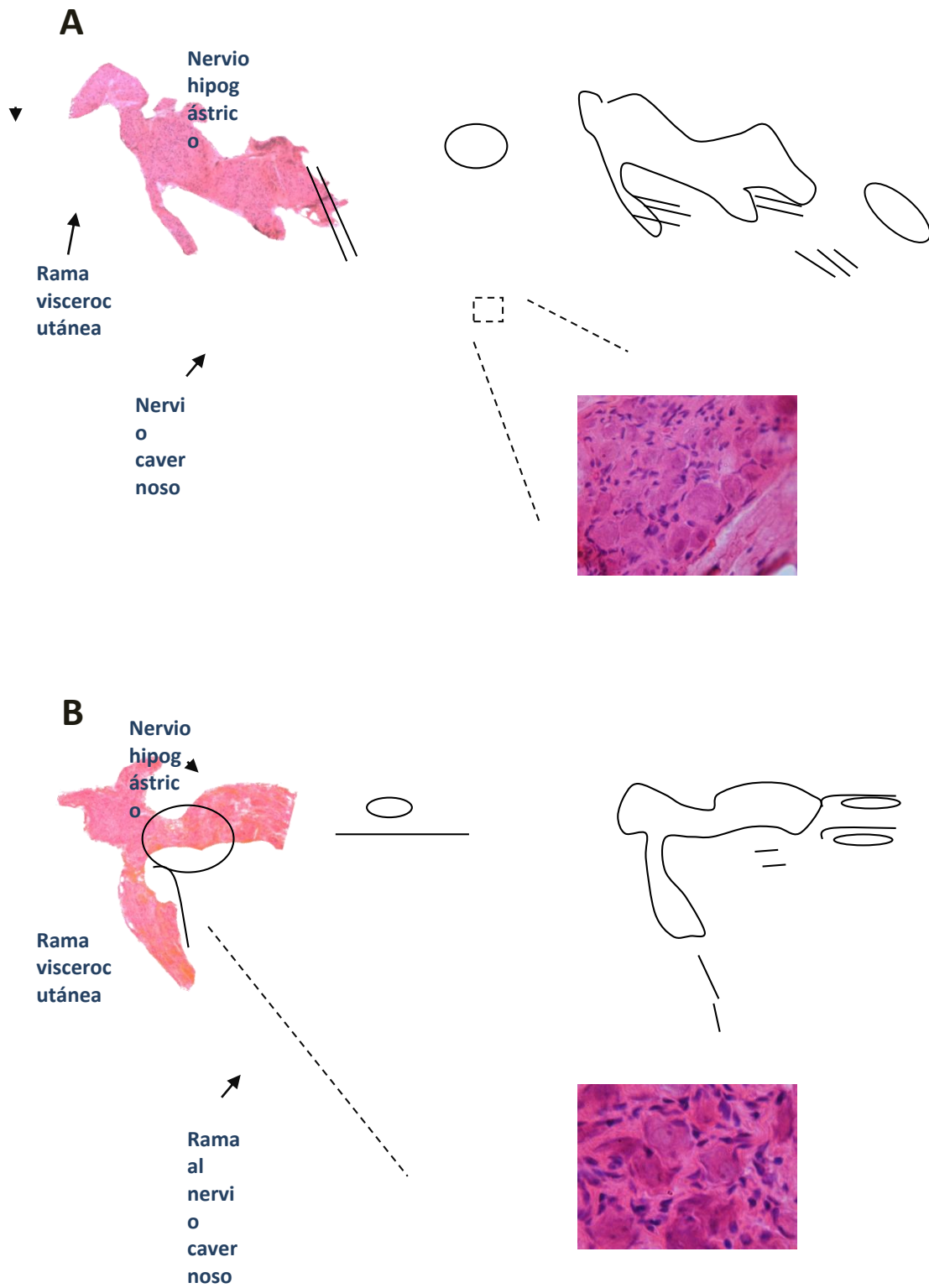


Fig. 26. Reconstrucciones y esquemas del GPM derecho de un animal SH DV (A) y uno con DV (B). Los óvalos y las líneas de los esquemas representan las regiones del GPM donde se encuentran los somas y los axones, respectivamente. Fotos de neuronas a 100X.

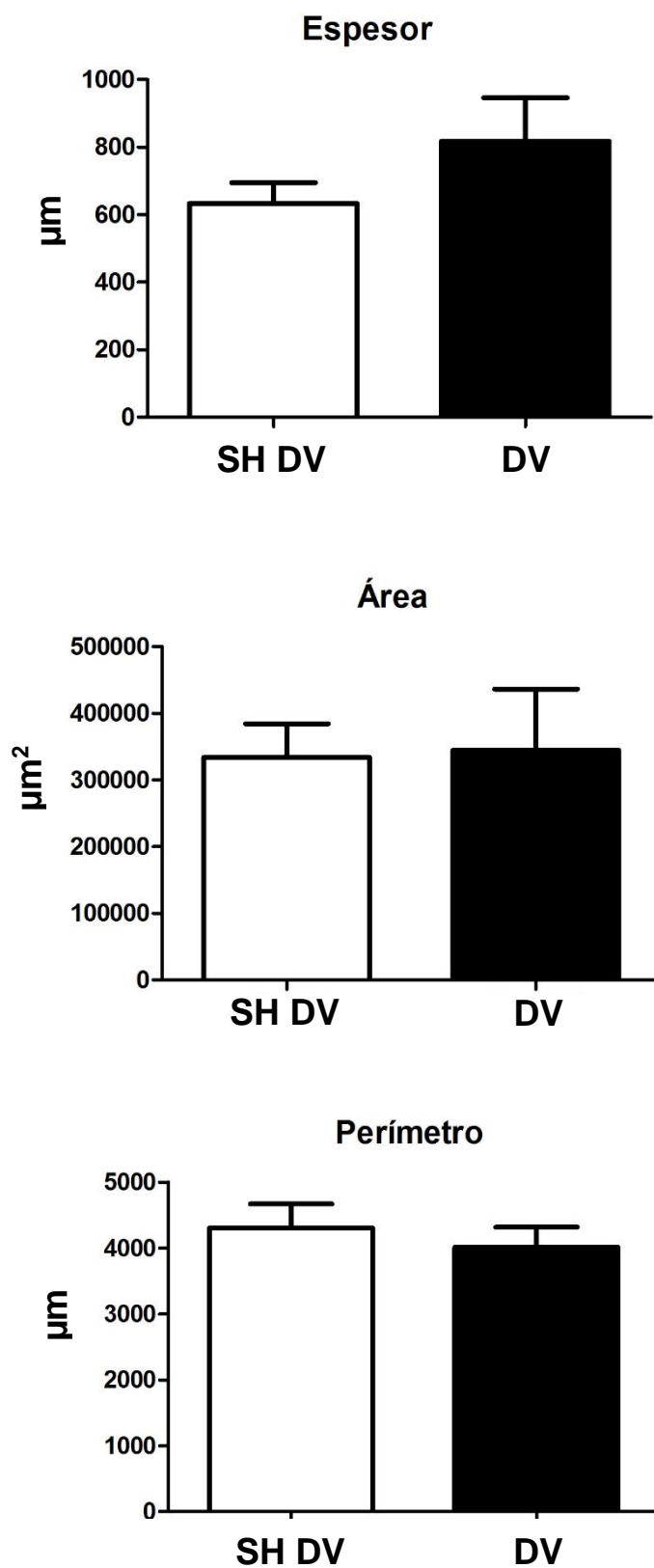
La DV no modificó el espesor, el área ni el perímetro del GPM ($p=0.23$, $p=0.91$, $p=0.55$; respectivamente, Gráfica 2). Las Tablas 6 y 7 resumen los valores de espesor, área y perímetro del GPM de animales SH DV y con DV.

Tabla 6. Parámetros del GPM del grupo SH DV

| Núm. de hembra | Espesor (μm) | Área μm^2 | Perímetro (μm) |
|------------------|---------------------------|----------------------|-----------------------------|
| 126 | 840 | 505263,02 | 5176,05 |
| 221 | 490 | 294808,94 | 3415,53 |
| 213 | 672 | 202157,65 | 4053,72 |
| 242 | 525 | 371801,20 | 5126,10 |
| 149 | 637 | 295337,93 | 3769,92 |
| Media \pm E.E. | 632.8 \pm 61.85 | 333900 \pm 50580 | 4308 \pm 358.7 |

Tabla 7. Parámetros del GPM del grupo con DV

| Núm. de hembra | Espesor (μm) | Área μm^2 | Perímetro (μm) |
|------------------|---------------------------|----------------------|-----------------------------|
| 151 | 1134 | 178453,83 | 3903,50 |
| 154 | 910 | 655075,75 | 4593,30 |
| 220 | 784 | 254797,16 | 3161,73 |
| 290 | 903 | 185252,92 | 3612,63 |
| 291 | 357 | 450155,29 | 4805,39 |
| Media \pm E.E. | 817.6 \pm 128.3 | 344700 \pm 91810 | 4015 \pm 305.1 |



Gráfica 2. Gráficas del espesor, área y perímetro del GPM de animales SH DV y con DV. Valores media \pm error estándar.

En los animales SH DV el rango del área de las neuronas del GPM fue de 141-220 μm^2 y el rango del diámetro fue de 14-18 μm . La DV no modificó el área ni el diámetro de las neuronas del GPM ($p=0.39$, $p=0.38$, respectivamente; tablas 8 y 9).

Tabla 8. Características morfométricas de 30 neuronas del GPM en los animales SH DV

| Núm. de hembra | Área μm^2 | Diámetro |
|------------------|----------------------|--------------------|
| 126 | 186,8 \pm 16,82 | 16,85 \pm 0,5190 |
| 221 | 141,0 \pm 7,374 | 13,93 \pm 0,4149 |
| 213 | 170,6 \pm 14,22 | 15,61 \pm 0,6567 |
| 242 | 148,2 \pm 9,618 | 15,10 \pm 0,6172 |
| 149 | 220,0 \pm 10,65 | 18,66 \pm 0,6605 |
| Media \pm E.E. | 173,3 \pm 14,22 | 16,03 \pm 0,8 |

Tabla 9. Características morfométricas de 30 neuronas del GPM en los animales con DV

| Núm. de hembra | Área μm^2 | Diámetro |
|------------------|----------------------|--------------------|
| 151 | 226,4 \pm 14,23 | 17,69 \pm 0,6893 |
| 154 | 260,8 \pm 14,89 | 21,43 \pm 0,8739 |
| 220 | 204,7 \pm 18,25 | 16,72 \pm 0,7146 |
| 290 | 139,4 \pm 9,194 | 14,98 \pm 0,7257 |
| 291 | 154,5 \pm 9,587 | 15,75 \pm 0,5468 |
| Media \pm E.E. | 197,2 \pm 22,49 | 17,31 \pm 1,25 |

7.3 Discusión

Los resultados histológicos del número y la composición de cada capa de la vejiga urinaria concuerdan con lo reportado en otros estudios (Franco et al. 2011; Hanna-Mitchell et al. 2013). La capa epitelial es una importante barrera que permite que se almacene la orina. Es un tejido sensorial dinámico que juega un papel importante en la señalización del estado de llenado vesical al sistema nervioso central, a través de la activación de receptores purinérgicos en las terminales nerviosas, por lo que la lesión a las células epiteliales podría alterar la actividad vesical e inducir vejiga hipo e hiperactiva (Birder y Andersson 2013; Hanna-Mitchell et al. 2013). La disminución del grosor de esta capa en los animales con DV indica una descamación de las células epiteliales apicales, lo que provocaría una menor activación de mecanorreceptores y de fibras sensoriales que sensan los cambios de llenado vesical. Se ha mostrado que la distensión vesical de ratas hembra durante tres horas disminuye el grosor del urotelio, efecto que dura de 24 a 48 h. Además, también se presenta edema y células inflamatorias en la submucosa (Leppilahti et al. 1999).

La lámina propia está compuesta principalmente de tejido conectivo y vasos sanguíneos. Aunque la DV no modificó el grosor de esta capa hubo extravasación de leucocitos y eritrocitos. Esto está en concordancia con lo observado por Gabella y Uvelius (1999) en animales con obstrucción uretral aguda durante seis horas. Se ha sugerido que el mecanismo de la extravasación se lleva a cabo por factores intracelulares de los leucocitos, unidos a integrinas y ligandos de células epiteliales (Vestweber 2012), como respuesta al tejido dañado. Un mecanismo directo para que ocurra este evento es el adelgazamiento y la ruptura de los vasos sanguíneos. Esto último, podría ser el factor que contribuye a la hipoxia, observada después de la DV (Damaser et al. 2005).

La capa muscular lisa tiene inervación simpática y parasimpática que controla la función de contracción, para que la orina sea expulsada, y de relajación para que ésta pueda ser almacenada (Fowler et al. 2008). Encontramos que en los animales con DV se presentó una reducción en el grosor de la capa, sin embargo, es factible que se mantenga su capacidad contráctil, ya que se ha propuesto que la organización de su fibras en paquetes musculares con diferente orientación le confiere una extraordinaria capacidad de estiramiento, con una marcada capacidad para reducir su longitud y anchura cuando la vejiga expulsa la orina (Gabella y Uvelius 1990).

El grosor de las capas del cuerpo vesical de los animales SH DV del presente estudio fue de alrededor de 700 μm , menor a lo encontrado en otros estudios que es de alrededor de 1000 μm (Pitre et al. 2002; Yu et al. 2009). Esta controversia podría deberse a que posiblemente se analizaron diferentes regiones. El hecho de que el músculo liso abarca alrededor del 70% de la pared vesical y el urotelio menos del 10% está acorde a lo reportado en otro estudio (Pitre et al. 2002).

La prevalencia de obstrucción urinaria ha venido incrementándose en los últimos años, en parte como efecto colateral de cirugías pélvicas para el tratamiento de la incontinencia urinaria, las cuales pueden resultar en una obstrucción iatrogénica (Lemack 2006). En un modelo de distensión vesical, a través de la obstrucción en el cuello vesical durante tres horas, se encontró una reducción en la inervación adrenérgica y colinérgica en los dos primeros días, una reducción total a los 7 días pero una recuperación a los 21 días posteriores a la obstrucción vesical (Lasanen et al. 1992; Tammela et al. 1990). Los mecanismos de degeneración de estos nervios después de la distensión vesical podrían ser ocasionados por algún tipo de lesión mecánica directa, debido al sobrestiramiento de los axones. También puede ocasionarse por una inadecuada irrigación sanguínea a la pared vesical y a sus nervios. Gabella y Uvelius (1990) observaron que la disfunción vesical puede estar relacionada a la hemorragia e isquemia, más que por el estiramiento de los demás componente de la vejiga urinaria.

8. Experimento 3. Efecto de la DV sobre el transporte axonal de las neuronas vesicales: sensoriales y posganglionares del GPM

8.1 Metodología

En animales anestesiados, inmediatamente después de la DV, se realizó una laparotomía para localizar a la vejiga urinaria. Se inyectó 5 μ l de True Blue (Sigma-Aldrich, 4% de concentración) en la pared dorsal izquierda de la vejiga urinaria, en el domo, el cuerpo y en la base (Fig. 27). Las inyecciones se realizaron con una aguja dental unida a una jeringa Hamilton de 10 μ l. Posteriormente se suturó la piel y la musculatura abdominal con sutura absorbible. Los animales se mantuvieron en una plancha térmica hasta que se recuperaron de la anestesia, después se trasladaron al bioterio. Después de 7 días, las ratas fueron nuevamente anestesiadas con pentobarbital sódico (60 mg/kg, IP) y se perfundieron transcardialmente con 400 ml de solución salina (0.09%), seguida por 400 ml de fijador formalina al 4%. Se extirparon bilateralmente al GPM, y a los ganglios de la raíz dorsal de T13-S2, y se sumergieron en sacarosa al 20% y 30% (4°C).

Los tejidos fueron embebidos en un medio de Tissue-Tek para su congelación (Sakura Finetek USA) y seccionados con un criostato a -25 °C (Leica CM1850) a 20 μ m longitudinalmente. Las secciones fueron montadas en portaobjetos con Poly-L-Lysina. Los cortes fueron observados con un microscopio de fluorescencia Olympus BX41, equipado con un iluminador vertical y un filtro de excitación de 340-380 nm para la visualización de las neuronas positivas al trazador True Blue.

Se realizó un escaneo de todos los cortes y se capturaron imágenes de todas las neuronas positivas a este marcador para determinar la localización y en número total de neuronas posganglionares y sensoriales vesicales.

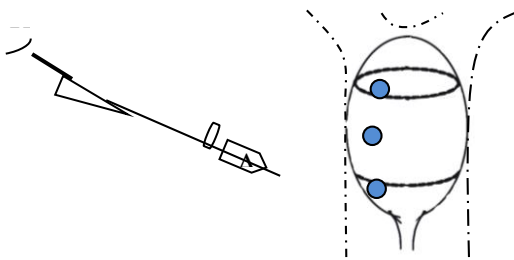


Fig. 27.
Esquema de
los puntos de

8.2 Resultados

Las neuronas eferentes posganglionares vesicales se encontraron en la región craneal del GPM, principalmente en dos zonas (Fig. 28).

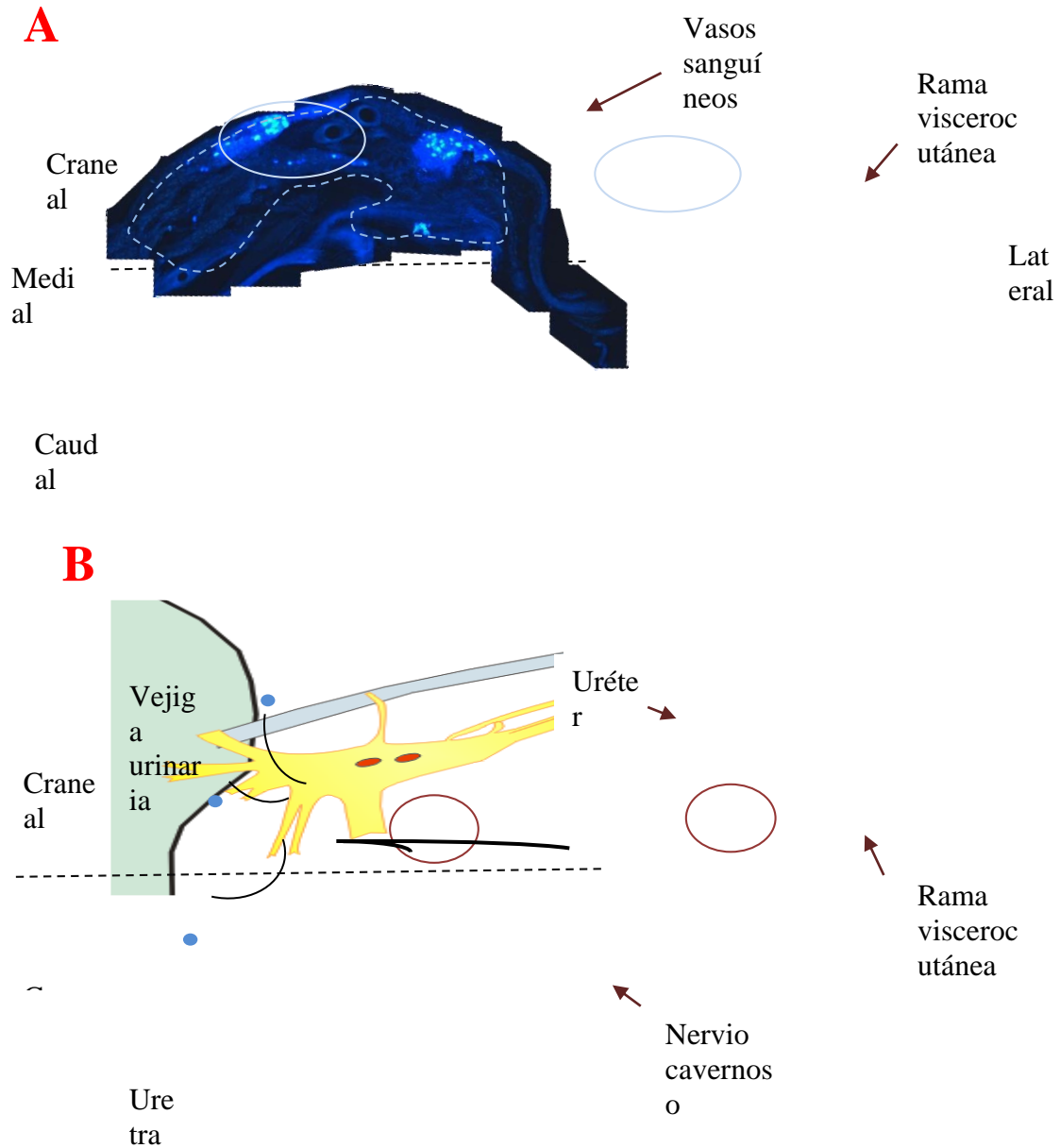


Fig. 28. A. Reconstrucción del GPM de un animal SH DV con true blue. Los puntos blancos indican neuronas marcadas a true blue. **Note** la localización de las neuronas posganglionares vesicales. B. Esquema del GPM, localización de las neuronas posganglionares vesicales y estructuras adyacentes.

Se encontraron 564 ± 111 neuronas marcadas con true blue en el GPM de las hembras SH DV (promedio del GPM derecho e izquierdo, dos animales) y 1110 neuronas en los animales con DV (GPM derecho, un solo animal).

Las neuronas sensoriales vesicales se localizaron en los ganglios de la raíz dorsal, T13 a S1, mayoritariamente en L6 (44 %). Estas se distribuyen a lo largo de todo el ganglio (Fig. 29). Se encontró un menor número de neuronas sensoriales vesicales en los animales con DV. La Tabla 10 resume el conteo de neuronas sensoriales positivas a true blue en ambas condiciones.

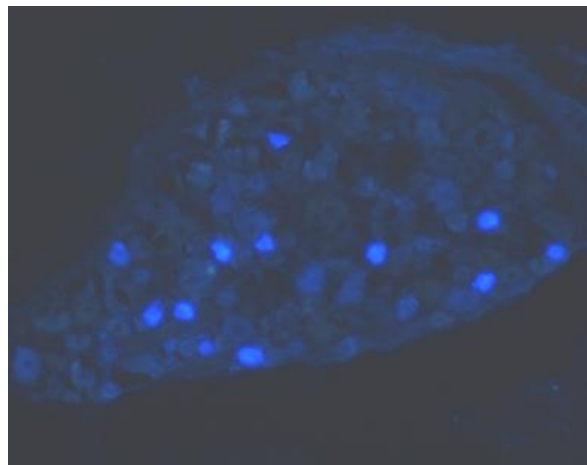


Fig. 29. GRD L6 con neuronas marcadas a true blue. Note su distribución.

| Tabla 10. Número de neuronas sensoriales marcadas con True blue | | | | | | | | | |
|--|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------------|--------------|
| GRD | T13 | L1 | L2 | L3 | L4 | L5 | L6 | S1 | Total |
| Sham | 34 | 107 | 62 | 15 | 9 | 17 | 234 | 44 | 522 |
| DV | 15 | 67 | 56 | 15 | 4 | 4 | 162 | 97 | 420 |
| % Sham | 6 | 20 | 11 | 2.8 | 1.7 | 3.2 | 44 | 8.4 | 100 |
| % DV | 3.5 | 16 | 13.3 | 3.5 | 1 | 1 | 38.5 | 23 | 100 |

8.3 Discusión

Con los estudios de marcaje neuronal, hemos observado la localización de las neuronas posganglionares y sensoriales vesicales en el GPM y en los GRD, respectivamente. Esto es muy importante, ya que nos abre la oportunidad de realizar una mayor caracterización diferencial de las neuronas que controlan a un órgano en específico. Además de que permite un análisis profundo de las posibles vías de daño durante las patologías vesicales.

Las neuronas posganglionares vesicales se localizaron principalmente en dos zonas de la región craneal del GPM. Esto está en desacuerdo con el trabajo de Keast y cols. (1989) en ratas macho. Ellos encontraron que dichas neuronas están a lo largo del GPM, sin embargo, ellos mencionan que en dos animales sólo encontraron neuronas marcadas en la parte caudal del GPM y en un animal en la región craneal. El número total de neuronas con true blue en el GPM en los animales SH DV están en desacuerdo con el estudio de Steers et al. (1990). Quienes encontraron aproximadamente la mitad de neuronas que lo encontrado en este estudio, debido probablemente al trazador retrógrado que emplearon (Fluro-gold), diferencias en la técnica de conteo o en el lugar de la inyección. Aunque son pocos animales, los datos sugieren que la DV podría aumentar el número de neuronas marcadas con True blue en el GPM. El aumento de neuronas positivas a true blue podría deberse a que los axones lesionados tuvieron una mayor accesibilidad a recapturar el trazador.

Las neuronas sensoriales vesicales se localizaron en los GRD de T13-S1, siendo en los GRD L6 y L1 en los que se encuentra el mayor porcentaje de las neuronas sensoriales vesicales (64%). Esto está en concordancia con Vera y Nadelhaft (1992), sin embargo ellos encontraron un mayor número de neuronas sensoriales en cada ganglio que en este estudio. La diferencia podría deberse al sitio de inyección del trazador, ellos inyectaron en la pared ventral. En otro estudio también se encontró un mayor número de neuronas sensoriales de la vejiga urinaria, sin embargo, no se indicó el lugar de la inyección del trazador (Steers et al. 1991). En contraste a estos estudios, Yoshimura et al. (2003) inyectando en la parte dorsal de la vejiga urinaria, encontraron alrededor del 10% de lo que observamos en el número total de neuronas.

9. Discusión general

Este trabajo presenta información sobre las características anatómicas y de la inervación autonómica y somática del AUG de ratas hembras intactas (SH DV) o con DV. Se encontró que la DV estira a los nervios autonómicos y somáticos del AUG, lo que puede ser causal de disfunciones urinarias y sexuales, tales como incontinencia y retención urinaria, dolor durante el coito o problemas para llegar al orgasmo. La distensión vesical ocasionada por la retención urinaria durante cuatro horas indujo una lesión estructural de la vejiga urinaria. Esto puede ayudarnos a comprender la fisiopatología de retención urinaria observada en mujeres durante el posparto.

Sugerimos que la DV, además de ser un modelo para el estudio de los mecanismos que inducen incontinencia urinaria femenina, puede ser también un modelo de estudio de los efectos de la retención urinaria, patología de gran prevalencia en pacientes posparto y poscirugías.

10. Conclusiones

- La DV comprime a la uretra contra el hueso pélvico e induce retención urinaria y distensión vesical.
- La distensión vesical induce rotura vascular e infiltración de eritrocitos y leucocitos en la lámina propia vesical.
- La DV estira el 90% de los nervios pélvicos y perineales.
- La DV lesiona a los nervios vesicales y a los nervios perineales somáticos, por presión o estiramiento.

11. Perspectivas

Falta determinar el efecto de la DV sobre las funciones de los nervios lesionados, el transporte axonal y la propagación de los potenciales de acción. Es necesario realizar estudios a corto y largo plazo sobre los efectos de la sobredistensión vesical en el músculo detrusor, para observar si presenta hipocontractibilidad. Se deben de hacer estudios conductuales en animales despiertos para conocer el efecto de la DV sobre la conducta de micción, para poder corroborar las lesiones anatómicas con las funcionales. Así también para determinar si la disfunción urinaria puede ser revertida o disminuida por tratamientos no quirúrgicos tales como la estimulación eléctrica.

12. Referencias bibliográficas

- Acar, D., Cayan, S., Aktaş, S., Tek, M., Akbay, E., 2007. The effect of tamoxifen on bladder functions and histology, and the role of estrogen receptor beta in a rat chemical cystitis model. *Neurourol Urodyn* 26, 309-16.
- Aitken, K.J., Bägli, D.J., 2009. The bladder extracellular matrix. Part I: architecture, development and disease. *Nat Rev Urol*. 6, 596-611.
- Baljet, B., Drukker, J., 1980. The extrinsic innervation of the pelvic organs in the female rat. *Acta Anat (Basel)*. 107, 241-67.
- Barone, W.R., Feola, A.J., Moalli, P.A., Abramowitch, S.D., 2012. The effect of pregnancy and postpartum recovery on the viscoelastic behavior of the rat cervix. *J Mech Med Biol*. 12, 12500091-125000917.
- Berger, L., El-Alfy, M., Martel, C., Labrie, F., 2005. Effects of dehydroepiandrosterone, Premarin and Acolbifene on histomorphology and sex steroid receptors in the rat vagina. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 96, 201-15.
- Berkley, K.J., Robbins, A., Sato, Y., 1993. Functional differences between afferent fibers in the hypogastric and pelvic nerves innervating female reproductive organs in the rat. *J Neurophysiol*. 69, 533-44.
- Birder, L., Andersson, K.E., 2013. Urothelial signaling. *Physiol Rev*. 93, 653-80.
- Boyd, J.W., Lechuga, T.J., Ebner, C.A., Kirby, M.A., Yellon, S.M., 2009. Cervix remodeling and parturition in the rat: lack of a role for hypogastric innervation. *Reproduction*. 137, 739-48.
- Cannon, T.W., Wojcik, E.M., Ferguson, C.L., Saraga, S., Thomas, C., Damaser, M.S., 2002. Effects of vaginal distension on urethral anatomy and function. *BJU Int*. 90, 403-7.
- Castiglione, F., Bergamini, A., Bettiga, A., Bivalacqua, T.J., Benigni, F., Strittmatter, F., Gandaglia, G., Rigatti, P., Montorsi, F., Hedlund, P., 2012. Perioperative betamethasone treatment reduces signs of bladder dysfunction in a rat model for neuropraxia in female urogenital surgery. *Eur Urol*. 62, 1076-85.
- Cruz, Y., Zempoalteca, R., Angelica Lucio, R., Pacheco, P., Hudson, R., Martínez-Gómez, M., 2004. Pattern of sensory innervation of the perineal skin in the female rat. *Brain Res*. 1024, 97-103.
- Cruz, Y., Downie, J.W., 2005. Sexually dimorphic micturition in rats: relationship of perineal muscle activity to voiding pattern. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 289, R1307-18.
- Damaser, M.S., Broxton-King, C., Ferguson, C., Kim, F.J., Kerns, J.M., 2003. Functional and neuroanatomical effects of vaginal distention and pudendal nerve crush in the female rat. *J Urol*. 170, 1027-31.
- Damaser, M.S., Whitbeck, C., Chichester, P., Levin, R.M., 2005. Effect of vaginal distension on blood flow and hypoxia of urogenital organs of the female rat. *J Appl Physiol (1985)*. 98, 1884-90.
- de Almeida Chuffa, L.G., de Souza, R.B., Frei, F., de Fátima Paccola Mesquita, S., Camargo, I.C., 2011. Nandrolone decanoate and physical effort: histological and morphometrical assessment in adult rat uterus. *Anat Rec (Hoboken)*. 294, 335-41.
- Fowler, C.J., Griffiths, D., de Groat, W.C., 2008. The neural control of micturition. *Nat Rev Neurosci*. 9, 453-66.
- Franco, G.R., Oliveira, E., Baracat, E.C., Simões, M.e.J., Sartoria, M.G., Girão, M.J., Castro, R.A., 2011. Histomorphometric analysis of a rat bladder after electrical stimulation. *Rev Assoc Med Bras*. 57, 20-4.

- Gabella, G., Uvelius, B., 1990. Urinary bladder of rat: fine structure of normal and hypertrophic musculature. *Cell Tissue Res.* 262, 67-79.
- Gabella, G., Davis, C., 1998. Distribution of afferent axons in the bladder of rats. *J Neurocytol.* 27, 141-55.
- Gabella G1, Uvelius B., 1999. Structural changes in the rat bladder after acute outlet obstruction. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 201:32-7.
- Gerez, J.R., Frei, F., Camargo, I.C., 2005. Histological assessment of ovaries and uterus of rats subjected to nandrolone decanoate treatment. *Contraception.* 72, 77-80.
- Hanna-Mitchell, A.T., Ruiz, G.W., Daneshgari, F., Liu, G., Apodaca, G., Birder, L.A., 2013. Impact of diabetes mellitus on bladder uroepithelial cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 304, R84-93.
- Harkness, M.L., Harkness, R.D., 1959. Changes in the physical properties of the uterine cervix of the rat during pregnancy. *J Physiol.* 148, 524-47.
- Haylen, B.T., de Ridder, D., Freeman, R.M., Swift, S.E., Berghmans, B., Lee, J., Monga, A., Petri, E., Rizk, D.E., Sand, P.K., Schaer, G.N., Association, I.U., Society, I.C., 2010. An International Urogynecological Association (IUGA)/International Continence Society (ICS) joint report on the terminology for female pelvic floor dysfunction. *Neurourol Urodyn.* 29, 4-20.
- Hebel R, Stromberg MW. 1986. The urinary system. In: *Anatomy and embryology of the laboratory rat.* BioMed Verlag.
- Hofstetter J, Suckow MA, Hickman DL. 2006. Morphophysiology. In: *The laboratory rat.* Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL (eds.). American College of Laboratory Animal Medicine Series.
- Houdeau, E., Prud'homme, M.J., Rousseau, A., Rousseau, J.P., Hondeau, E., 1995. Distribution of noradrenergic neurons in the female rat pelvic plexus and involvement in the genital tract innervation. *J Auton Nerv Syst.* 54, 113-25.
- Ishii, N., Toda, K., Kawakami, S., Morozumi, M., Yamada, T., 2012. Receptive field characteristics of stretch-insensitive mechanosensitive units in the rat urinary bladder. *Auton Neurosci.* 171, 8-13.
- Jiang, H.H., Gustilo-Ashby, A.M., Salcedo, L.B., Pan, H.Q., Sybert, D.F., Butler, R.S., Damaser, M.S., 2009. Electrophysiological function during voiding after simulated childbirth injuries. *Exp Neurol.* 215, 342-8.
- Jones, M., Larson, E., 2003. Length of normal labor in women of Hispanic origin. *J Midwifery Womens Health.* 48, 2-9.
- Kamo, I., Kaiho, Y., Canon, T.W., Chancellor, M.B., de Groat, W.C., Prantil, R.L., Vorp, D.A., Yoshimura, N., 2006. Functional analysis of active urethral closure mechanisms under sneeze induced stress condition in a rat model of birth trauma. *J Urol.* 176, 2711-5.
- Kavia, R.B., Datta, S.N., Dasgupta, R., Elneil, S., Fowler, C.J., 2006. Urinary retention in women: its causes and management. *BJU Int.* 97, 281-7.
- Keast, J.R., Booth, A.M., de Groat, W.C., 1989. Distribution of neurons in the major pelvic ganglion of the rat which supply the bladder, colon or penis. *Cell Tissue Res.* 256, 105-12.
- Kekre, A.N., Vijayanand, S., Dasgupta, R., Kekre, N., 2011. Postpartum urinary retention after vaginal delivery. *Int J Gynaecol Obstet.* 112, 112-5.
- Kikukawa, K., Fukunaga, K., Kato, T., Yamaga, M., Miyamoto, E., Takagi, K., 2003. Acute changes in the axonal cytoskeleton after mild stretching of the rat brachial plexus. *J Orthop Res.* 21, 359-64.

- Kim, R.J., Kerns, J.M., Liu, S., Nagel, T., Zaszczurynski, P., Lin, D.L., Damaser, M.S., 2007. Striated muscle and nerve fascicle distribution in the female rat urethral sphincter. *Anat Rec (Hoboken)*. 290, 145-54.
- Kjaergaard, H., Olsen, J., Ottesen, B., Dykes, A.K., 2009. Incidence and outcomes of dystocia in the active phase of labor in term nulliparous women with spontaneous labor onset. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 88, 402-7.
- Kuon, R.J., Shi, S.Q., Maul, H., Sohn, C., Balducci, J., Shi, L., Garfield, R.E., 2011. A novel optical method to assess cervical changes during pregnancy and use to evaluate the effects of progestins on term and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol*. 205, 82.e15-20.
- Langworthy, O.R., 1965. Innervation of the pelvic organs of the rat. *Invest Urol*. 2, 491-511.
- Lasanen, L.T., Huttunen, P., Tammela, T.L., Waris, T., 1992. Changes in the noradrenaline content of the female rat urinary bladder after transient acute overdistension. *Scand J Urol Nephrol*. 26, 253-6.
- Laumann, E.O., Paik, A., Rosen, R.C., 1999. Sexual dysfunction in the United States: prevalence and predictors. *JAMA*. 281, 537-44.
- Lemack, G.E., 2006. Urodynamic assessment of bladder-outlet obstruction in women. *Nat Clin Pract Urol*. 3, 38-44.
- Leppilahti, M., Kallioinen, M., Tammela, T.L., 1999. Duration of increased mucosal permeability of the urinary bladder after acute overdistension: an experimental study in rats. *Urol Res*. 27, 272-6.
- Lien, K.C., Morgan, D.M., Delancey, J.O., Ashton-Miller, J.A., 2005. Pudendal nerve stretch during vaginal birth: a 3D computer simulation. *Am J Obstet Gynecol*. 192, 1669-76.
- Lim, S.H., Wang, T.J., Tseng, G.F., Lee, Y.F., Huang, Y.S., Chen, J.R., Cheng, C.L., 2013. The distribution of muscles fibers and their types in the female rat urethra: cytoarchitecture and three-dimensional reconstruction. *Anat Rec (Hoboken)*. 296, 1640-9.
- Lin, A.S., Carrier, S., Morgan, D.M., Lue, T.F., 1998. Effect of simulated birth trauma on the urinary continence mechanism in the rat. *Urology*. 52, 143-51.
- McKenna, K.E., Nadelhaft, I., 1986. The organization of the pudendal nerve in the male and female rat. *J Comp Neurol*. 248, 532-49.
- Middela, S., Pearce, I., 2011. Ketamine-induced vesicopathy: a literature review. *Int J Clin Pract*. 65, 27-30.
- Minassian, V.A., Drutz, H.P., Al-Badr, A., 2003. Urinary incontinence as a worldwide problem. *Int J Gynaecol Obstet*. 82, 327-38.
- Moalli, P.A., Howden, N.S., Lowder, J.L., Navarro, J., Debes, K.M., Abramowitch, S.D., Woo, S.L., 2005. A rat model to study the structural properties of the vagina and its supportive tissues. *Am J Obstet Gynecol*. 192, 80-8.
- Moore, C.L., White, R.H., 1996. Sex differences in sensory and motor branches of the pudendal nerve of the rat. *Horm Behav*. 30, 590-9.
- Morrison, J., 1999. The activation of bladder wall afferent nerves. *Exp Physiol*. 84, 131-6.
- Nadelhaft, I., Booth, A.M., 1984. The location and morphology of preganglionic neurons and the distribution of visceral afferents from the rat pelvic nerve: a horseradish peroxidase study. *J Comp Neurol*. 226, 238-45.
- Nadelhaft, I., McKenna, K.E., 1987. Sexual dimorphism in sympathetic preganglionic neurons of the rat hypogastric nerve. *J Comp Neurol*. 256, 308-15.

- Nagatomi, J., Toosi, K.K., Chancellor, M.B., Sacks, M.S., 2008. Contribution of the extracellular matrix to the viscoelastic behavior of the urinary bladder wall. *Biomech Model Mechanobiol.* 7, 395-404.
- Pacheco, P., Martinez-Gomez, M., Whipple, B., Beyer, C., Komisaruk, B.R., 1989. Somato-motor components of the pelvic and pudendal nerves of the female rat. *Brain Res.* 490, 85-94.
- Pastelín, C.F., Juárez, R., Damaser, M.S., Cruz, Y., 2012. Neural pathways of somatic and visceral reflexes of the external urethral sphincter in female rats. *J Comp Neurol.* 520, 3120-34.
- Pessina, M.A., Hoyt, R.F., Goldstein, I., Traish, A.M., 2006. Differential effects of estradiol, progesterone, and testosterone on vaginal structural integrity. *Endocrinology.* 147, 61-9.
- Peters, L.C., Kristal, M.B., Komisaruk, B.R., 1987. Sensory innervation of the external and internal genitalia of the female rat. *Brain Res.* 408, 199-204.
- Peyrat, L., Haillot, O., Bruyere, F., Boutin, J.M., Bertrand, P., Lanson, Y., 2002. Prevalence and risk factors of urinary incontinence in young and middle-aged women. *BJU Int.* 89, 61-6.
- Pitre, D.A., Ma, T., Wallace, L.J., Bauer, J.A., 2002. Time-dependent urinary bladder remodeling in the streptozotocin-induced diabetic rat model. *Acta Diabetol.* 39, 23-7.
- Pradidarcheep W, Wallner Ch, Dabhoiwala NF, Lamers WH. 2011. Anatomy and histology of the lower urinary tract, In: Urinary tract. Andersson K-E, Michel MC (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Praud, C., Sebe, P., Mondet, F., Sebille, A., 2003. The striated urethral sphincter in female rats. *Anat Embryol (Berl).* 207, 169-75.
- Purinton, P.T., Fletcher, T.F., Bradley, W.E., 1973. Gross and light microscopic features of the pelvic plexus in the rat. *Anat Rec.* 175, 697-705.
- Reiner P, Woolsey J, Adler N, Morrison A. 1980. A gross anatomical study of the peripheral nerves associated with reproductive function in the female albino rat. In: Neuroendocrinology of reproduction physiology and behavior. New York Plenum Press.
- Rocha, M.A., Sartori, M.G., De Jesus Simões, M., Herrmann, V., Baracat, E.C., Rodrigues de Lima, G., Girão, M.J., 2007. Impact of pregnancy and childbirth on female rats' urethral nerve fibers. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 18, 1453-8.
- Sajadi, K.P., Lin, D.L., Steward, J.E., Balog, B., Dissaranan, C., Zaszczurynski, P., Gill, B.C., Jiang, H.H., Kerns, J.M., Damaser, M.S., 2012. Pudendal nerve stretch reduces external urethral sphincter activity in rats. *J Urol.* 188, 1389-95.
- Shields, S.G., Ratcliffe, S.D., Fontaine, P., Leeman, L., 2007. Dystocia in nulliparous women. *Am Fam Physician.* 75, 1671-8.
- Sievert, K.D., Emre Bakircioglu, M., Tsai, T., Dahms, S.E., Nunes, L., Lue, T.F., 2001. The effect of simulated birth trauma and/or ovariectomy on rodent continence mechanism. Part I: functional and structural change. *J Urol.* 166, 311-7.
- Snegovskikh, V., Park, J.S., Norwitz, E.R., 2006. Endocrinology of parturition. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 35, 173-91, viii.
- Steers, W.D., Ciambotti, J., Erdman, S., de Groat, W.C., 1990. Morphological plasticity in efferent pathways to the urinary bladder of the rat following urethral obstruction. *J Neurosci.* 10, 1943-51.

- Steers, W.D., Ciambotti, J., Etzel, B., Erdman, S., de Groat, W.C., 1991. Alterations in afferent pathways from the urinary bladder of the rat in response to partial urethral obstruction. *J Comp Neurol.* 310, 401-10.
- Tammela, T., Lasanen, L., Waris, T., 1990. Effect of distension on adrenergic innervation of the rat urinary bladder. *Urol Res.* 18, 345-8.
- Thom, D.H., Brown, J.S., Schembri, M., Ragins, A.I., Creasman, J.M., Van Den Eeden, S.K., 2011. Parturition events and risk of urinary incontinence in later life. *Neurourol Urodyn.* 30, 1456-61.
- Uvelius, B., Gabella, G., 1998. The distribution of intramural nerves in urinary bladder after partial denervation in the female rat. *Urol Res.* 26, 291-7.
- Vera, P.L., Nadelhaft, I., 1992. Afferent and sympathetic innervation of the dome and the base of the urinary bladder of the female rat. *Brain Res Bull.* 29, 651-8.
- Vestweber, D., 2012. Novel insights into leukocyte extravasation. *Curr Opin Hematol.* 19, 212-7.
- Wang, W., Zhang, P., Yan, J., Han, N., Kou, Y., Zhang, H., Jiang, B., 2010. Histological analysis of single peripheral nerve fiber in acute nerve elongation process. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 38, 165-8.
- Watson, Z.E., Steffey, E.P., VanHoogmoed, L.M., Snyder, J.R., 2002. Effect of general anesthesia and minor surgical trauma on urine and serum measurements in horses. *Am J Vet Res.* 63, 1061-5.
- Wilson, L., Brown, J.S., Shin, G.P., Luc, K.O., Subak, L.L., 2001. Annual direct cost of urinary incontinence. *Obstet Gynecol.* 98, 398-406.
- Yoshimura, N., Seki, S., Erickson, K.A., Erickson, V.L., Hancellor, M.B., de Groat, W.C., 2003. Histological and electrical properties of rat dorsal root ganglion neurons innervating the lower urinary tract. *J Neurosci.* 23, 4355-61.
- Yu, Y., Shen, Z., Zhou, X., Chen, S., 2009. Effects of steroid hormones on morphology and vascular endothelial growth factor expression in female bladder. *Urology.* 73, 1210-7.