



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

Actividad refleja e inervación del complejo esfínter externo
de la uretra de la rata macho

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta

M. en C. Raúl Juárez Mendieta

Directora de tesis

Dra. Yolanda Cruz Gómez

Tlaxcala, Tlax.

Marzo, 2016.



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

Posgrado en Ciencias Biológicas

Actividad refleja e inervación del complejo esfínter externo de la uretra de la rata macho

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

M. en C. Raúl Juárez Mendieta

Directora de tesis

Dra. Yolanda Cruz Gómez

Tlaxcala, Tlax.

Marzo, 2016.



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado



POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

Doctorado en Ciencias Biológicas

COORDINACIÓN DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
PRESENTE

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Raúl Juárez Mendieta** realiza para la obtención del grado de **Doctor 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 **“Actividad refleja e inervación del complejo esfínter externo de la uretra de la rata macho”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., FEBRERO 16 DE 2016

DR. ISMAEL JIMÉNEZ ESTRADA

DR. PABLO PACHECO CABRERA

DR. CÉSAR FELICIANO PASTELÍN ROJAS

DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO

DR. RENÉ ZEMPOALTECA RAMÍREZ

DRA. MAYVI ALVARADO OLIVARES



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2008-NMX-CC-9001-IMNC-2008



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

La presente tesis se realizó en las instalaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala (Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), en el Laboratorio de Neurofisiología bajo la dirección de la Dra. Yolanda Cruz Gómez.

El proyecto fue desarrollado dentro del Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, el cual está incorporada al Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional de Calidad. Padrón Nacional de Posgrado (PNP).

El proyecto contó con el financiamiento de CONACyT (Proyecto: YCG-183446; Beca: RJM-328833; INFR-2014-01-I010/186/2014; C-122/2014-I010/163/2014) y por la Universidad Autónoma de Tlaxcala (CACyPI-UATX-2014).

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de tesis: Dra. Yolanda Cruz Gómez, por su apoyo, paciencia y dedicación para la realización de esta tesis.

A los integrantes de mi comité tutorial: Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio, Dra. Estela Cuevas Romero y el Dr. Ismael Jiménez Estrada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca de doctorado: RJM-328833.

A los miembros del laboratorio de Neurofisiología del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta: Dra. Yolanda Cruz, Dra. Margarita Juárez, M. en C. José Luis Palacios, Lic. Jorge Arellano, Biol. Nancy Mirto, por su apoyo y observaciones en el trabajo.

Al Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Por el apoyo incondicional en el programa del Doctorado en Ciencias Biológicas.

A mis compañeros y amigos del Doctorado.

DEDICATORIA

Esta tesis, así como todo lo que haga en esta vida tendrá la dedicación especial a mis padres: **Francisco Juárez Avila** y **Cruz Mendieta Arenas**, Por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y que me han infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

Mi anhelo de salir adelante, progresar y culminar con éxito este trabajo, ha sido gracias al incondicional apoyo de mi esposa Diana e hijos Alan Alexis y Franco.

A mis hermanos (Ana María, Miguel Ángel, Ricardo, Raymundo, Norma y Adolfo) y sus familias, gracias por sus consejos y afecto.

A mi tía Josefina Mendieta Arenas, ánimo y fuerza para seguir por la vida que nos ha tocado.

A todos, gracias

Raúl Juárez Mendieta

¡SÓLO SE VIVE UNA VEZ!

ÍNDICE

	Pág
Resumen	i
1.- Introducción	1
1.1.- Actividad refleja.....	4
1.2.- Musculatura estriada uretral de la rata macho.....	8
2.- Antecedentes	10
2.1.- Actividad electromiográfica de los músculos uretrales de la rata.....	14
2.2.- Inervación.....	18
3.- Hipótesis.....	22
4.- Objetivo General	22
5.- Objetivos particulares.....	22
6.- Material y métodos.....	23
6.1.- Animales	23
6.2.- Diseño experimental.....	23
7.- Experimento 1. Actividad refleja del complejo esfínter externo de la uretra	24
7.1.- Análisis estadístico.....	27
7.2.- Resultados. Actividad refleja del complejo esfínter externo de la uretra.....	27
8.- Discusión.....	33
9.- Experimento 2. Vías eferentes del complejo esfínter externo de la uretra.....	35
9.1.- Resultados. Vías eferentes del complejo esfínter externo de la uretra.....	35
10.- Discusión.....	40
11.- Experimento 3. Inervación aferente de la uretra	45
11.1.- Resultados. Inervación aferente de la uretra	43

11.2.- Proyección aferente de la uretra a la médula espinal de la rata macho	48
11.3.- resultados.....	49
12.- Discusión.....	51
13.- Conclusiones	53
14.- Referencias	54
15.- ANEXOS.....	57

Resumen

En la rata macho el complejo esfínter externo de la uretra (CEEU) cubre alrededor de la mitad de la uretra, por lo que su contracción podría contribuir al control de funciones urinarias y sexuales. El propósito del presente trabajo fue caracterizar en la rata macho la actividad refleja del CEEU en respuesta a la estimulación de estructuras urogenitales así como también determinar los circuitos nerviosos de esos reflejos. Se utilizaron ratas adultas anestesiadas con uretano. En el experimento 1 se caracterizó la actividad electromiográfica de tres regiones del CEEU (craneal, medial y caudal) en respuesta a la estimulación mecánica (frotamiento o compresión) del escroto, del prepucio, del glandeo a la distensión de la uretra. En el experimento 2 se determinaron las vías eferentes del CEEU. En el experimento 3 se determinaron los nervios por los que viajan los axones de las neuronas que activan al CEEU y las vías aferentes de la uretra. Para determinar las vías aferentes del reflejo uretro-CEEU se registró la actividad electromiográfica del CEEU durante la estimulación mecánica de la uretra penéana (Upn) y la prostática (Upr), antes y después de la neurectomía de la rama sensorial del nervio pudendo (RSNPd) o de la rama viscerocutánea del nervio pélvico (RVSCNPv). Para determinar la integración de las aferencias uretrales se registraron las raíces dorsales de los segmentos L5, L6 y S1 durante la estimulación mecánica o eléctrica de la uretra.

Los resultados del experimento 1 mostraron que la compresión del escroto proximal induce actividad de la región craneal del CEEU. La estimulación mecánica del prepucio y del glande activa diferencialmente a las tres regiones del CEEU. La amplitud fue mayor cuando se aplicó compresión a la punta del glande (amplitud: craneal $226 \pm 62 \mu\text{V}$; medial $340 \pm 120 \mu\text{V}$ y caudal $40 \pm 14 \mu\text{V}$). La estimulación de la uretra penéana y la prostática

activó a las 3 regiones del CEEU. La estimulación de la uretra prostática indujo mayor amplitud en la región medial y su posdescarga fue de larga duración ($> 100\ 000$ ms).

Los resultados del experimento 2 mostraron que la neurectomía unilateral de la RMPS no elimina completamente la actividad ipsilateral del CEEU, ya que solo la disminuye en un 60 – 70%, siendo menor la reducción en la región caudal.

Los resultados del experimento 3 mostraron que la neurectomía de la RSNPd eliminó la respuesta de las tres regiones del CEEU a la estimulación de la Upn. La estimulación de la Upr no produjo respuesta de la región caudal y disminuyó la amplitud de la región medial del CEEU en un 50%. La neurectomía de la RVSCNPv incrementó la actividad de las tres regiones del CEEU en respuesta a la estimulación de la Upn pero disminuyó significativamente la amplitud de la actividad electromiográfica de la región craneal del CEEU en respuesta a la estimulación de la Upr. La neurectomía de las dos ramas, RSNPd yRVSCNPv, eliminó la actividad electromiográfica refleja de las tres regiones del CEEU.

La estimulación mecánica de la uretra membranosa o de la peneana sólo produjo potenciales evocados en la raíz dorsal del segmento L6. La estimulación eléctrica en distintas profundidades de la uretra peneana generó potenciales en L6, la actividad estuvo conformada por varios componentes de distinta latencia de aparición. Al estimular la uretra a los 20 y 15 mm de profundidad, el primer componente de los potenciales se presentó con una latencia de 1.6 ± 0.08 ms y 1.5 ± 0.08 ms, respectivamente. En cambio, al estimular profundidades de 10 y 5 mm, las respuestas tuvieron una latencia de 2.1 ± 0.2 ms y 2.4 ± 0.2 ms.

La activación diferencial del CEEU sugiere que las regiones craneal, medial y caudal poseen fascículos controlados por diferentes unidades motoras.

Se concluye que el CEEU se activa de forma diferencial en las regiones craneal, medial y caudal, en respuesta a la estimulación mecánica del escroto, el prepucio, el glande y la uretra. La activación diferencial del CEEU (craneal, medial y caudal) sugiere que son fascículos controlados por diferentes unidades motoras. Los axones de las motoneuronas que controlan al CEEU viajan por la rama motora del plexo sacro. La inervación es mayoritariamente ipsilateral. Las vías aferentes de los reflejos uretro-CEEU son la rama sensorial del nervio pudendo y el nervio pélvico. La uretra está inervada mayoritariamente por la rama sensorial del pudendo. Las aferencias uretrales se integran a la médula espinal mayoritariamente en el segmento L6 de la médula espinal.

Introducción

El aparato urogenital masculino está formado por los riñones, los uréteres, la vejiga urinaria, la uretra, las glándulas sexuales accesorias, los conductos deferentes y el pene y realiza funciones sexuales y urinarias, tales como la erección peneana, la eyaculación y la micción (Tórtora y Grabowski 2000).

La erección peneana es la condición fisiológica de rigidez, alargamiento, engrosamiento y elevación del pene, como consecuencia de un proceso hemodinámico en el que se relajan los vasos sanguíneos de los cuerpos peneanos cavernosos y esponjoso, lo que permite un incremento del flujo arterial, obteniéndose así la tumescencia peneana (Benson, 1981). El flujo arterial puede mantenerse o incrementarse por la actividad de los músculos isquicavernoso y bulboesponjoso (Benson, 1981; Hart, 1972). En el ser humano la erección peneana es el resultado de una compleja interacción de factores endocrinos, vasculares, neurales y psicológicos. A menudo se desencadena por la integración y el procesamiento de estímulos visuales, olfatorios, táctiles y por la imaginación, aunque también puede presentarse espontáneamente (Andersson y Wagner, 1995).

La eyaculación es el proceso fisiológico mediante el cual se expulsa semen. Presenta dos fases, la emisión seminal y la expulsión (McKenna, 1999; Wolters y Hellstrom, 2006). La emisión seminal consiste en la contracción rítmica de la musculatura lisa de las glándulas sexuales accesorias, de los conductos deferentes y el cerrado del cuello vesical (McKenna, 1999; Coolen y cols., 2004). Durante este proceso el fluido seminal es vertido a la uretra membranosa (McKenna, 1999; Giuliano y Clement, 2005). Durante la expulsión, la contracción del esfínter externo de la uretra y del bulboesponjoso empujan el semen de la uretra membranosa hacia el meato uretral (Jannini y Lenzi, 2005; Juarez y Cruz, 2014; McMahan y cols., 2004; Wolters y Hellstrom, 2006).

La eyaculación es regulada por reflejos espinales y supraespinales (McKenna, 1999). La actividad de las glándulas sexuales accesorias es controlada por los nervios hipogástrico y pélvico, la principal vía aferente somática que lleva información a los centros espinales y supraespinales, entre ellos al generador central de la eyaculación, es el nervio dorsal del pene (Allard y cols., 2005) y la vía eferente somática es la rama motora del plexo sacro, quien controla la actividad de la musculatura estriada perineal (Allard y cols., 2005; Juarez y cols., 2012; Figura 1).

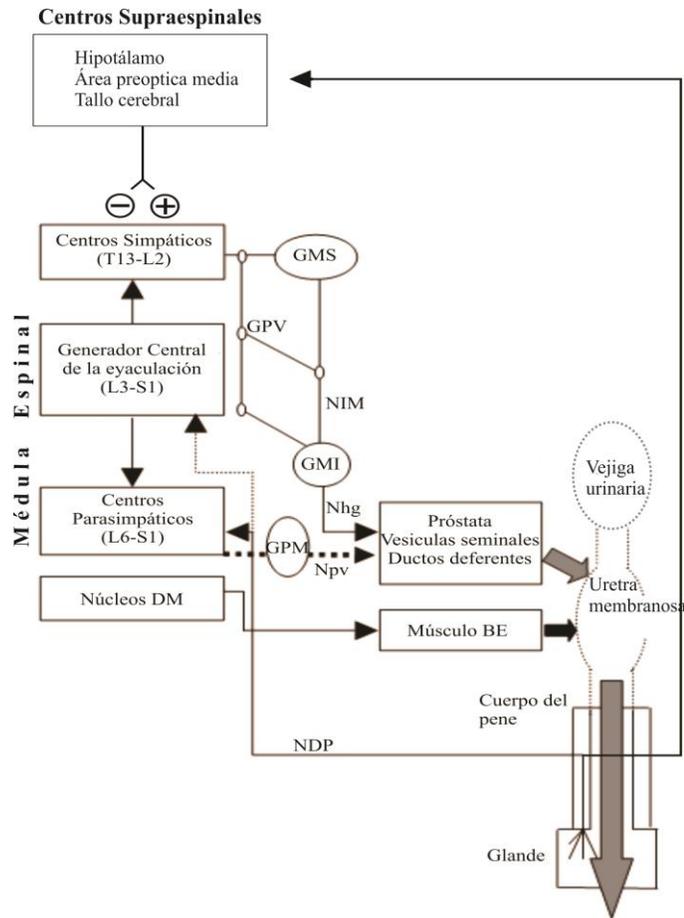


Figura 1. Circuito nervioso del control de la eyaculación. El generador central de la eyaculación recibe información sensorial principalmente del nervio dorsal del pene (NDP). La información sensorial viaja del pene hacia estructuras supraespinales por los nervios pélvicos (Npv) e hipogástricos (Nhg), cuyos axones pasan por diferentes ganglios antes de integrarse a la médula espinal, tales como el ganglio pélvico mayor (GPM), el ganglio mesentérico inferior (GMI), el núcleo intermesentérico (NIM), el ganglio mesentérico superior (GMS) y los ganglios paravertebrales (GPV). Los centros supraespinales pueden inhibir o facilitar la eyaculación. Cuando se desencadena la eyaculación se activan las motoneuronas de los núcleos dorso mediales (DM) que inervan al músculo bulboespongioso (BE). Modificado de Allard y cols., 2005.

La micción es el proceso fisiológico mediante el cual la vejiga urinaria almacena la orina producida por los riñones y la expulsa periódicamente por la uretra, comprende dos fases: 1) la continencia urinaria y 2) la expulsión de orina (Fowler y cols., 2008; Mostwin, 2001; Figura 2).

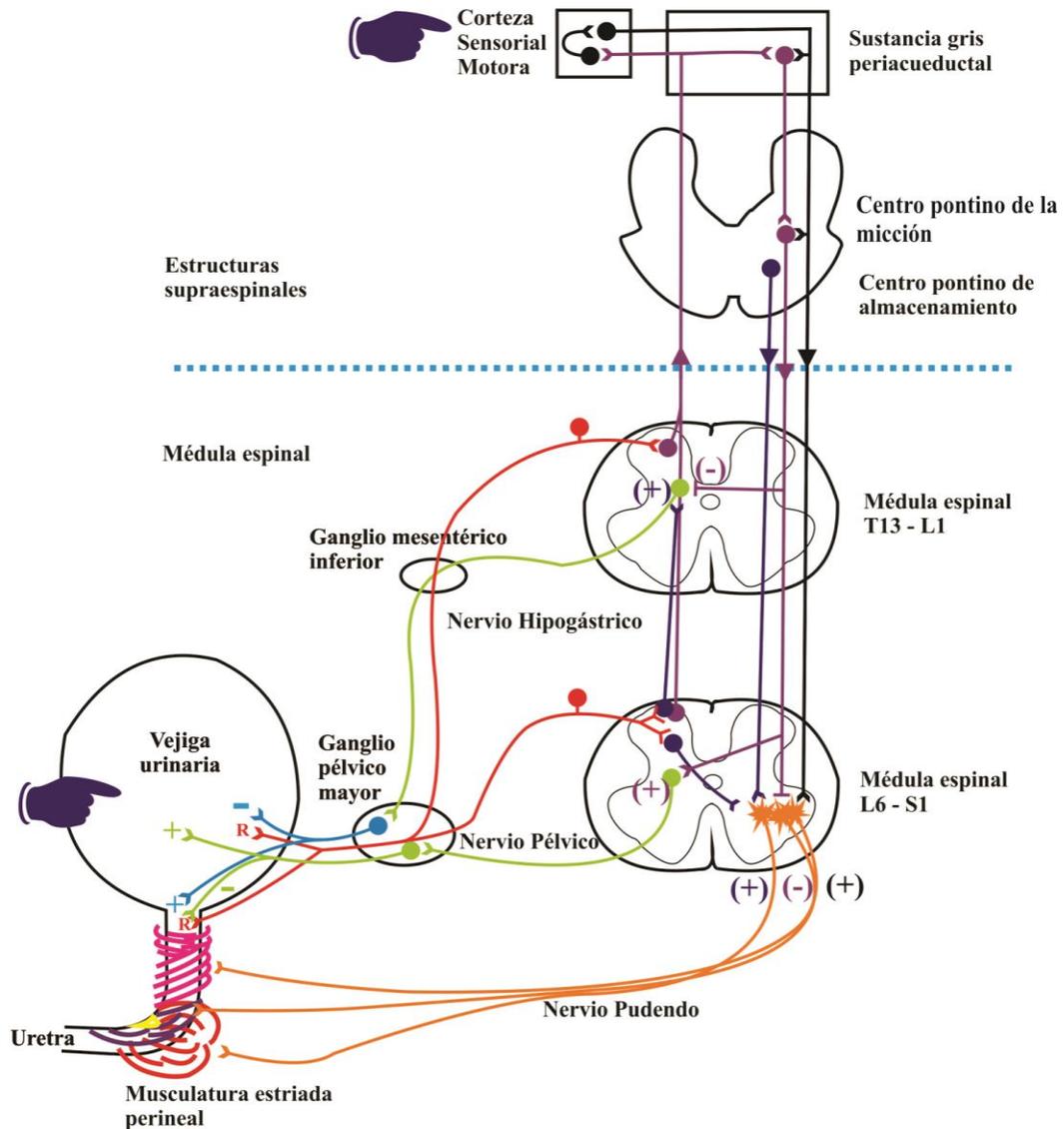


Figura 2. Circuito nervioso del control de la micción. Se observan las vías nerviosas de almacenamiento y de expulsión de orina. La musculatura estriada que rodea a la uretra puede activarse de forma voluntaria por la corteza motora y de forma refleja por las aferencias vesicales. Modificado de de Groat, 2006, Fowler y cols., 2008.

Durante la continencia urinaria el músculo liso de la vejiga urinaria está relajado, por la activación de los receptores β -adrenérgicos, mientras que la musculatura lisa y estriada de la uretra está contraída, por la activación de los receptores α -adrenérgicos y también del músculo esfínter externo de la uretra (Fowler y cols., 2008). Esta coordinación de la actividad vesical y la uretral permite el cerrado uretral y evita la salida de orina (Beckel y Holstege, 2011; de Groat, 2006).

Durante la fase de expulsión las aferencias vesicales activan al centro pontino de la micción, el cual desencadena la contracción vesical y la relajación del esfínter externo de la uretra (de Groat, 2006; Fowler y cols., 2008; Figura 2). El incremento de la presión vesical y la relajación de la uretra permiten el paso de la orina al exterior (Sugaya y cols., 2005).

La micción es controlada por 3 nervios: el hipogástrico, el pélvico y el pudendo (de Groat, 2006).

Actividad Refleja

La adecuada ejecución de las funciones del aparato urogenital requiere de la activación de reflejos espinales y supraespinales que coordinan la actividad de su musculatura lisa y estriada (de Groat et al., 2001).

Los reflejos están compuestos por 5 elementos: 1) receptor sensorial, 2) axón aferente, 3) centro integrador, 4) axón eferente y 5) efector (Guyton y Hall, 2000; Kandel y cols., 2013).

1. Receptores sensoriales. Son estructuras especializadas que responden a estímulos físicos que provienen del exterior o del interior del organismo y generan señales eléctricas que viajan por el sistema nervioso (Guyton y Hall, 2000; Tórtora y Grabowski, 2000).

El receptor sensorial puede activarse por: a) deformación mecánica, b) sustancias químicas, c) cambios de temperatura d) radiación electromagnética, entre otros (Kandel y cols., 2013). Así, de acuerdo a la modalidad del estímulo al que responde los receptores sensoriales se clasifican en:

Mecanorreceptores: Responden a la presión o al estiramiento de la piel.

Termorreceptores: Responden a cambios en la temperatura en la piel.

Nociceptores: Responden a estímulos térmicos, mecánicos o químicos que son dañinos para los tejidos.

Fotorreceptores: Responden a los cambios de intensidad de luz.

Quimiorreceptores: Responden a las sustancias químicas. Los estímulos pueden ser externos (gusto y olfato) o internos (presión parcial del oxígeno, dióxido de carbono, pH).

Los mecanorreceptores pueden ser clasificados en: 1) Receptores de lenta adaptación y 2) Receptores de rápida adaptación. Los primeros disparan continuamente durante el estímulo y los segundos solo disparan al inicio y al terminar el estímulo.

Hay 4 tipos de mecanorreceptores cutáneos:

- a) Corpúsculos de Merkel, son de bajo umbral y lenta adaptación. Se localizan en la epidermis y responden a la presión y a la textura.
- b) Corpúsculos de Ruffini, son de bajo umbral y lenta adaptación. Se localizan en la dermis y responden al estiramiento de la piel.
- c) Corpúsculos de Meissner, son de bajo umbral y rápida adaptación. Se encuentran en la epidermis y responden al tacto, así como a la dirección y la velocidad del estímulo.
- d) Corpúsculos de Pacini, son de rápida adaptación. Se encuentran entre la dermis y la capa subcutánea.

2. Axón Aferente. Las neuronas sensoriales se localizan en los ganglios de las raíces dorsales de la médula espinal. Sus fibras pueden ser mielínicas o amielínicas. Las mielínicas tienen un diámetro de alrededor de 20 μm y conducen a una velocidad de 120 m/s. Las amielínicas tienen un diámetro de alrededor de 1 μm y su velocidad de conducción es de 1 m/s (Guyton y Hall, 2000; Kandel y cols., 2013).

3. Centro integrador. La información de la neurona sensorial se integra en la médula espinal o en estructuras del encéfalo.

4. Axón eferente. Las motoneuronas se localizan en el asta ventral de la médula espinal. Se encargan de llevar la información de la médula espinal hacia el órgano efector.

5. Efecto. El órgano blanco puede ser la musculatura estriada o la musculatura lisa (Guyton y Hall, 2000; Kandel y cols., 2013).

El daño a cualquier componente de los reflejos involucrados en el control del funcionamiento del aparato urogenital puede ocasionar patologías urinarias o reproductivas. Para el tratamiento de las disfunciones del aparato urogenital se requiere del conocimiento de su anatomía, inervación y fisiología. Ello implica la necesidad de usar técnicas invasivas en modelos animales. El animal más usado en el análisis de la anatomía y fisiología del aparato urogenital es la rata de laboratorio.

En la rata macho el aparato urogenital está formado por la vejiga urinaria, la uretra, el pene, y las glándulas sexuales accesorias, tales como las seminales, las coagulantes, las bulbouretrales y la próstata (Hebel y Stromberg, 1986; Figura 3).

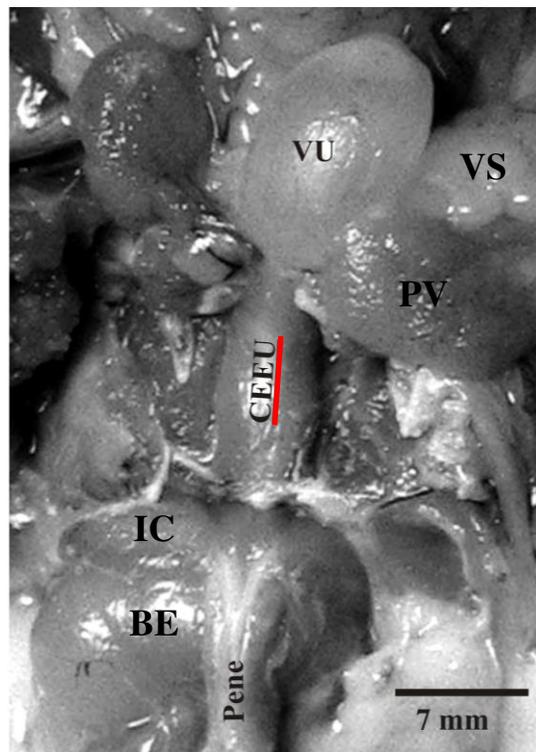


Figura 3. Vista ventral del aparato urogenital de la rata macho. Se muestra la vejiga urinaria (VU), las vesículas seminales (VS), la próstata ventral (PV), el músculo complejo esfínter externo de la uretra (CEEU), el isquiocavernoso (IC), el bulboesponjoso (BE), y el pene. Modificado de Juárez y cols., 2012.

La vejiga urinaria es un órgano muscular hueco que sirve de receptáculo de la orina. En la rata se localiza craneal al borde del hueso púbico (Hebel y Stromberg, 1986). Cuando está vacía tiene forma de pera, y mide 10 mm en su parte más ancha y 5 mm en la más estrecha y cuando está llena adquiere forma esférica, midiendo aproximadamente 25 mm de largo por 15 mm de diámetro (Hebel y Stromberg, 1986).

La orina que la vejiga acumula es expulsada periódicamente por la uretra. Ésta es una estructura tubular formada de musculatura lisa y estriada. Su porción rostral se conecta a la vejiga urinaria y la caudal termina en el meato urinario. Tiene una longitud promedio de 45 mm y se ha dividido en cuatro porciones: prostática, membranosa, divertículo uretral y peneana (Martínez, 2003). Presenta dos flexiones, la primera es en forma de U y se localiza entre la unión de la porción membranosa y la porción peneana. Esta flexión está relacionada anatómicamente con el divertículo uretral. La segunda flexión tiene forma de ángulo recto y se localiza en la porción peneana interna (Pacheco y cols., 2002; Martínez, 2003; Figura 4).

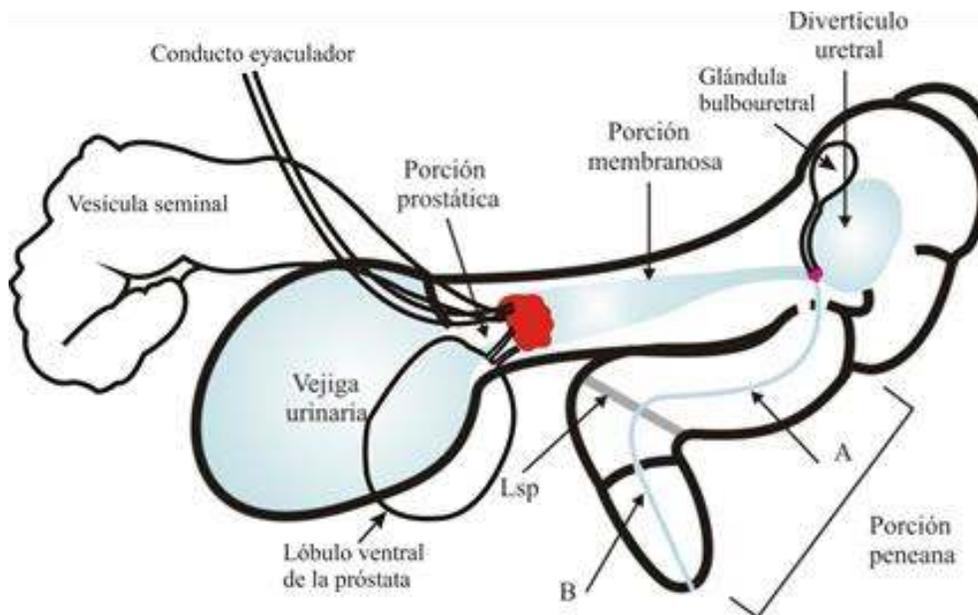


Figura 4. Esquema que muestra a la vejiga urinaria, a las porciones de la uretra (prostática, membranosa, divertículo uretral y peneana) y a los conductos eyaculadores que desembocan en la uretra. Lsp: ligamento suspensorio del pene, A: porción interna, B: porción externa. Modificado de Martínez, 2003.

Musculatura estriada uretral de la rata macho

Alrededor del 50 por ciento de la uretra está rodeada por los músculos estriados: los bulboesponjosos (BE) (Holmes y cols., 1991; McKenna y Nadelhaft, 1986) y el rabdosfínter, también llamado esfínter externo de la uretra o complejo esfínter de la uretra (Bierinx y Sebillé, 2006; Cruz y Downie, 2005; Lehtoranta y cols., 2006). Otro músculo perineal localizado en la base del pene es el isquiocavernoso (IC), pero este no rodea a la uretra (Hart y Melese-D'Hospital, 1983; McKenna y Nadelhaft, 1986).

Los músculos BE se localizan en la base del pene. Son lobulados y rodean al divertículo uretral. Sus fibras se originan en la superficie dorsal del bulbo peneano y se continúan ventralmente para insertarse en la superficie contralateral al bulbo peneano, se divide en dorsal, lateral y ventral (Hart y Melese-D'Hospital, 1983; Holmes y cols., 1991; McKenna y Nadelhaft, 1986; Figura 5). Estos últimos son pareados.

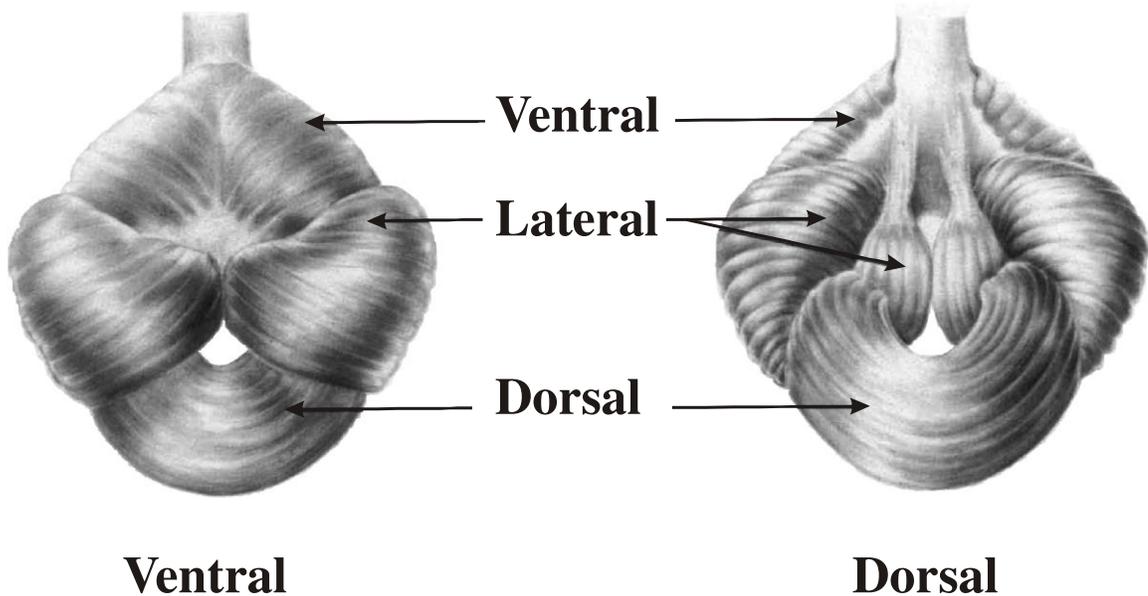


Figura 5. Esquema anatómico de una vista ventral y dorsal del músculo bulboesponjoso de la rata macho. Holmes y cols., 1991.

El músculo IC es un músculo bilateral que se origina en el arco isquiático del hueso pélvico y se inserta en la crura del pene (Hart y Melese-D'Hospital, 1983; Holmes y cols., 1991; McKenna y Nadelhaft, 1986; Figura 6).

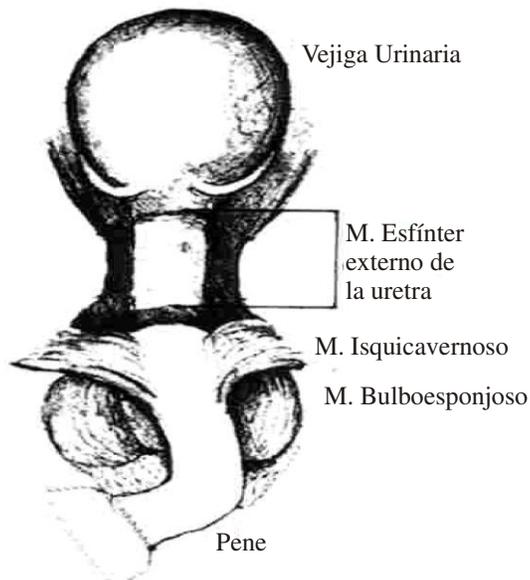


Figura 6. Dibujo del aparato urinario inferior de la rata macho y la musculatura estriada (M.) asociada a la uretra y a la base del pene. McKenna y Nadelhaft, 1986.

El esfínter externo de la uretra o complejo esfínter externo de la uretra (CEEU) (Martínez, 2003) rodea a la uretra prostática y a la membranosa (Martínez, 2003). Estudios previos han mostrado que en rata este músculo es sexualmente dimórfico y está más desarrollando en el macho que en la hembra (Cruz y Downie, 2005).

Antecedentes

El CEEU de la rata macho es un músculo prominente que se localiza entre el cuello vesical y el bulbo del pene, con un rango de longitud de 0.9 a 1.3 cm (Martínez, 2003; Bierinx y Sebillé, 2006). La descripción de la compleja organización y composición de sus fibras aún no está bien definida. Como se describe abajo, los autores que la han estudiado difieren en la distribución de las fibras y en el número total de fascículos que lo conforman pero todos coinciden en que en la región craneal presenta fibras circulares o en forma de anillo (Cruz y Downie, 2005; Lehtoranta y cols., 2006; Watanabe y Yamamoto, 1979; Pacheco, 2002).

Por un lado se ha propuesto que el músculo CEEU presenta dos estructuras tendinosas, una dorsal y otra ventral y que está formado por 10 músculos, 2 únicos y cuatro pares (Martínez, 2003; Figura 7).

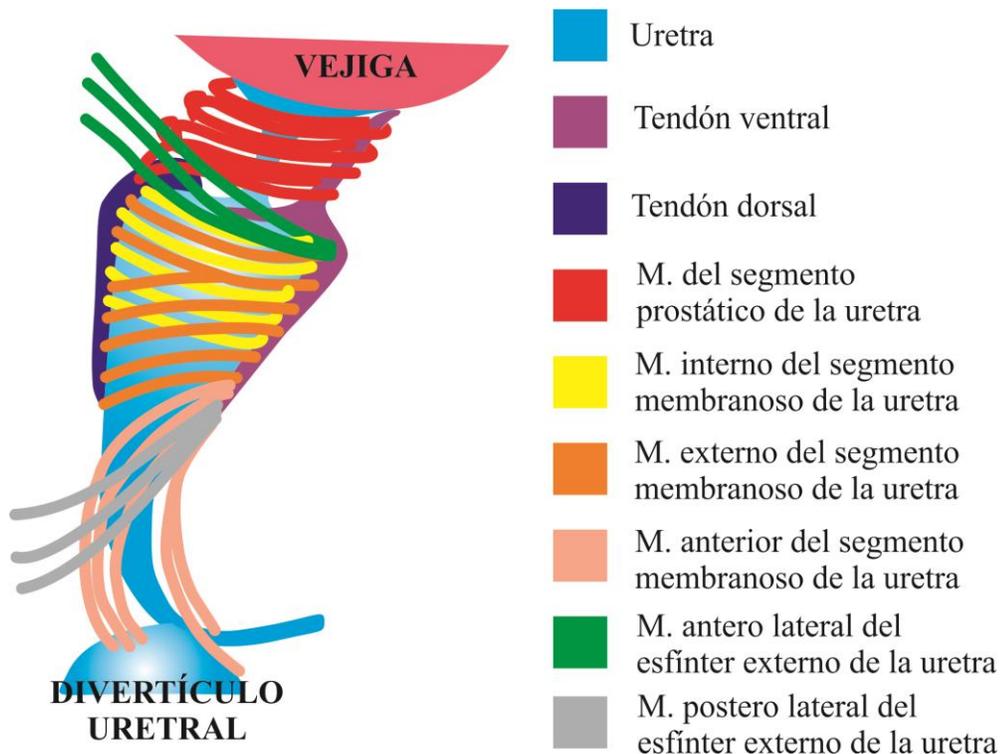


Figura 7. Esquema que muestra las fibras del CEEU de la rata macho. Se observa la ubicación de los tendones y como se distribuyen los diferentes músculos en la uretra prostática y membranosa. Tomado de Martínez, 2003.

Por otra parte, se ha descrito que el CEEU es un músculo con fibras circulares en la porción rostral y tejido conectivo que lo divide en dos mitades simétricas y en la parte caudal hay un músculo en posición sagital, (Lehtoranta y cols., 2006; Figura 8). Con esta descripción coincide otro estudio que menciona que el CEEU posee 4 fascículos; uno craneal, dos laterales y uno caudal. El fascículo craneal posee fibras circulares que rodean la uretra prostática. Los fascículos laterales tienen fibras que están separados por una tira de tejido conectivo, una anterior y otra posterior. El fascículo caudal y posee fibras musculares en dirección transversa (Bierinx y Sebille, 2006; Figura 9).

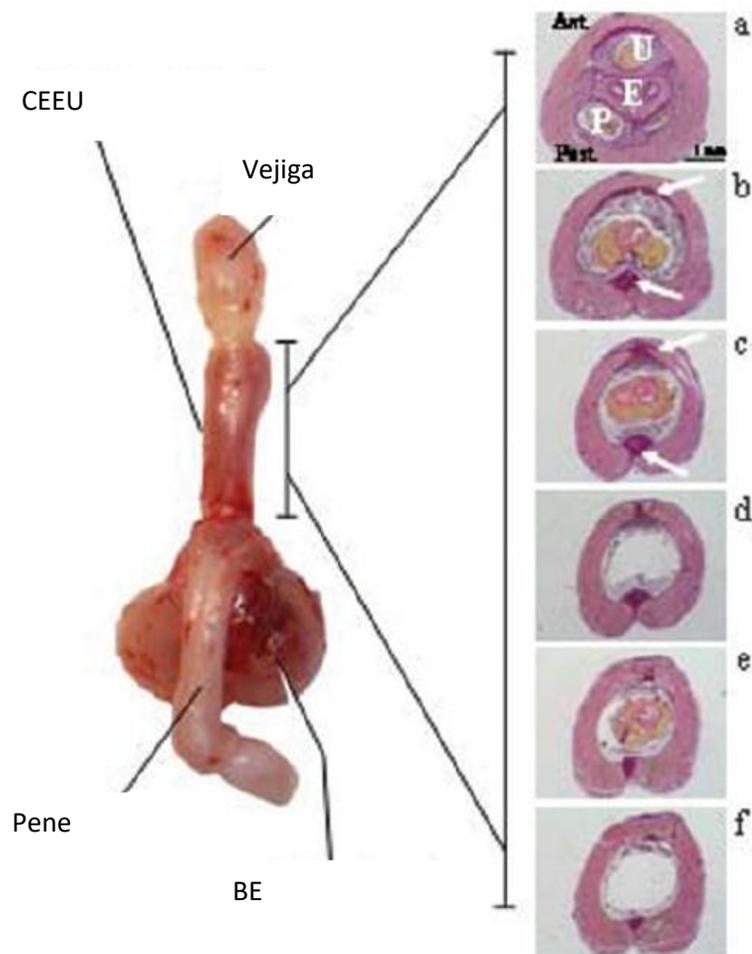


Figura 8. Aparato urogenital de la rata macho. Del lado izquierdo se muestra una fotografía de la vejiga urinaria y la uretra, con su complejo esfínter estriado (CEEU), el bulboesponjoso (BE) y el pene. Del lado derecho están los cortes histológicos transversales de la uretra, *a* y *b* son de la región craneal, *c* y *d* de la región media y *e* y *f* de la región caudal. Las flechas blancas indican los tendones, ventral y dorsal. Modificado de Lehtoranta y cols., 2006.

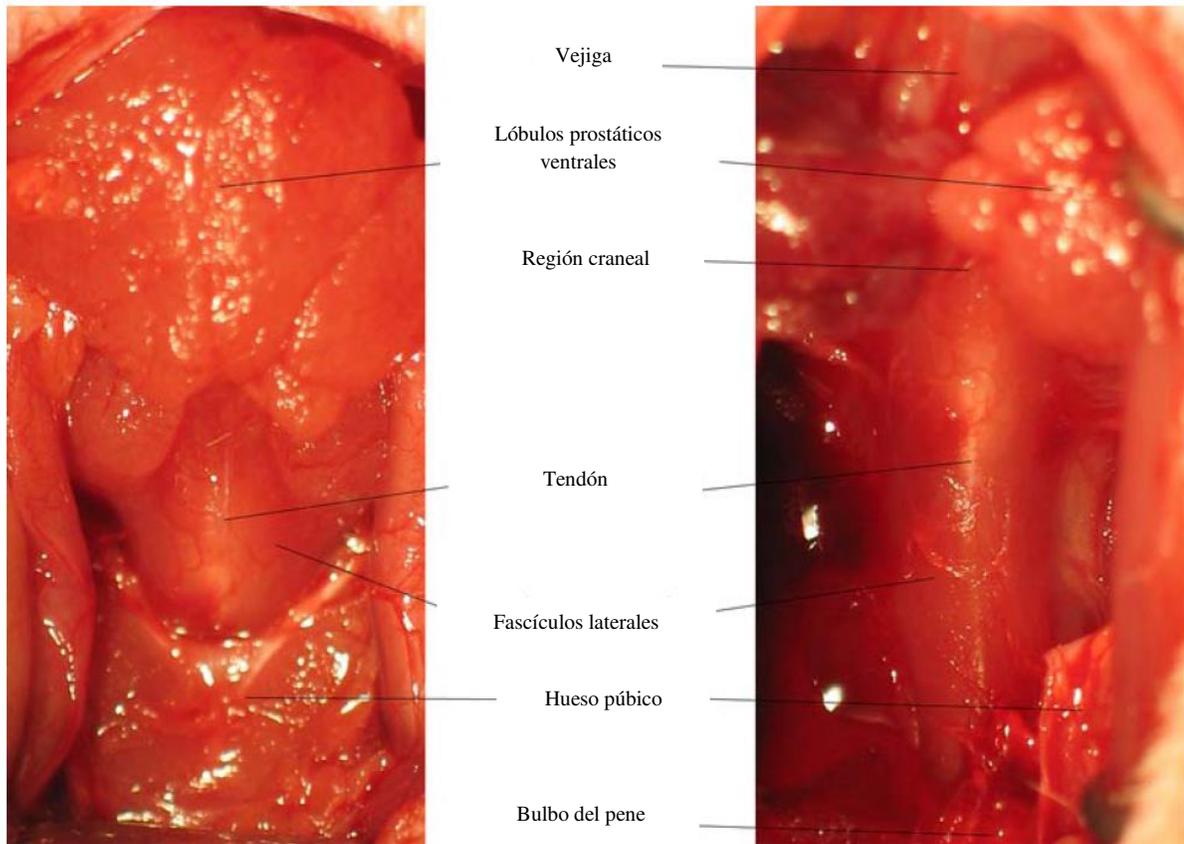


Figura 9. Fotografías del CEEU de la rata macho. Izquierda, vista ventral con el hueso púbico por lo que solo se observa la parte craneal del CEEU. Derecha, ya se cortó la sínfisis púbica y se observa el CEEU completo. Modificado de Bierinx y Sebille, 2006.

En nuestro laboratorio (Juárez, 2010) hemos corroborado que el músculo CEEU posee fibras semicirculares (bilaterales) en la región craneal y que en la región medial hay dos fascículos musculares simétricos con fibras oblicuas. En cambio, en la región caudal hemos observado un par de fascículos de fibras longitudinales, uno dorsal y otro ventral. A pesar de que en la región craneal las fibras circulares no parecen tener una división en la línea media consideramos que son dos fascículos porque tienen inervación bilateral, por lo tanto, concluimos que el músculo CEEU está organizado en tres pares de fascículos (Figura 10).

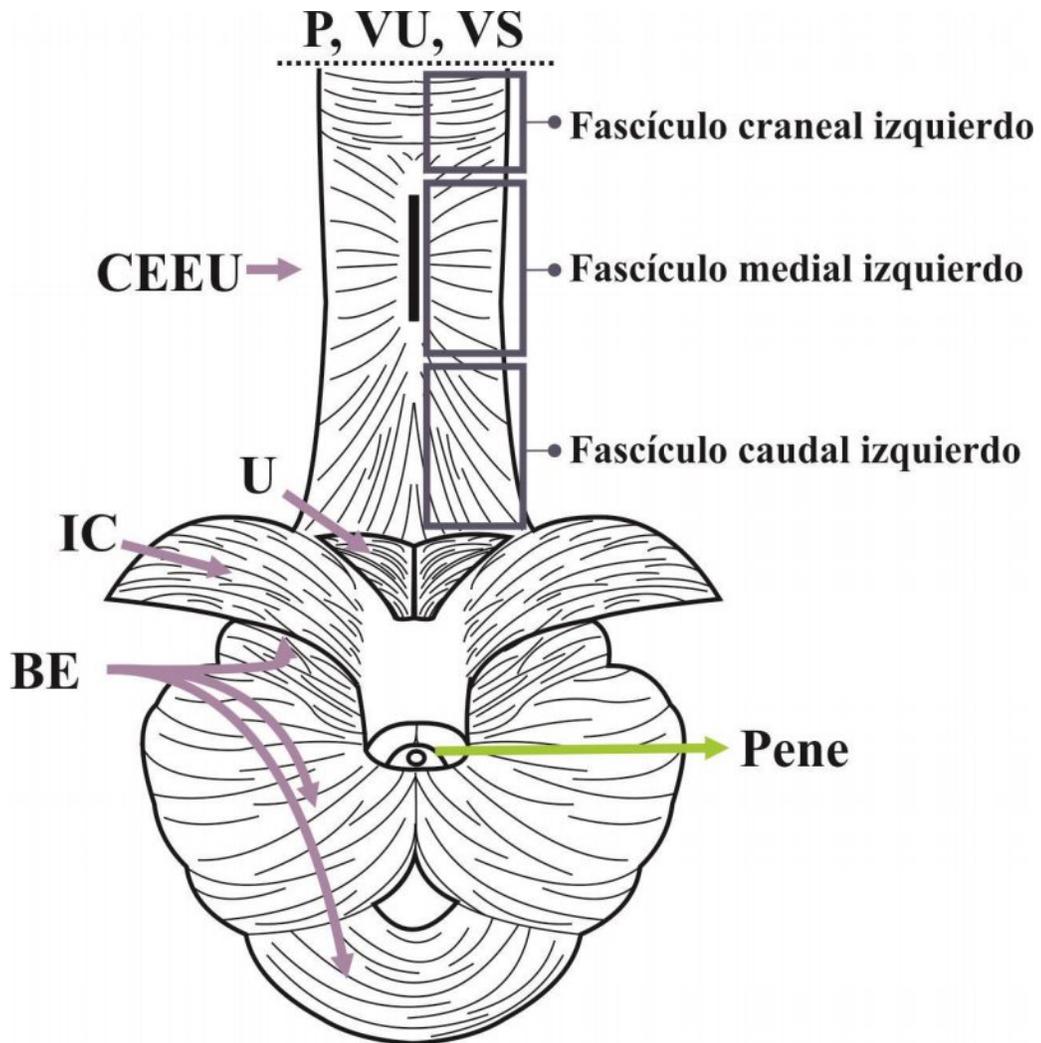


Figura 10. Esquema de la musculatura estriada relacionada con el aparato urogenital de la rata macho. En la parte rostral se ha omitido a la vejiga urinaria (VU) y a las glándulas sexuales accesorias tales como la próstata (P) y las vesículas seminales (VS). Los músculos que se observan son: los tres fascículos (craneal, medial y caudal) del complejo esfínter externo de la uretra (CEEU), el uretralís (U), el isquiocavernoso (IC) y el bulboesponjoso (BE). Note la distribución de las fibras musculares del CEEU. Modificado de Juárez, 2012.

Actividad electromiográfica de los músculos uretrales de la rata

Los músculos BE e IC han sido relacionados con funciones sexuales, tales como la erección y la eyaculación (Holmes y cols., 1991; McKenna y cols., 1991; Sachs, 1982).

En animales anestesiados se demostró que el músculo IC se activa durante la cópula y participa en el control de la intensidad de las flexiones del pene, en los reflejos llamados “Flips”. Las flexiones pueden ser cortas o largas (Hart, 1968; Sachs, 1982). El músculo BE también se activa durante los reflejos peneanos pero sólo en los llamados “Cups”. Cuando el glande tiene forma de campana (Hart, 1968; Sachs, 1982).

Para determinar si los músculos también se activan durante la cópula, en ambos músculos se insertaron de manera crónica electrodos para registrar su actividad. Se observó que el músculo IC presenta actividad electromiográfica de mayor amplitud durante la monta. En cambio, el músculo BE se activa con mayor amplitud cuando la rata tiene intromisión y cuando ocurre la expulsión seminal (Holmes y cols., 1991; Figura 12).

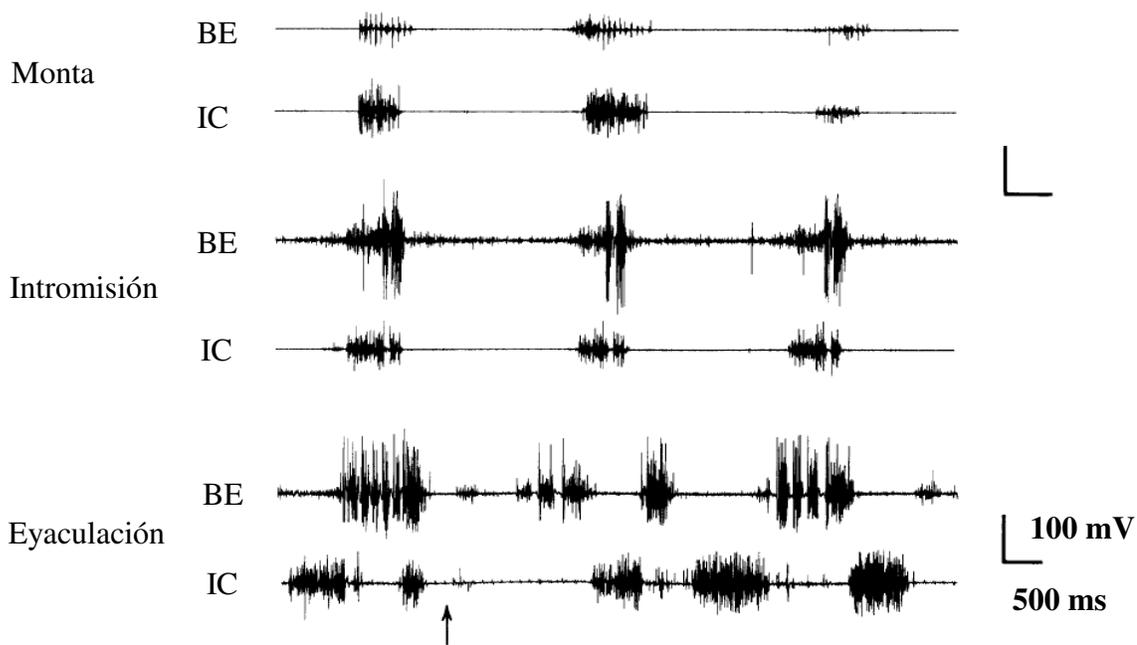


Figura 12. Registro simultáneo de la actividad electromiográfica del músculo BE e IC durante tres montas, tres intromisiones y una eyaculación (la flecha indica el momento en el cual el macho se desmonta). Modificado de Holmes y cols., 1991.

Sin embargo, también se activan durante la micción inducida. En ratas macho anestesiadas se ha encontrado que durante la expulsión de orina los músculos bulboesponjoso e isquicavernoso presentan actividad durante la contracción vesical (Cruz y Downie, 2005; Figura 11).

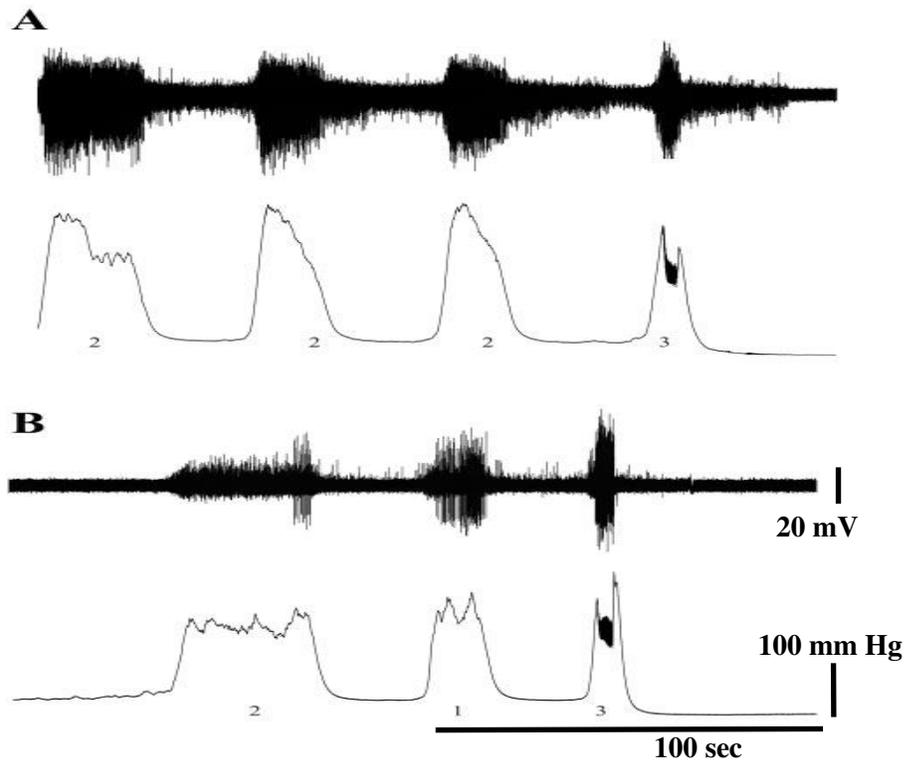


Figura 11. Electromiograma (EMG) de la actividad del BE (A) y del IC (B) durante la micción inducida por infusión de solución salina a la vejiga urinaria (0.1 ml/min) en ratas macho anestesiadas. Los números indican el tipo de contracción de la vejiga (1 y 2 sin expulsión de orina y 3 cuando la vejiga expulsó la orina; Cruz y Downie, 2005).

Los estudios antes descritos muestran que los músculos IC y BE se activan durante eventos urinarios y reproductivos (Hart y Melese-D'Hospital, 1983; Holmes y cols., 1991; Sachs, 1982). Sin embargo, no se sabe el patrón de actividad del CEEU, un músculo que cubre una gran porción de la uretra. Es probable que el CEEU también se active reflejamente durante la cópula, cuando el macho recibe estimulación de estructuras como el escroto, el prepucio, el glande o cuando la uretra sea estimulada por el paso del semen durante la eyaculación.

Por su naturaleza, los músculos estriados uretrales se contraen a voluntad o de forma refleja. Cuando la contracción es voluntaria la información viaja desde la corteza motora del encéfalo a la motoneurona, en la médula espinal. En el segundo caso es una respuesta del músculo a la estimulación de receptores sensoriales.

En estudios previos se mostró que las regiones del músculo CEEU se activan de manera diferente durante la micción inducida (Cruz y Downie, 2005; Lehtoranta y cols., 2006). La región proximal del músculo CEEU se activa durante la fase de continencia urinaria y su actividad se incrementa durante la contracción vesical. Sin embargo, las fibras de la porción distal del músculo sólo se activan durante la contracción vesical (Cruz y Downie, 2005; Figura 13).

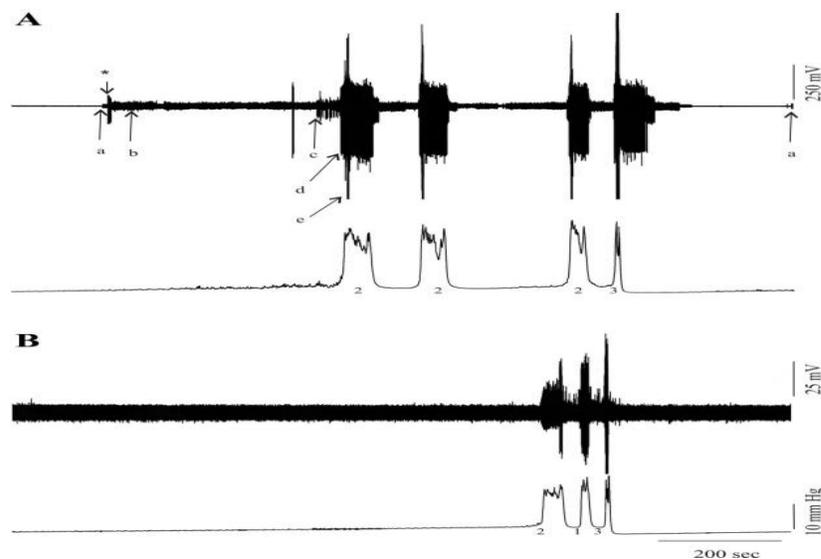


Figura 13. Actividad electromiográfica del músculo CEEU de la zona proximal (A) y medial (B) durante la infusión de solución salina a la vejiga urinaria (0.1 ml/min) en ratas macho anestesiadas. Los números indican el tipo de contracción de la vejiga (1 y 2 sin expulsión de orina); las letras indican la activación de diferentes fascículos musculares y el asterisco denota el artefacto. El EMG vuelve al nivel basal, sólo después de una contracción de la vejiga de tipo 3, cuando la vejiga expulsó la orina y está vacía. Tomado de Cruz y Downie, 2005.

Otro estudio coincide en que las fibras rostrales del CEEU o también llamado rabdosfinter se activan durante la contracción vesical pero aseguran que los fascículos de la región distal no se activan durante la expulsión de orina (Figura 14) y proponen que los fascículos que no se activan durante la micción podrían contribuir primordialmente a la regulación de funciones reproductivas tales como la expulsión de semen durante la eyaculación. (Lehtoranta y cols., 2006).

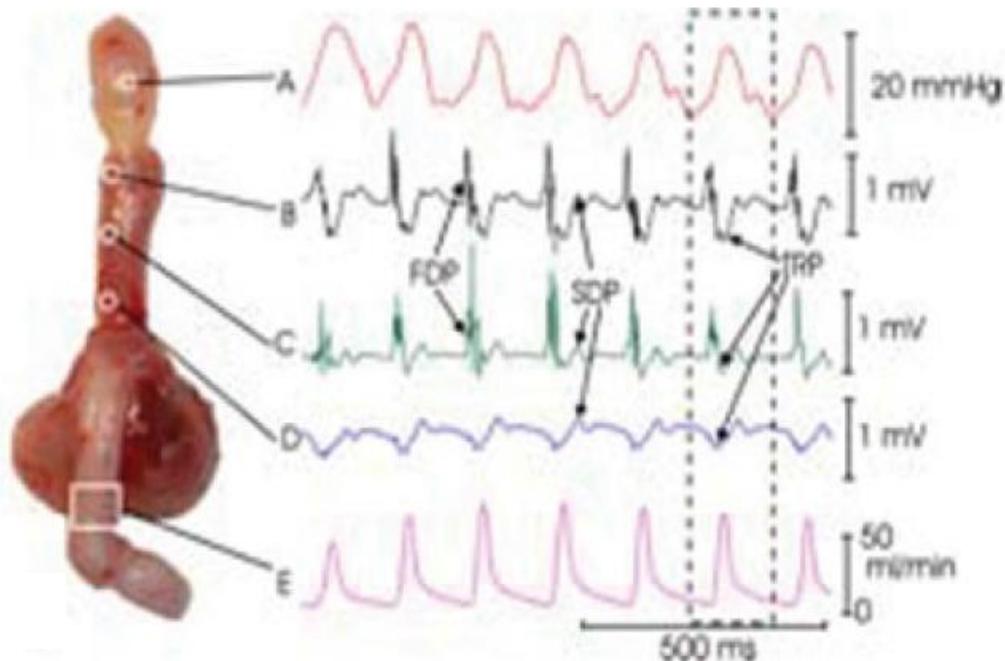


Figura 14. Registros electromiográficos de tres regiones (B, C, y D) del músculo rabdosfinter (también llamado CEEU) durante la fase expulsión durante la micción inducida con solución salina infundida a la vejiga urinaria (A). Se registró la presión vesical (A), electromiografía de tres regiones de la uretra (B, C, D) y uroflujometría en la uretra distal (E). Note que la región caudal de músculo no presenta la despolarización rápida (FDP) Lehtoranta y cols., 2006.

La propuesta de que el músculo CEEU de la rata macho está formado por diferentes fascículos es apoyada por el hecho de que no todas las fibras del músculo responden de manera homogénea durante la micción inducida (Cruz y Downie, 2005). Esas fibras también podrían activarse durante funciones sexuales.

En funciones no urinarias, la contracción de las fibras de la región craneal contribuyen al correcto cierre del cuello vesical durante la eyaculación para evitar que el semen entre a la vejiga urinaria, mientras que las fibras de la región intermedia participan en la expulsión del semen durante la eyaculación y por ello la denervación del músculo CEEU produce eyaculación retrógrada (Juarez y cols., 2012; Juarez y Cruz, 2014). Si el CEEU controla la eyaculación, entonces es probable que su actividad sea evocada con la estimulación de los genitales, internos y/o externos.

Inervación.

La uretra prostática está inervada por la rama viscerocutánea de los nervios pélvicos y por el hipogástrico, los cuales llegan al ganglio pélvico mayor (GPM) (Steers y de Groat, 1988; Steers y cols., 1988; Gabella, 1995). De la región caudal del GPM se origina el nervio cavernoso que inerva al pene y al divertículo uretral (Dail y cols., 1989; Steers y de Groat, 1988; Steers y cols., 1988; Gabella, 1995; Figura 15).

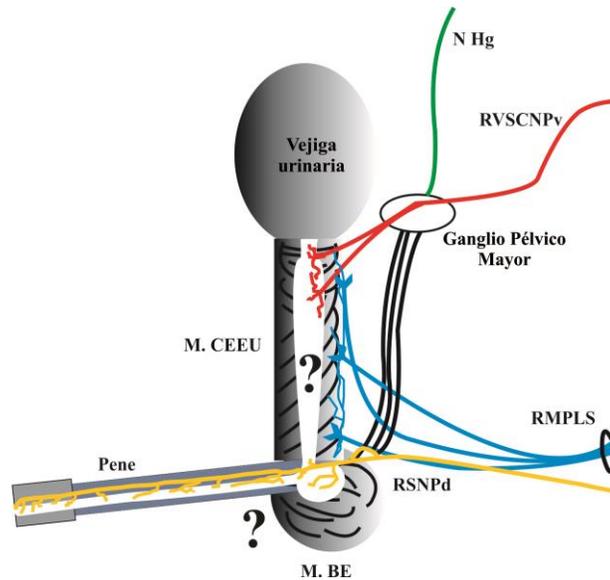


Figura 15. Esquema de la organización nerviosa del aparato urinario inferior de la rata macho. Al ganglio pélvico mayor llega el nervio hipogástrico (N Hg) y la rama viscerocutánea del nervio pélvico (RVSCNPv). La rama sensorial del nervio pudendo (RSNPd) se distribuye a lo largo del pene y en las glándulas prepuciales. Los músculos estriados perineales, incluyendo al complejo esfínter externo de la uretra (CEEU) y al bulboesponjoso (BE) están inervados por la rama motora del plexo sacro (RMPLS).

La uretra peneana está inervada por la rama sensorial del nervio pudendo (Pastelin y cols., 2008). Este nervio tiene intercomunicación con el GPM a través de 3 ramas anastomóticas, por lo que es posible que la uretra membranosa y el divertículo uretral estén inervados por los nervios pudendo y el pélvico (Pastelin y cols., 2008; Pastelin y cols., 2011). Estos nervios parecen tener inervación aferente y eferente (Dail y cols., 1989; McKenna y Nadelhaft, 1986; Pacheco y cols., 1997; Pastelin y cols., 2008).

Las motoneuronas que inervan al músculo CEEU de la rata se localizan en los núcleos dorsolaterales de los segmentos L6 y S1, sus axones viajan por la rama motora del plexo sacro (McKenna y Nadelhaft, 1986; Pacheco y cols., 1997) y sus placas motoras se localizan a lo largo de las paredes laterales del CEEU (Bierinx y Sebillé, 2006; Lehtoranta y cols., 2006). Este plexo está formado por dos ramas anastomóticas, una surge del nervio pudendo y la otra del tronco lumbosacro (Pacheco y cols., 1997).

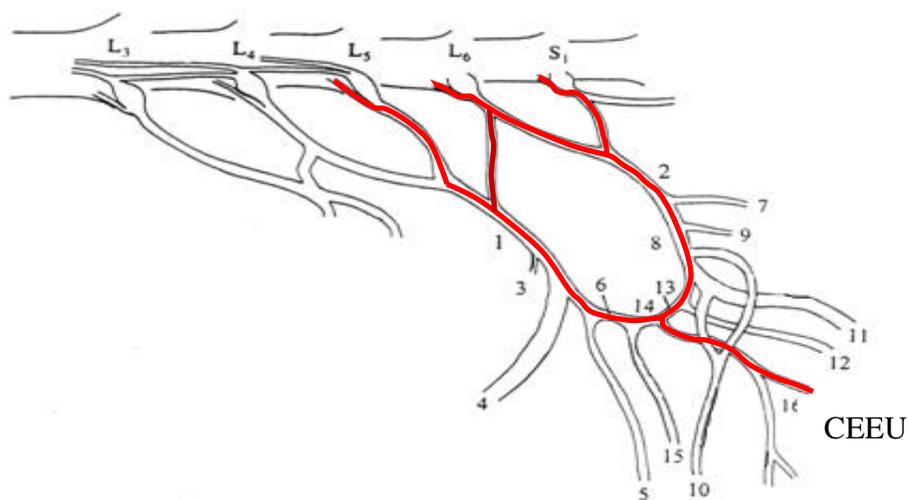


Figura 16. Organización del plexo sacro y del nervio pudendo en la rata macho. L3-S1, segmentos espinales lumbar 3 y sacro 1. Los números indican los siguientes nervios: tronco lumbosacro (1), tronco L6-S1 (2), rama al músculo glúteo (3), nervio ciático (4), rama al músculo semitendinoso (5), rama anastomótica (6), nervio pélvico (7), nervio pudendo (8), rama al músculo coccígeo (9), rama distal del escroto (10), rama sensorial (11), rama al músculo obturador interno (12), rama anastomótica (13), plexo sacro (14), rama proximal del escroto (15), **rama motora** (16). Modificado de Pacheco y cols., 1997.

La rama motora también inerva a los músculos estriados, BE e IC y al esfínter externo del ano (Pacheco y cols., 1997; Figura 16). Los axones que inervan al músculo bulboesponjoso viajan por las dos ramas anastomóticas (Pacheco y cols., 1997; Figura 17).

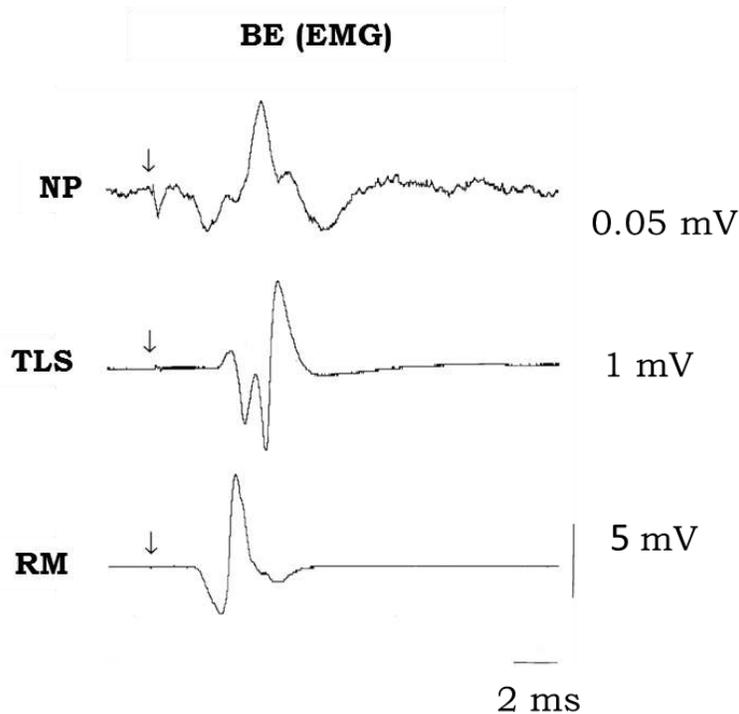


Figura 17. Respuesta electromiográfica del músculo BE después de estimular el nervio pudendo (NP), tronco lumbosacro (TLS) y la rama motora (RM). Modificado de Pacheco y cols., 1997.

En estudios electrofisiológicos se ha mostrado que la aplicación de pulsos eléctricos de bajo voltaje a la rama motora induce la contracción de las fibras circulares del músculo CEEU, que cubren a la uretra prostática (Pacheco, 2003). Al incrementar el voltaje se activan las fibras del músculo CEEU que cubren la uretra membranosa (Pacheco, 2003). Estos resultados sugieren que las fibras circulares y longitudinales del CEEU están inervadas por diferentes grupos de motoneuronas, sin embargo, no se conoce la distribución de los receptores sensoriales que disparan su actividad refleja. Es probable que los receptores sensoriales que evocan su actividad se encuentran en diferentes estructuras del aparato urogenital.

Hipótesis

1.- Los fascículos de las regiones craneal, medial y caudal del músculo CEEU responden diferencialmente a la estimulación mecánica de órganos urogenitales (escroto, prepucio, glande y uretra).

2.- Dado que en la región craneal no hay una clara división de fascículos izquierdo y derecho, los axones de la RMPS inervan a las fibras ipsilaterales y contralaterales del músculo CEEU.

3.- Las vías aferentes uretrales que activan al músculo CEEU viajan por los nervios pélvico y pudendo e integran la información en los segmentos espinales L6-S1.

Objetivo General

Caracterizar en la rata macho la actividad refleja del músculo CEEU y determinar los circuitos nerviosos periféricos del reflejo.

Objetivos Particulares

1.- Determinar si los fascículos de las regiones craneal, medial y caudal del músculo CEEU se activan diferencialmente en respuesta a la estimulación mecánica de órganos urogenitales (escroto, prepucio, glande y uretra).

2.- Determinar si la inervación eferente del músculo CEEU es exclusivamente ipsilateral.

3.- Determinar las vías aferentes uretrales que activan al músculo CEEU y el segmento espinal al que proyectan su información.

Se realizaron 3 experimentos para cumplir con los objetivos particulares.

Materiales y Métodos

Animales

Ratas macho adultos de la cepa Wistar de tres a cinco meses de edad mantenidos en condiciones estándar de bioterio, con una temperatura de 24 ± 2 °C, con ciclo de luz-oscuridad de 12:00 horas, agua y alimento (Nutrícubos Purina) ad libitum.

Diseño experimental

Se usaron 37 ratas distribuidas en tres experimentos. En el experimento 1 (n = 10) se determinó la actividad electromiográfica refleja de los fascículos de las regiones craneal, media y caudal del músculo CEEU (CEEUcr, CEEUme, y CEEUca) en respuesta a estímulos mecánicos aplicados al escroto, el prepucio, el glande y la uretra. En el experimento 2 (n = 8) se determinó si la inervación eferente del músculo CEEU es exclusivamente ipsilateral, para ellos se colocaron electrodos en las tres regiones del CEEU y se indujo la actividad del músculo de forma refleja estimulando la uretra prostática. Se registró la actividad electromiográfica antes y después de la sección de la RMPS derecha y la izquierda. En el experimento 3 (n = 19) se determinaron las vías aferentes uretrales que activan reflejamente al músculo CEEU así como los segmentos espinales en los que se proyecta la información sensorial. Para ello se indujo la actividad refleja del músculo mediante la estimulación mecánica de la uretra. Se registró la actividad electromiográfica del CEEU antes y después de neurectomias bilaterales de las ramas sensoriales del nervio pudendo y las ramas viscerocutáneas del nervio pélvico. En otros animales se registraron potenciales evocados en las raíces dorsales de los segmentos L5, L6 y S1 de la médula espinal durante la estimulación mecánica y eléctrica de la uretra.

Experimento 1. Actividad refleja del CEEU

Objetivo. Determinar si los fascículos de las regiones craneal, medial y caudal del músculo CEEU se activan diferencialmente en respuesta a la estimulación mecánica de órganos urogenitales (escroto, prepucio, glánde y uretra).

Métodos

Los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con uretano al 40 % a una dosis de 1.2 g/kg de peso. Cuando el experimento se prolongaba y era necesario se aplicaron dosis adicionales. Los animales fueron rasurados en la parte ventral de la área pélvica y colocados en posición supina. Con un microscopio estereoscópico (Leica MZ6) se realizó una laparotomía exploratoria para localizar el músculo (CEEU). Para la cirugía se dejó el lado derecho del área perigenital sin lesionar donde se realizó la estimulación cutánea. En algunos experimentos, antes de comenzar con el experimento se cortó el ápice de la vejiga urinaria y la línea media de la piel prepucial para poder realizar la estimulación uretral.

Estímulos mecánicos

1. Frotamiento de la piel perineal y del pene con un cotonete. Se aplicó de 6 a 10 Hz.
2. Compresión de la piel perineal del pene con unas pinzas de cirugía. Ligeramente sin lesionar la piel de cada región de la piel estimulada.
3. Distensión uretral (prostática y peneana). Se introdujo 5 mm un tubo de polietileno PE-50 (de 0.90 mm de diámetro) lubricado con aceite mineral por el cuello vesical hasta tocar la uretra prostática o por el meato uretral hasta el cuerpo del pene.

Sistema de registro electrofisiológico

Se registró simultáneamente la actividad electromiográfica de tres diferentes regiones del músculo CEEU. Para ello, se usó un sistema de registro formado por tres pares de electrodos de platino de 0.01 mm de diámetro, tres sondas de alta impedancia, un sistema de amplificadores Grass QP511, un transductor de señal (Digidata 1440A) y una computadora con el programa de AxoScope 10.2 (Figura 18).

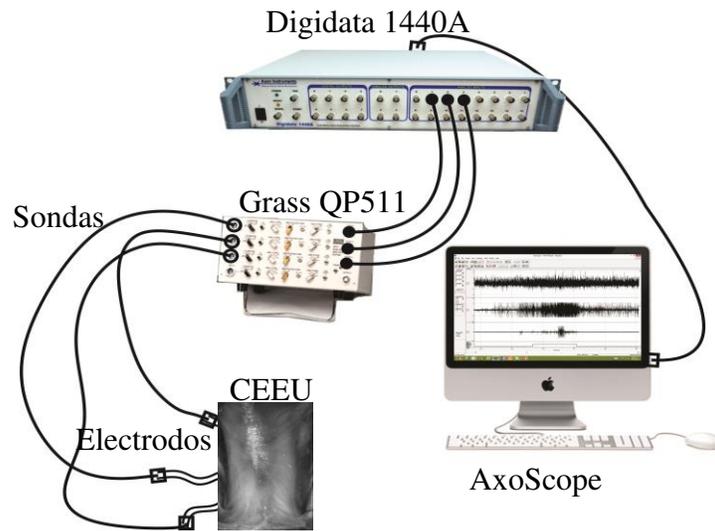


Figura 18. Sistema de registro de actividad eléctrica integrado por pares de electrodos bipolares de registro, 3 sondas de alta impedancia, amplificador y una computadora con tarjeta convertidor de señales analógicas (AxoScope versión 10.2).

Se registró la actividad EMG durante la estimulación mecánica del: Prepucio, glande (dorsal, ventral y la rostral), escroto (proximal y distal; Figura 19) y uretra; prostática y peneana (Figura 20).

La actividad del músculo CEEU se grabó continuamente, antes durante y después de la estimulación. Cada estimulación se aplicó sin un orden específico. Cuando el músculo presentó posdescarga se esperó de 2-5 min o más hasta que la actividad regresó a la actividad basal.

Áreas de estimulación somática

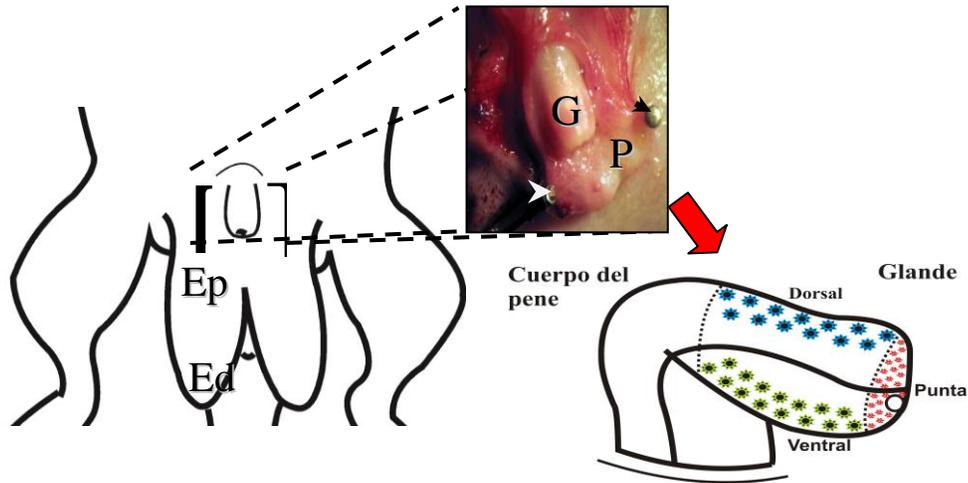


Figura 19. Esquemas de las áreas de estimulación. Se muestra al escroto proximal (Ep), al escroto distal (Ed); al prepucio (P) y de estimulación para el Glándula (G).

Áreas de estimulación visceral

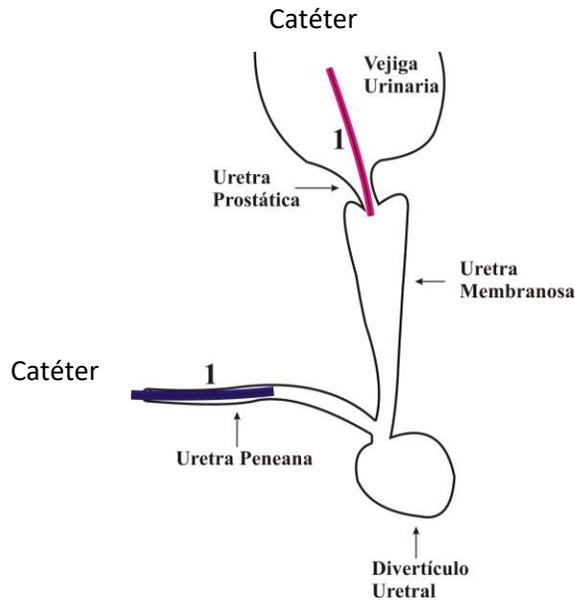


Figura 20. Esquema que muestra las regiones de la uretra de la rata macho y también las áreas donde se realizó la estimulación uretral.

Análisis estadístico.

Los datos fueron agrupados usando una hoja de cálculo de Excel. Cada variable se analizó mediante estadística descriptiva y se aplicó la prueba de normalidad. Para la comparación entre grupos se realizó un ANOVA de 1 Vía. El nivel de significancia fue de $p \leq 0.05$.

Resultados: Actividad refleja del músculo CEEU

Estimulación del escroto. El frotamiento del escroto no indujo actividad refleja del músculo CEEU. Sin embargo, la compresión del área proximal del escroto produjo activación de la región craneal del músculo CEEU, respondiendo en un 40 % (4/10) con una amplitud de $78 \pm 11 \mu\text{V}$.

Estimulación del prepucio. El frotamiento del prepucio indujo la activación en un 60% de la región craneal del músculo CEEU (6/10). En el 40% restante la estimulación activó las regiones del músculo CEEUcr, CEEUme y CEEUca, con una amplitud de respuesta de $98 \pm 46 \mu\text{V}$, $121 \pm 11 \mu\text{V}$, $9 \pm 3 \mu\text{V}$, respectivamente (Figura 21A). La compresión del prepucio activó a las 3 regiones del músculo CEEU en todos los animales. En la región medial la amplitud fue mayor (CEEU cr= $110 \pm 25 \mu\text{V}$, CEEU me= $132 \pm 55 \mu\text{V}$, CEEU ca= $16 \pm 13 \mu\text{V}$) y presentó posdescarga de 12 ± 5 seg. (Figura 22 A). La actividad electromiográfica de la región CEEUcr inició aproximadamente de 150–180ms antes que las regiones CEEUme y CEEUca.

Estimulación del glande. Un 70% de los animales respondieron al frotamiento (específicamente a la punta del glande) activando las tres regiones del músculo CEEU (CEEUcr= $81 \pm 35 \mu\text{V}$; CEEUme= $125 \pm 20 \mu\text{V}$ y CEEUca= $17 \pm 6 \mu\text{V}$) y la región CEEUme tuvo una posdescarga mayor a 5 segundos (Figura 21B). Al aplicar el estímulo de compresión, el 100% de los animales respondieron y se activaron las tres regiones del músculo CEEU (amplitud: CEEUcr= $126 \pm 42 \mu\text{V}$; CEEUme= $140 \pm 29 \mu\text{V}$ y CEEUca= $24 \pm 4 \mu\text{V}$; Figura 23). En todos los casos, la actividad electromiográfica de la región CEEUcr inició aproximadamente 400 ms después de haberse activado las regiones mediales y caudales (Figura 22 B).

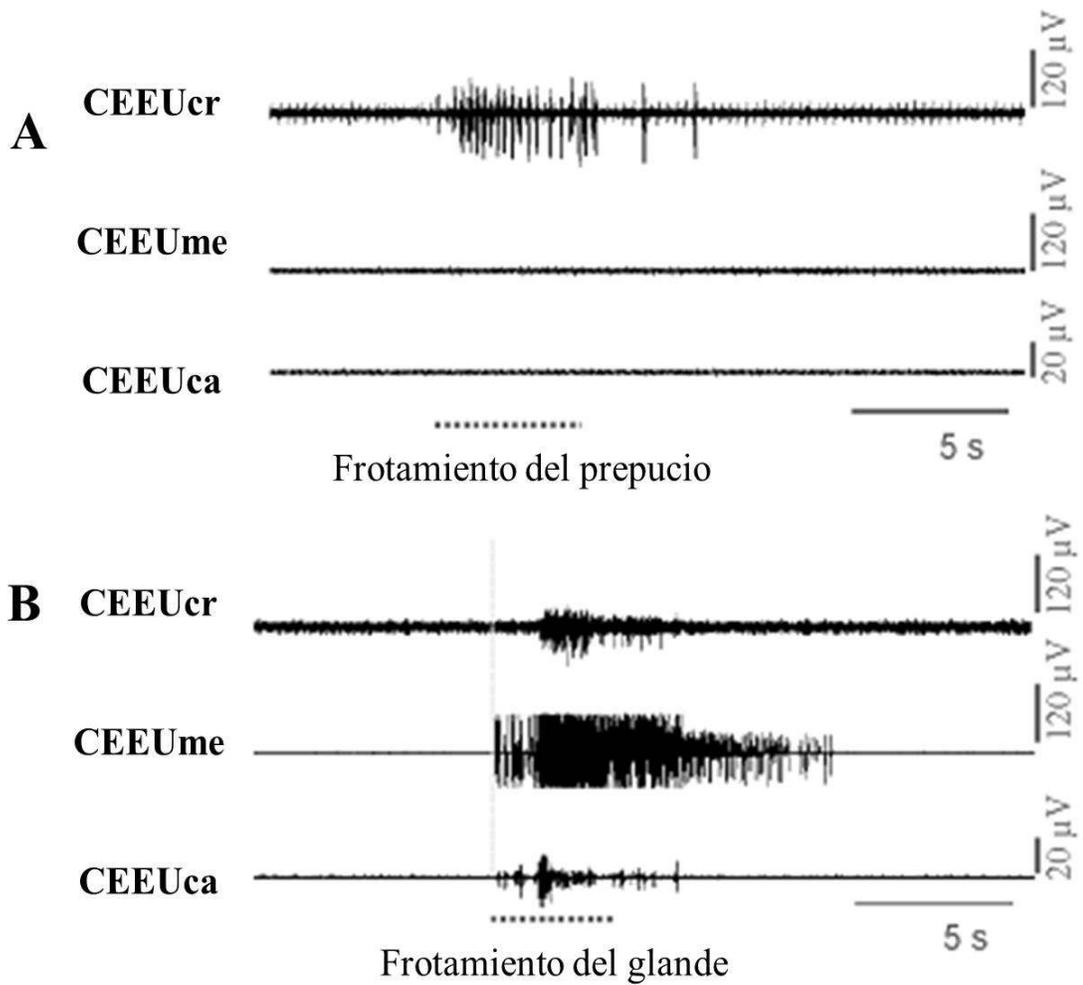


Figura 21. Registros electromiográficos de las regiones del músculo CEEU (craneal= CEEUcr, medial= CEEUme y caudal= CEEUca) registradas simultáneamente durante la estimulación mecánica; antes, durante y después, del frotamiento del prepucio (A) o del glande (B). La línea punteada horizontal inferior indica la duración del estímulo.

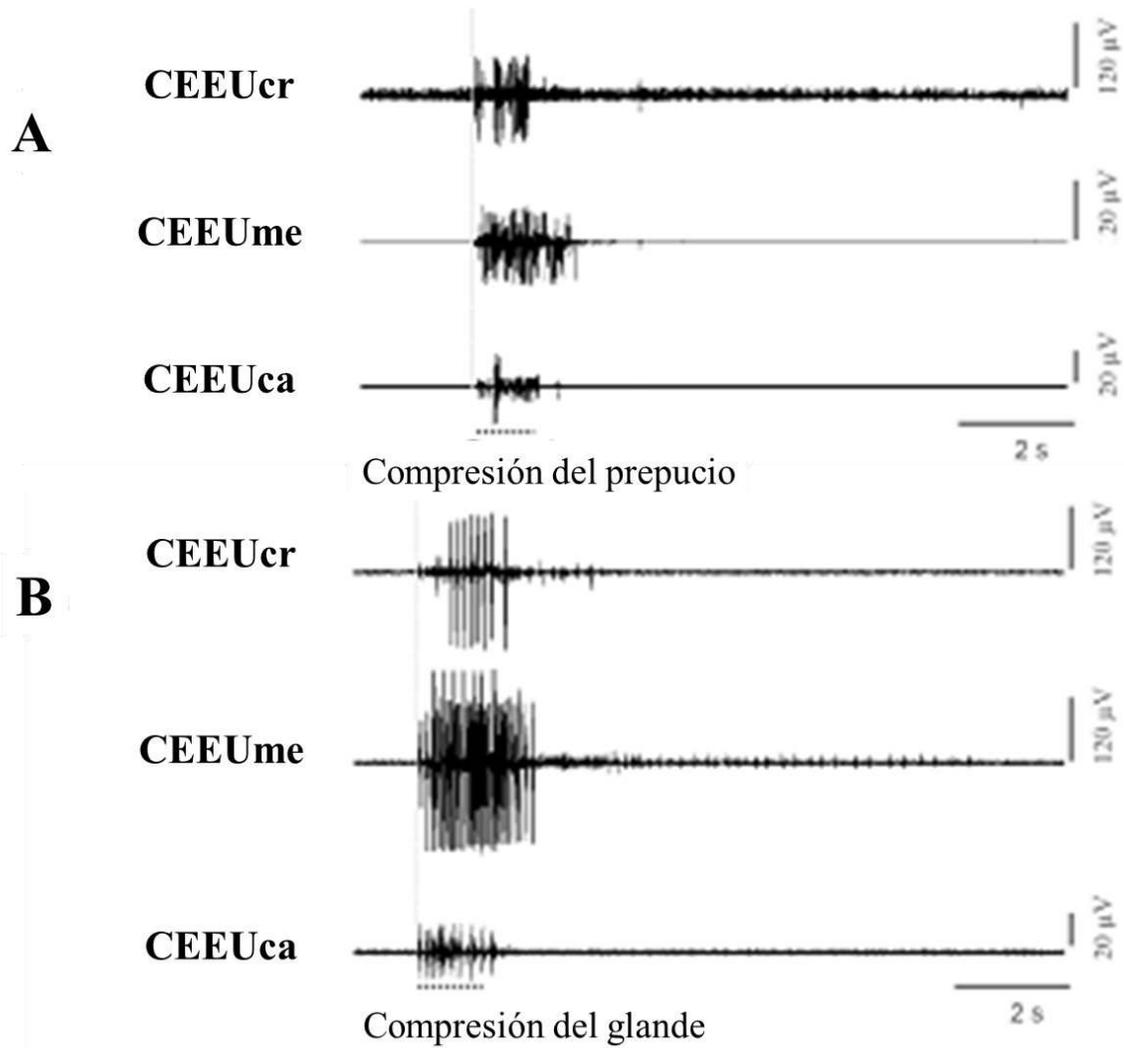


Figura 22. Registros electromiográficos de las regiones del músculo CEEU (craneal= CEEUcr, medial= CEEUme y caudal= CEEUca) registradas simultáneamente durante la estimulación mecánica; antes, durante y después de la compresión del prepucio (A) o del glande (B). La línea punteada horizontal inferior indica la duración del estímulo.

A continuación se presenta la duración \pm e.e. de la posdescarga de cada región del músculo CEEU, cuando se aplicó compresión al prepucio y a la punta del glande. Note que la región medial presentó mayor posdescarga cuando se estimuló el glande (Anova de 1 Vía; $p = 0.0004$; Figura 23).

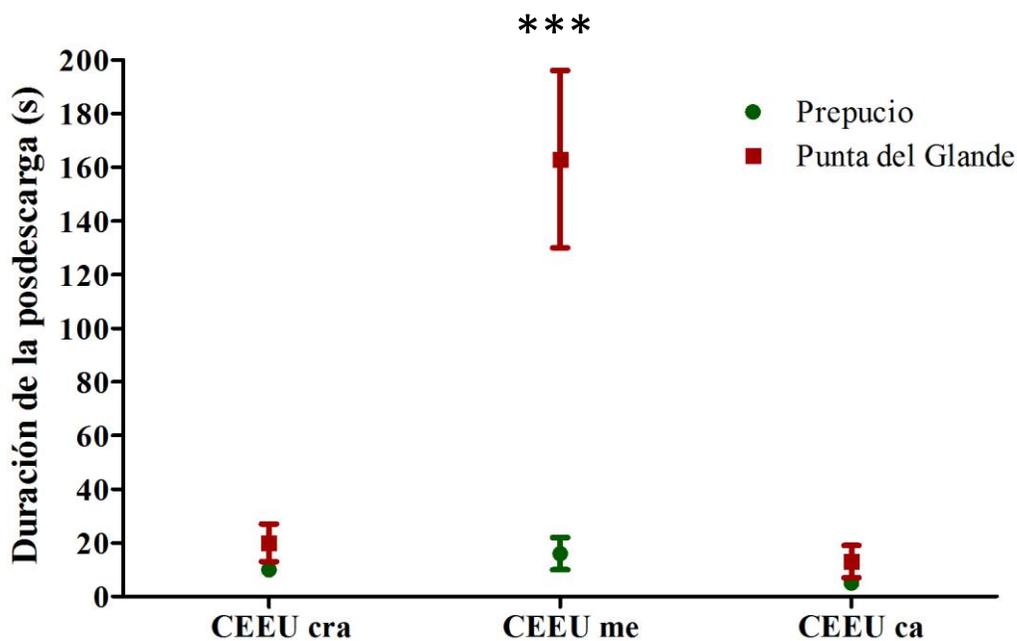


Figura 23. Gráfica que muestra la duración \pm e.e. de la posdescarga en cada región cuando se aplicó compresión al prepucio y al glande. *** muestran la diferencia entre los grupos.

Estimulación uretral. La estimulación de la uretra penenana y de la uretra prostática activó a las 3 regiones del músculo CEEU. Cuando se estimuló la uretra peneana la amplitud de la señal electromiográfica fue menor en la región caudal ($CEEU_{cr} = 146 \pm 58 \mu V$, $CEEU_{me} = 189 \pm 79 \mu V$ y $CEEU_{ca} = 40 \pm 18 \mu V$, Figura 24 A). Las regiones $CEEU_{cr}$ y $CEEU_{me}$ presentaron una posdescarga de 60-108 sec. Aparentemente las tres regiones responden de manera sincronizada a la estimulación. La actividad electromiográfica basal de la región craneal se incrementó al cortar el domo de la vejiga urinaria. Al estimular a la uretra prostática la amplitud de la actividad de las tres regiones fue de: $CEEU_{cr} = 172 \pm 43 \mu V$, $CEEU_{me} = 188 \pm 31 \mu V$ y $CEEU_{ca} = 38 \pm 11 \mu V$ (Figura 24 B). Las regiones $CEEU_{cr}$ y $CEEU_{me}$ presentaron posdescarga ($> a 100\ 000$ ms).

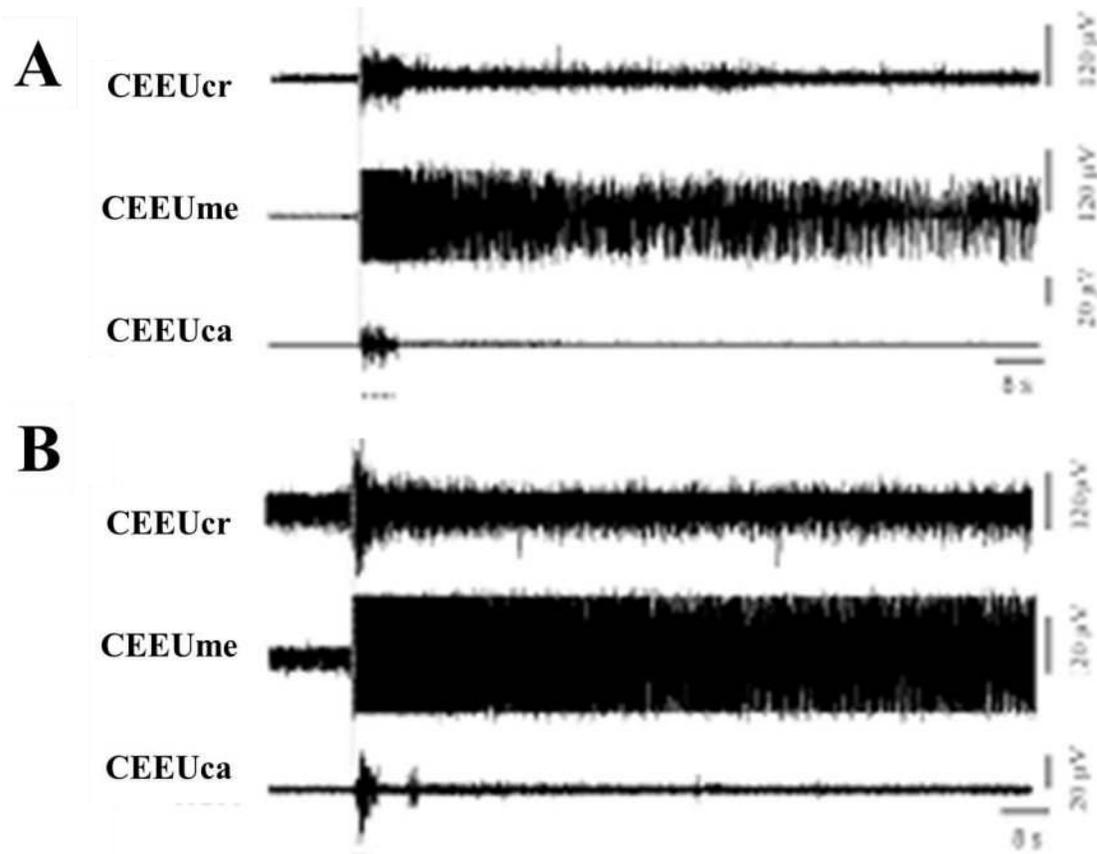


Figura 24. Registros electromiográficos de las regiones del músculo CEEU (craneal= CEEUcr, medial= CEEUme y caudal= CEEUca) registradas simultáneamente durante la estimulación mecánica; antes, durante y después de la distensión de la uretra peneana (A) o la prostática (B). La línea punteada horizontal inferior indica la duración del estímulo.

La actividad basal de la región craneal presentó mayor amplitud previa al estímulo (Basal CEEUcr: $10 \pm 3 \mu\text{V}$, CEEUme: $4 \pm 3 \mu\text{V}$ y CEEUca: $1 \pm 0.5 \mu\text{V}$). El estímulo uretral indujo posdescargas de mayor duración en las regiones craneal y medial, pero no en la región caudal (ANOVA de una vía; $p = 0.0014$; Figura 26).

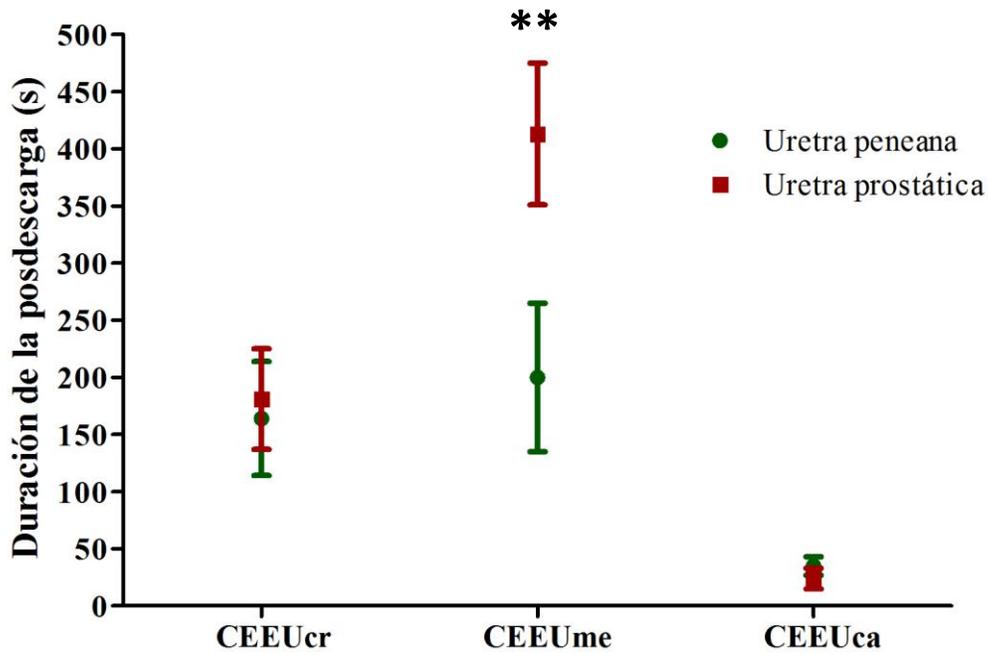


Figura 26. Gráfica que muestra la duración \pm e.e. de la posdescarga cuando se estimuló la uretra peneana y la prostática. ** muestran la diferencia significativa entre los grupos.

Discusión

Los resultados del presente experimento indican que el músculo CEEU se activa de forma diferenciada en sus tres regiones (CEEUcr, CEEUme y CEEUca) durante la estimulación de estructuras urogenitales, lo que sugiere que son 3 fascículos musculares con unidades motoras diferentes.

La estimulación del escroto distal no indujo actividad refleja del CEEU. Probablemente son pocos los receptores localizados en el escroto que inducen la actividad refleja del músculo o necesitan de mayor intensidad de estimulación para que logren activarlo.

Durante la estimulación por frotamiento o compresión de estructuras perigenitales o por distensión uretral (penenana y prostática), la actividad basal de la parte craneal fue de mayor amplitud, lo que podría contribuir al correcto cierre del cuello vesical manteniendo la continencia urinaria y evitando la eyaculación retrograda (Cruz y Downie, 2005; Juarez y Cruz, 2014; Lehtoranta y cols., 2006). Las fibras de la región medial presentaron mayor amplitud en respuesta a la distensión uretral, lo que sugiere que podrían participar en la expulsión de orina o de semen durante la eyaculación (Bierinx y Sebillie, 2006; Cruz y Downie, 2005; Juarez y Cruz, 2014; Lehtoranta y cols., 2006). A diferencia de la parte craneal y medial, la actividad de la región caudal es de diferente amplitud con respecto a las otras 2 regiones, por lo que probablemente necesite de mayor estimulación uretral para el reclutamiento de sus motoneuronas.

Durante la cópula, cuando se producen montas e intromisiones, la estimulación mecánica del prepucio y el glande puede inducir una activación a largo plazo de la CEEUcr, así como una respuesta de corto plazo de las regiones CEEUme y CEEUca (esto se dedujo por el hecho de que el cepillado y compresión no indujo una larga posdescarga). Este patrón de activación de los fascículos del CEEUcr podría aumentar la presión de la región rostral de la uretra para mantener la continencia urinaria, pero no impedir el paso del semen a la uretra membranosa durante la emisión seminal. El hecho de que la estimulación uretral induce un largo periodo de posdescarga en el CEEUcr y CEEUme pero no en el CEEUca, sugiere que la presión uretral puede variar a lo largo del tracto durante la eyaculación, con la presión baja en la región CEEUca. La presión diferencial a través de la

uretra puede ser de alta relevancia para la facilitación de la expulsión del semen anterógrada.

Los receptores sensoriales que activan de forma refleja al CEEU se localizan en el escroto proximal, el prepucio, el glande y la uretra, por lo que los reflejos son: somato-somáticos y viscero-somáticos. En los seres humanos se activan reflejos somato-somáticos para determinar la funcionalidad de los músculos estriados perineales, tal es el caso del reflejo del BE (Ertekin y Reel, 1976; Wester y cols., 2003).

El CEEU está inervado por la rama motora del plexo sacro (McKenna y Nadelhaft, 1986; Pacheco y cols., 1997) y sus motoneuronas se encuentran en los núcleos dorsolaterales en los segmentos L6 y S1 de la médula espinal (McKenna y Nadelhaft, 1986; Schroder, 1980). De acuerdo a nuestros resultados de actividad refleja los fascículos del CEEU pueden estar regulados por tres diferentes grupos de motoneuronas

Experimento 2. Vías eferentes del CEEU

Objetivo. Determinar si la inervación eferente del músculo CEEU es exclusivamente ipsilateral.

Métodos

Los animales fueron distribuidos en 2 grupos experimentales. En el grupo 1, se realizó la neurectomía de la rama motora del plexo sacro derecha del animal (NxRMPS-DR) y después se cortó la rama motora contralateral. En el grupo 2, se realizó el corte de la rama motora izquierda primero y después la contralateral (NxRMPS-IZ).

Los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con uretano al 40% a una dosis de 1.2 g/kg de peso. Cuando fue necesario se aplicaron dosis adicionales. Los animales fueron rasurados de la parte ventral del área pélvica y colocados en posición supina. Se realizó una laparotomía exploratoria y con un microscopio estereoscópico (Leica MZ6) se localizó al CEEU y a la RMPS de acuerdo a la descripción de Pacheco 1997.

En ambos grupos se registró la actividad EMG de las tres regiones del CEEU bilateralmente de forma simultánea durante la estimulación de la uretra prostática. Se introdujo el catéter hasta el divertículo. Para los EMG se usó el sistema de registro descrito en el experimento 1 y se registró la actividad muscular antes y después de cortar unilateralmente la rama motora del plexo sacro (NxRMPS-DR o RMPS-IZ).

Resultados

Vías eferentes del CEEU (n= 4 por grupo)

En el grupo 1 la neurectomía de la RMPS derecha no eliminó la respuesta ipsilateral a la estimulación uretral en las 3 regiones del CEEU. La actividad del CEEUcr y CEEUme se reducen en un 70 %. La actividad del CEEUca sólo disminuye en un 50% (Figura 27 y 28).

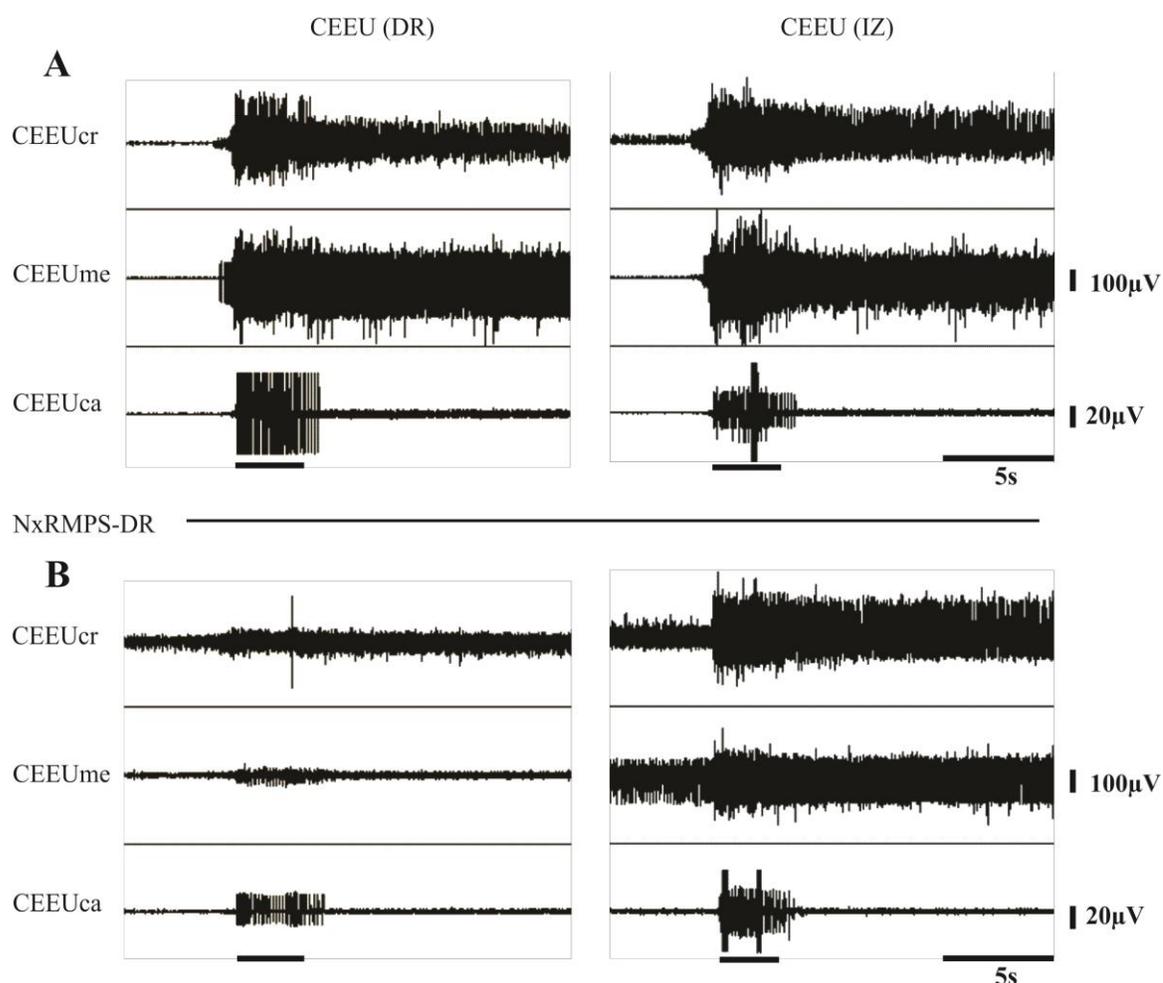


Figura 27. Registros electromiográficos simultáneos de los CEEU craneal, medial y caudal (CEEUcr, CEEUme y CEEUca), izquierdo y derecho, durante la estimulación de la uretra prostática hasta el divertículo uretral. A) Muestra la actividad preneurectomía y B) la actividad posterior a la neurectomía de la rama motora del plexo sacro derecha (NxRMPS-DR). La línea inferior muestra la duración del estímulo. Note que la actividad del lado denervado no se elimina por completo.

Al cortar la rama motora izquierda la actividad del CEEU se eliminó por completo.

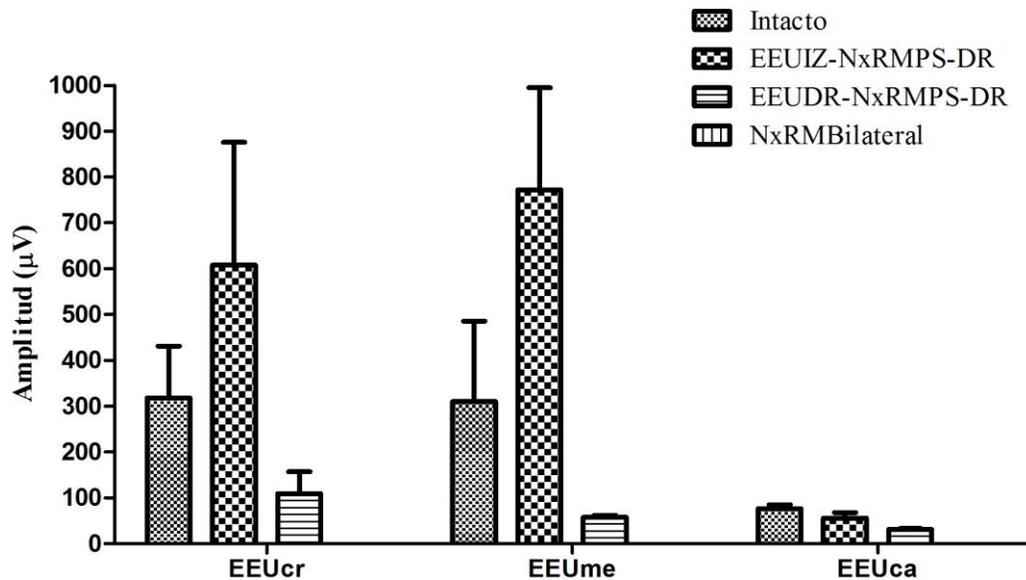


Figura 28. Gráfica que muestra la amplitud del EMG de las regiones del EEU craneal, medial y caudal (EEUcr, EEUme, EEUca) durante la estimulación uretral, antes y después de la neurectomía de la rama motora derecha (NxRNPS-DR). Lado izquierdo (IZ) y lado derecho (DR).

Al hacer la neurectomía de la RMPS izquierda se encontraron resultados similares a los presentados arriba, la neurectomía disminuyó la actividad EMG del EEUcr y EEUme ipsilateral a la denervación en un 70 % y solo un 20 % en el EEUca (Figura 29 y 30). Al cortar la rama derecha la actividad EMG de las tres regiones fue abolida.

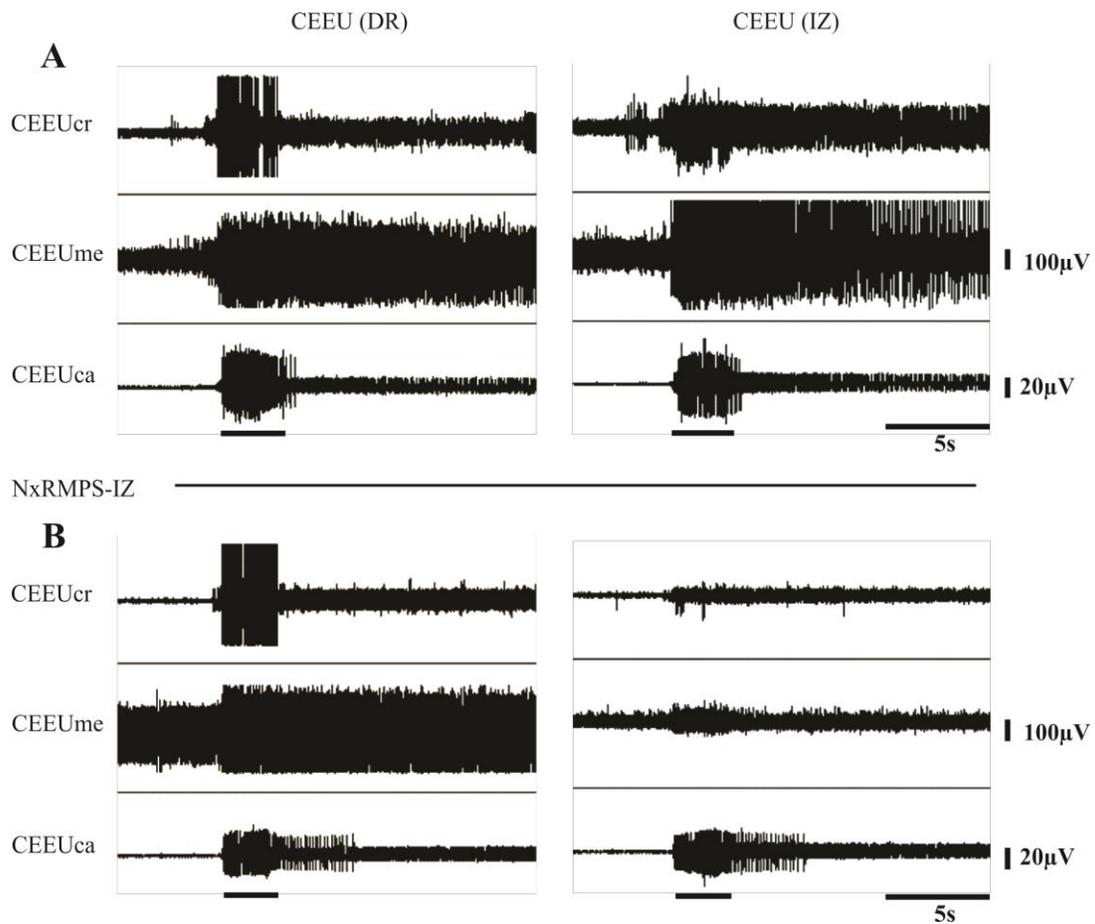


Figura 29. Registros electromiográficos simultáneos de los CEEU craneal, medial y caudal (CEEUcr, CEEUme y CEEUca), izquierdo y derecho, durante la estimulación de la uretra prostática hasta el divertículo uretral. A) Muestra la actividad preneurectomía y B) la actividad posterior a la neurectomía de la rama motora del plexo sacro izquierda (NxRMPS-DR). La línea inferior muestra la duración del estímulo. Note que la actividad del lado denervado no se elimina por completo.

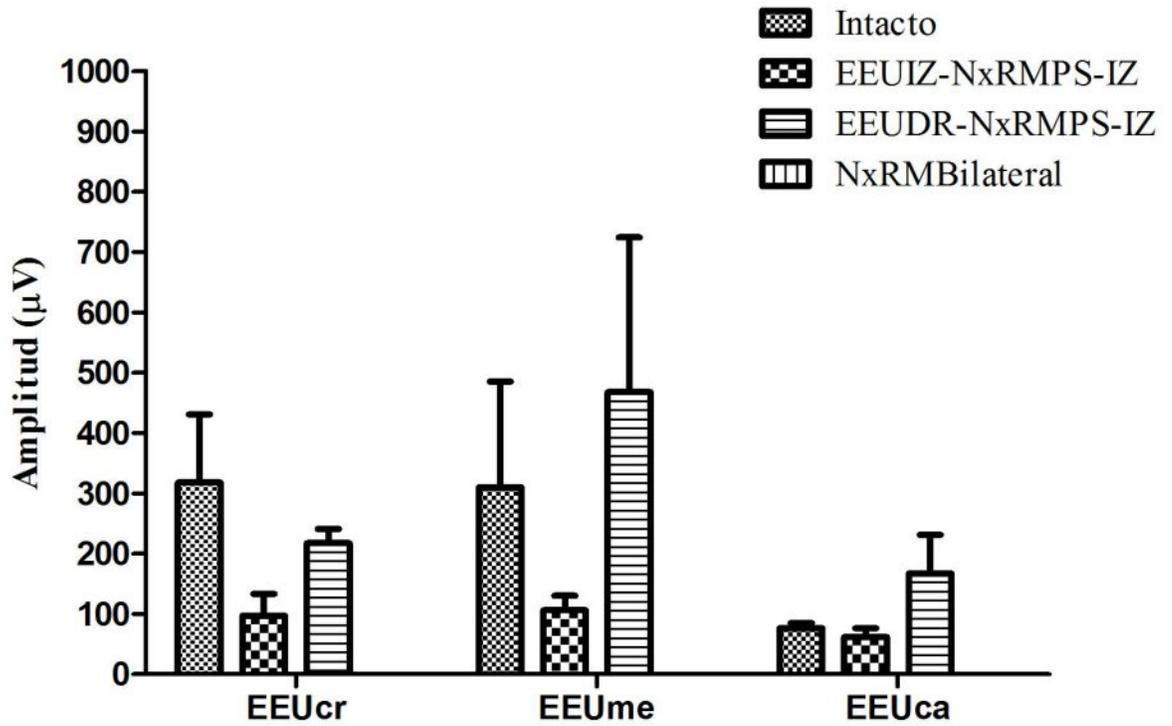


Figura 30. Gráfica que muestra la amplitud del EMG de las regiones craneal, medial y caudal del CEEU durante la estimulación uretral, antes y después de la neurectomía de la rama motora izquierda (NxRNPS-IZ). Lado izquierdo (IZ) y lado derecho (DR).

Discusión

Los resultados mostrados en este experimento corroboran estudios previos que indican que el CEEU está inervado por la rama motora del plexo sacro (Pacheco y cols., 1997), ya que al denervar bilateralmente la estimulación uretral ya no indujo actividad refleja en ninguna región del CEEU. El hecho de que al denervar unilateralmente no se haya eliminado por completo la actividad EMG del CEEU ipsilateral sugiere que probablemente algunos axones de la rama motora no solo inervan al CEEU ipsilateralmente sino que también inervan a fibras del lado contralateral, de tal forma que algunas unidades motoras pueden estar formadas con fibras musculares de ambos lados del CEEU. Otra posibilidad es que tal como se ha propuesto, exista un músculo que rodea circularmente a la uretra, y que la actividad residual provenga de este músculo.

Las fibras del CEEUcr tienen forma circular sin evidencia en anatomía gruesa de que exista una separación en lado izquierdo y derecho, sin embargo, el hecho de que la denervación unilateral disminuye significativamente la actividad del lado neurectomizado confirma que existe fascículo izquierdo y derecho.

El hecho de que la denervación afectó en menor grado la actividad del CEEUca sugiere que esta región puede estar constituida por un solo fascículo con inervación de ambas ramas motoras (Figura 31).

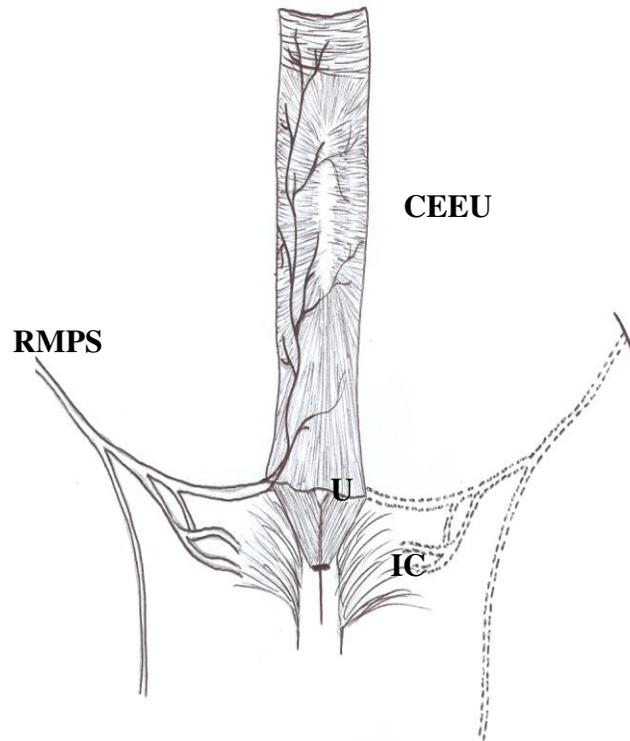


Figura 31. Esquema de la distribución de la rama motora del plexo sacro (RMPS). Se muestra la organización de las fibras musculares del complejo esfínter externo de la uretra (CEEU). En la parte inferior se observan a los músculos: uretralís (U) e isquicavernoso (IC).

Experimento 3. Inervación aferente de la uretra

Objetivo. Determinar las vías aferentes uretrales que activan al músculo CEEU y el segmento espinal al que proyectan su información.

Métodos. Aferencias uretrales que desencadenan la actividad del CEEU

Los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con uretano al 40% a una dosis de 1.2 g/kg de peso. Cuando fue necesario se aplicaron dosis adicionales. Se rasuró la parte ventral de la región pélvica y se colocó al animal en posición supina. Se localizó al CEEU, al ganglio pélvico mayor (GPM) y a la rama sensorial del nervio pudendo (RSNPd), de acuerdo a la descripción de Pastelín y cols, 2011.

Los animales fueron distribuidos en 2 grupos experimentales. En el grupo 1 se realizaron neurectomias bilaterales de la RSNPd y luego de la rama viscerocutánea del nervio pélvico (RVSCNPv). En el grupo 2 primero se cortó la RVSCNPv y luego la RSNPd.

En ambos grupos se registró la actividad EMG de las tres regiones del CEEU, simultáneamente, durante la estimulación uretral usando el sistema de registro descrito en el experimento 1. Se registró la actividad EMG antes y después de la sección bilateral de cada nervio (RSNPd- RVSCNPv).

Resultados

Aferencias uretrales que desencadenan la actividad del CEEU (n= 2 por grupo)

La neurectomía de la RSNPd eliminó la actividad de las 3 regiones del CEEU en respuesta a la estimulación de la Upn. La actividad EMG del CEEU en respuesta a la estimulación de la Upr disminuyó en el CEEUcr y el CEEUme en un 10-20% (Figura 32). La actividad del CEEUca se redujo en más del 50%. Al cortar los 2 nervios (RSNPd + RVSCNPv) la actividad EMG refleja fue abolida.

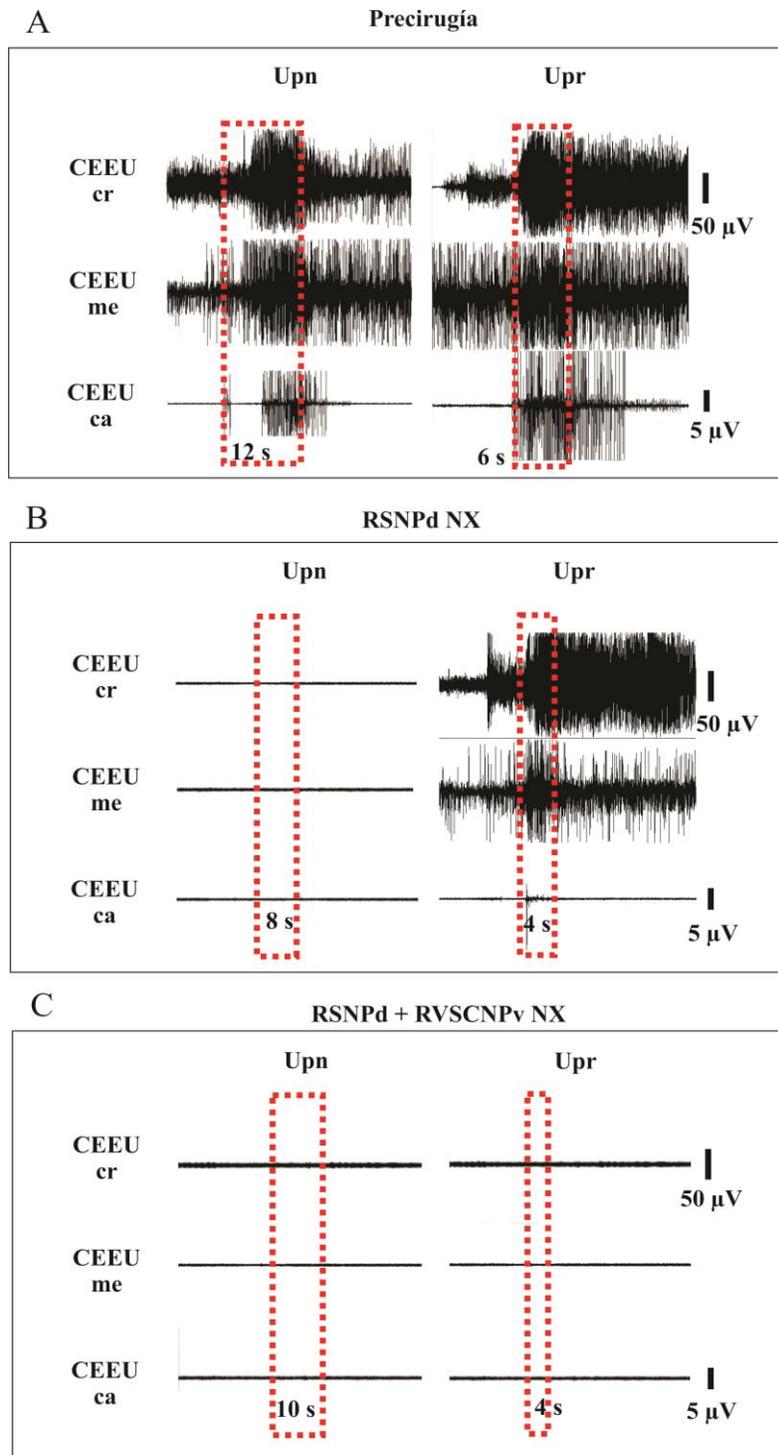


Figura 32. Registros electromiográficos del CEEU craneal, medial y caudal (CEEUcr, CEEUme y CEEUca durante la estimulación de la uretra peneana (Upn) o la prostática (Upr), antes (A) y después de la neurectomía de la rama sensorial del nervio pudendo (RSNPd, B) y la rama viscerocutánea (RVSCNPv, C). Los recuadros muestran la duración del estímulo.

La amplitud y la frecuencia de disparo de la actividad EMG de las tres regiones del CEEU se muestran en la Figura 33. Note que al estimular la uretra prostática la amplitud de la parte craneal es de alrededor de 25 μV y su frecuencia de disparo es de alrededor de 250 Hz, mucho menor que la registrada en las otras dos regiones del CEEU.

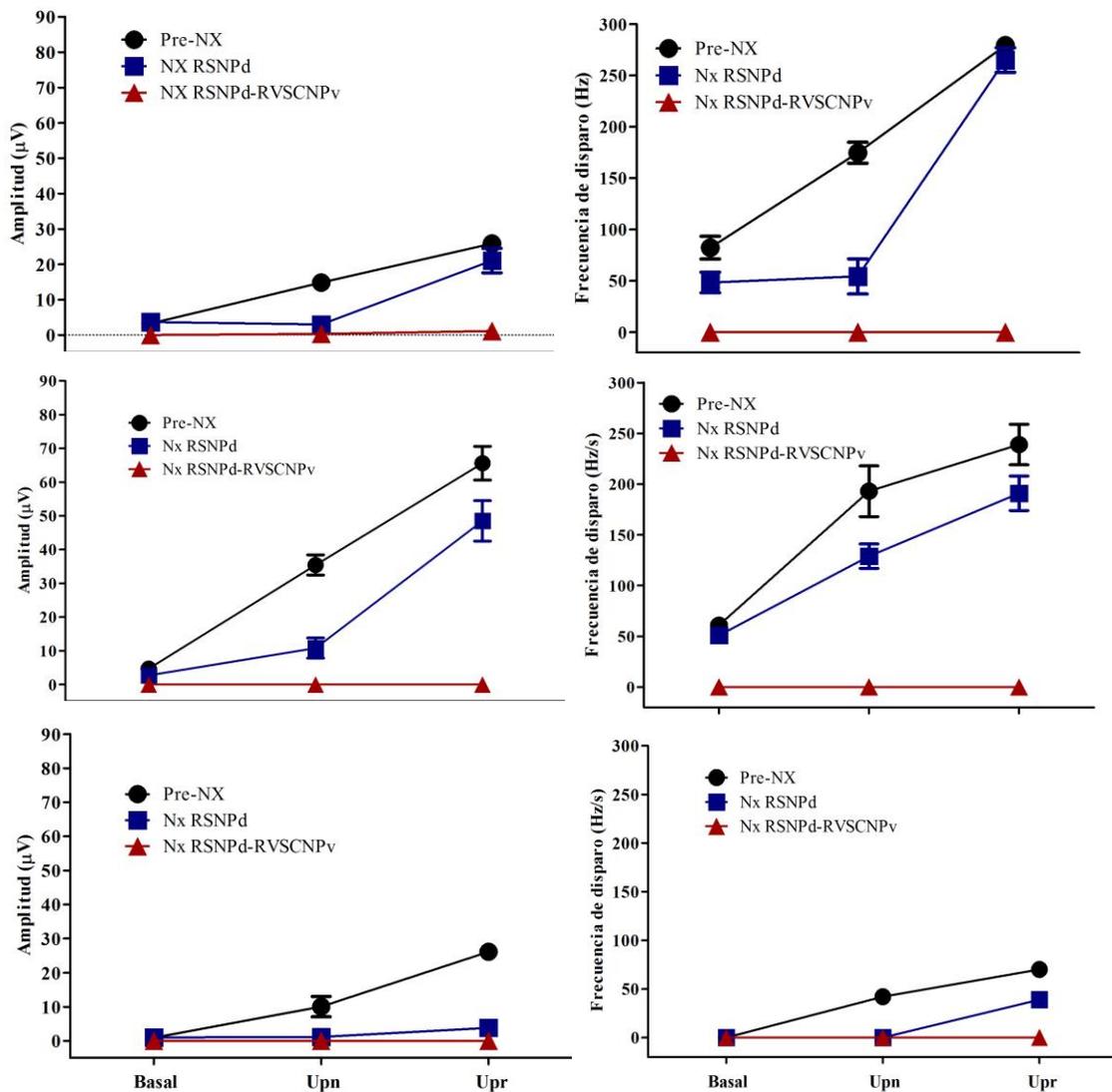


Figura 33. Gráficas de la amplitud y la frecuencia de la actividad EMG de las regiones craneal, medial y caudal del CEEU, registrada durante la estimulación de la uretra peneana (Upn) y la prostática (Upr). Se puede observar el efecto de la neurectomía bilateral de la rama sensorial del nervio pudendo (RSNPd) y de la rama viscerocutánea (RVSCNPv).

La neurectomía de la RVSCNPv incrementó la actividad EMG de las regiones medial y caudal del CEEU en respuesta a la estimulación de la Upn pero disminuyó la actividad de la región craneal del CEEU (Figura 34). Al cortar los 2 nervios (RVSCNPv + RSNPd) la actividad EMG refleja fue abolida.

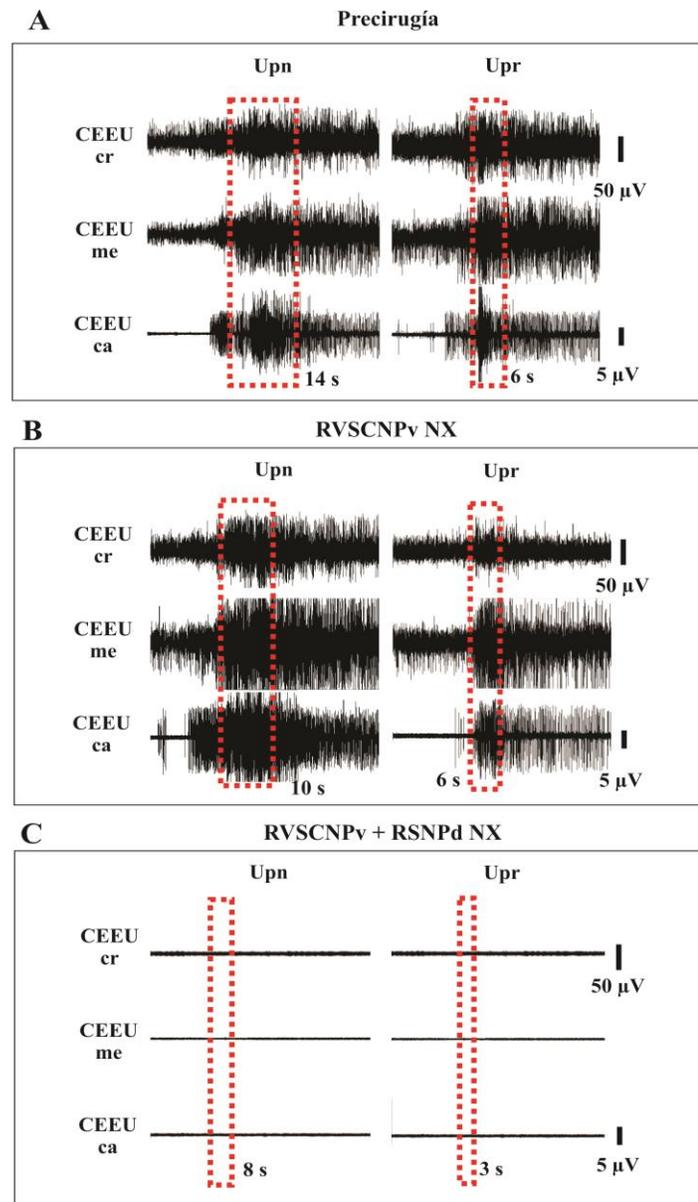


Figura 34. Actividad EMG del CEEU craneal, medial y caudal (CEEUcr, CEEUme y CEEUca) registrados durante la estimulación de la uretra peneana (Upn) y la prostática (Upr). A) Muestra la actividad antes y B) después de la neurectomía de la RVSCNPv. C) indica los registros posteriores a la neurectomía de la RVSCNPv + RSNPd. Los recuadros muestran la duración del estímulo.

Después de la Nx de RVSCNPv, al estimular la UPn la actividad EMG de la región medial y caudal del CEEU aumenta en amplitud y en frecuencia de disparo. Esto sugiere que este reflejo estaría facilitándose con la neurectomía de la RVSCNPv (Figura 35).

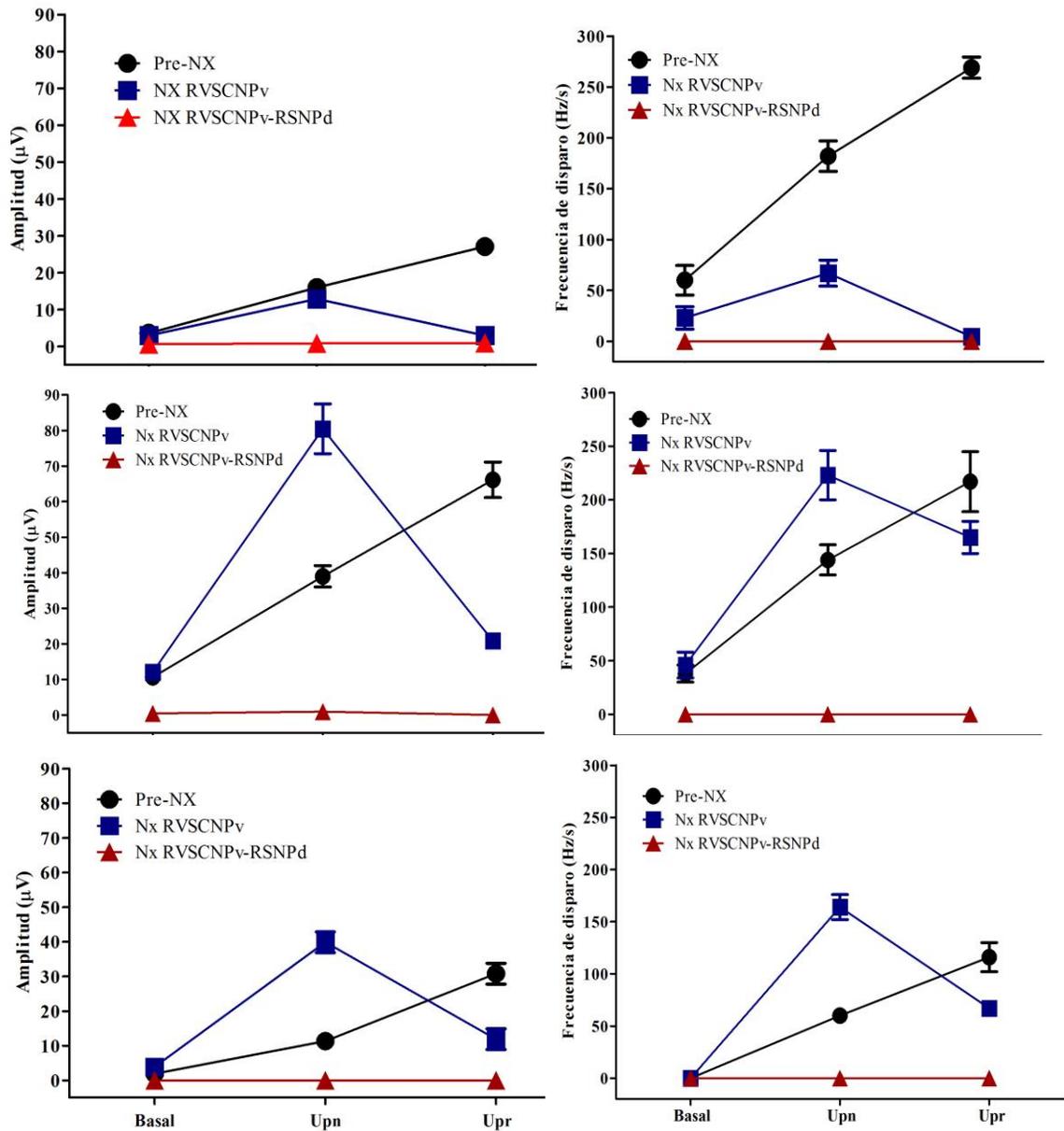


Figura 35. Gráficas de la amplitud y la frecuencia de la actividad EMG de las regiones craneal, medial y caudal del CEEU, registrada durante la estimulación de la uretra peneana (Upn) y la prostática (Upr). Se puede observar el efecto de la neurectomía bilateral de la rama viscerocutánea (RVSCNPv) y la rama sensorial del nervio pudendo (RSNPd).

Proyección aferente de la uretra en la médula espinal de la rata macho

Método. Una vez que los animales fueron anestesiados con uretano se rasuró la parte ventral de la región pélvica y se cortaron los ligamentos suspensorios del pene y la parte dorsal del prepucio. Se colocó al animal en posición prona y se rasuró la espalda de las ratas, desde L1 hasta C1. Se realizó una laminectomía para localizar las raíces dorsales bilaterales L5, L6 y S1 de la médula espinal. El animal fue colocado en un estereotáxico (Stoelting 51600E) donde se realizó una poza con la piel de la espalda, la cual fue llenada con aceite mineral a una temperatura de 30-35 °C.

Los animales fueron distribuidos en 2 grupos experimentales. En el grupo 1 se realizó estimulación mecánica de la uretra peneana y la membranosa mediante un catéter Fogarty (insuflación del catéter 0.3 ml). En el grupo 2 se estimuló eléctricamente (pulsos eléctricos 0.02ms, 2-4V, 1Hz) a la uretra peneana usando un electrodo bipolar (dentro de una cánula) que se introdujo por el meato uretral hasta distintas profundidades (5, 10, 15 y 20 mm) de la uretra peneana.

En ambos grupos se registró la actividad electroneurográfica (ENG) de las tres raíces dorsales (L5, L6 y S1) durante la estimulación uretral usando tres pares de electrodos bipolares de plata clorurada que fueron conectados a un amplificador (Grass P511) y a un osciloscopio (Tecktronix), donde se capturaron fotografías de la actividad eléctrica de cada raíz con una cámara digital (Casio Exilim 12.1).

Resultados

En el grupo 1 (n= 4) la estimulación de la uretra membranosa o de la peneana evocó potenciales en la raíz dorsal del segmento L6, con una amplitud de $300 \pm 50 \mu\text{V}$ (Figura 36).

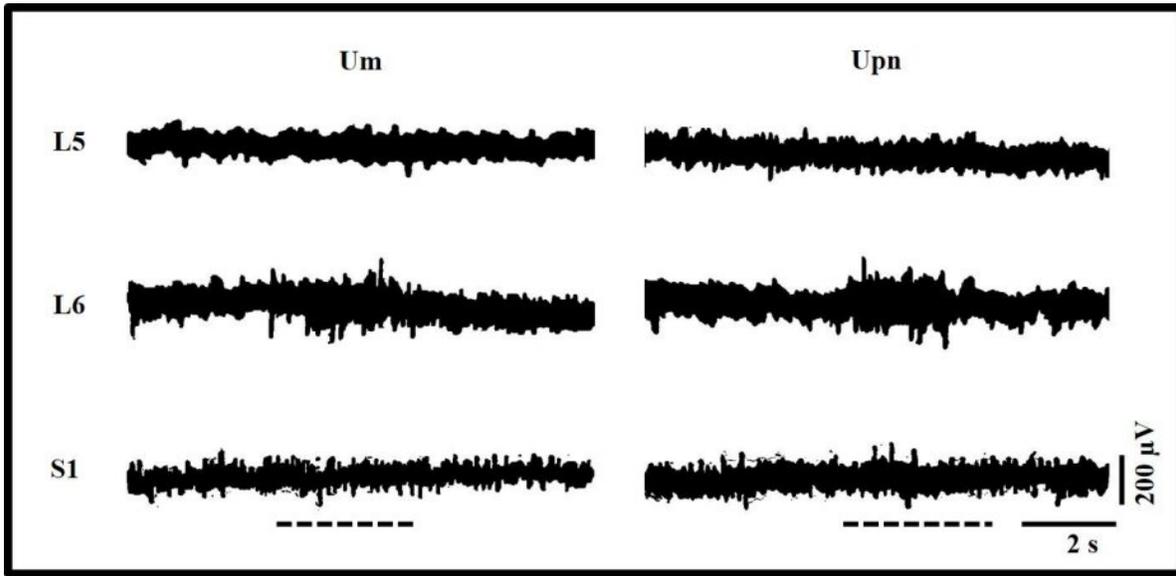


Figura 36. Registros de actividad eléctrica de raíces dorsales en los segmentos L5, L6 y S1 de ratas intactas. La línea inferior punteada de los registros indica el tiempo que se estimuló la uretra membranosa (Um) y la uretra peneana (Upn) con el catéter. Solo en L6 se produjo un incremento de actividad durante la aplicación del estímulo.

En el grupo 2 (n= 7), la estimulación eléctrica de distintas profundidades de la uretra peneana generó potenciales en el segmento L6. Los potenciales estuvieron conformados por varios componentes de distinta latencia de aparición. Al estimular la uretra a los 20 y 15 mm de profundidad, el primer componente de los potenciales presentó una latencia de 1.6 ± 0.08 ms y 1.5 ± 0.08 ms, respectivamente. En cambio, en profundidades de 10 y 5 mm, las respuestas tuvieron una latencia de 2.1 ± 0.2 ms y 2.4 ± 0.2 ms (Figura 37).

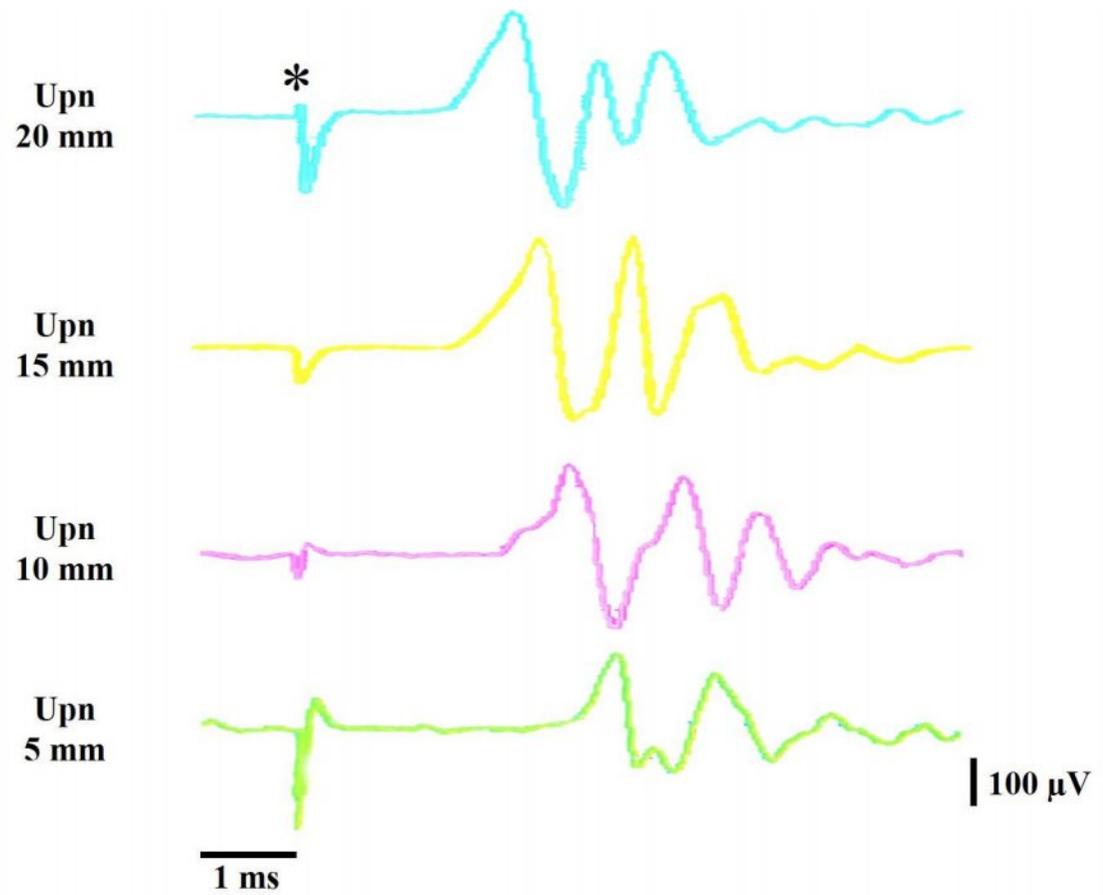


Figura 37. Registros electroneurográficos de la raíz dorsal del segmento L6 de la médula espinal durante la aplicación de pulsos eléctricos (1 Hz, n=7) a diferentes profundidades de la uretra peneana (Upn). El asterisco indica el momento del estímulo.

Discusión

Los resultados encontrados en este experimento sugieren que las aferencias uretrales se integran mayoritariamente en el segmento L6 de la médula espinal. Las aferencias de la uretra peneana que proyectan a la médula espinal viajan exclusivamente por la RSNPd, ya que al cortarla la estimulación ya no induce actividad refleja en ninguna región del CEEU. El hecho de que cuando se estimula el divertículo uretral (> a 20 mm) se sigue observando actividad EMG sugiere que esta estructura está inervada también por la RVSCNP. Entonces, las aferencias de la uretra prostática, la membranosa y el divertículo uretral viajan por la RSNPd y por la RVSCNPv, ya que existe actividad refleja aun cuando se elimina una de las dos vías, siendo la RSNPd la que inerva la mayor parte de la uretra.

El hecho de que la actividad EMG de la región caudal haya aumentado cuando se cortó la RVSCNPv sugiere que la información sensorial de los axones que viajan por la RVSCNPv y que pueden inervar a otras estructuras urogenitales tales como la vejiga, son inhibitorias para algunas unidades motoras del CEEU. En la Figura 38 se muestra el circuito nervioso que proponemos controla el reflejo uretro-CEEU.

La inervación autonómica de la uretra es provista por el GPM (Steers y de Groat, 1988; Steers y cols., 1988; Gabella, 1995).

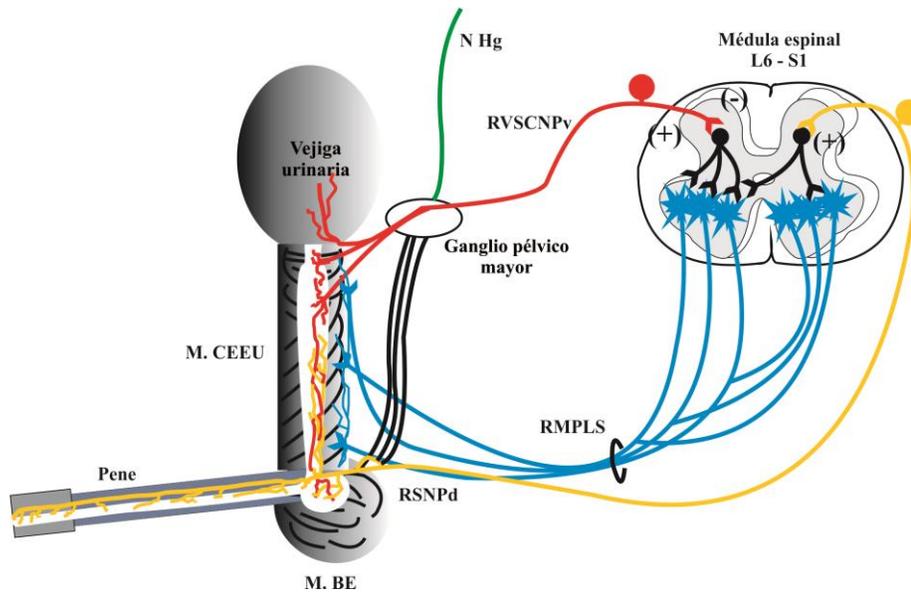


Figura 38. Componentes del circuito nervioso del reflejo uretro-CEEU de la rata macho. Se muestran en amarillo las vías aferentes que viajan por la Rama sensorial del nervio pudendo (RSNPd) y en rojo las que van por la Rama viscerocutánea del nervio pélvico (RVSCNPv) y su integración a la médula espinal lumbosacra.

Conclusiones

- Las regiones craneal, medial y caudal del músculo CEEU se activan de forma diferencial en respuesta a la estimulación mecánica de estructuras perigenitales.
- Los receptores sensoriales que activan reflejamente al CEEU se localizan en el escroto proximal, el prepucio, el glande y la uretra.
- Los axones de las motoneuronas que controlan al CEEU viajan por la rama motora del plexo sacro, la inervación es mayoritariamente ipsilateral.
- Las vías aferentes del reflejo Uretro-CEEU son la rama sensorial del nervio pudendo y la rama viscerocutánea del nervio pélvico.
- La RSNPd inerva la mayor parte de la uretra.
- Las aferencias uretrales proyectan al segmento L6 de la médula espinal.

Referencias

- Allard, J., Truitt, W.A., McKenna, K.E., Coolen, L.M., 2005. Spinal cord control of ejaculation. *World J Urol.* 23, 119-26.
- Andersson, K.E., Wagner, G., 1995. Physiology of penile erection. *Physiol Rev.* 75, 191-236.
- Beckel, J.M., Holstege, G., 2011. Neurophysiology of the lower urinary tract. *Handb Exp Pharmacol.* 149-69.
- Benson, G.S., 1981. Mechanisms of penile erection. *Invest Urol.* 19, 65-9.
- Bierinx, A.S., Sebillé, A., 2006. The urethral striated sphincter in adult male rat. *Anat Embryol (Berl).* 211, 435-441.
- Coolen, L.M., Allard, J., Truitt, W.A., McKenna, K.E., 2004. Central regulation of ejaculation. *Physiol Behav.* 83, 203-15.
- 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.
- Dail, W.G., Trujillo, D., de la Rosa, D., Walton, G., 1989. Autonomic innervation of reproductive organs: analysis of the neurons whose axons project in the main penile nerve in the pelvic plexus of the rat. *Anat Rec.* 224, 94-101.
- de Groat, W.C., Fraser, M.O., Yoshiyama, M., Smerin, S., Tai, C., Chancellor, M.B., Yoshimura, N., Roppolo, J.R., 2001. Neural control of the urethra. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 35-43; discussion 106-25.
- de Groat, W.C., 2006. Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective. *Br J Pharmacol.* 147 Suppl 2, S25-40.
- Ertekin, C., Reel, F., 1976. Bulbocavernosus reflex in normal men and in patients with neurogenic bladder and/or impotence. *J Neurol Sci.* 28, 1-15.
- Fowler, C.J., Griffiths, D., de Groat, W.C., 2008. The neural control of micturition. *Nat.Rev.Neurosci.* 9, 453-466.
- Gabella, G., 1995. Autonomic nervous system. En: *The rat nervous system.* Paxinos G (eds.) Academic Press. Australia. pp. 81-103.
- Guyton, A., Hall, J., 2000. The nervous system. En: *The textbook of medical physiology.* Schmitt W (ed) 10 edición. Editorial W.B. Saunders EUA. pp. 512-562.
- Giuliano, F., Clement, P., 2005. Neuroanatomy and physiology of ejaculation. *Annu Rev Sex Res.* 16, 190-216.
- Hart, B.L., 1968. Sexual reflexes and mating behavior in the male rat. *J Comp Physiol Psychol.* 65, 453-60.
- Hart, B.L., 1972. The action of extrinsic penile muscles during copulation in the male dog. *Anat Rec.* 173, 1-5.
- Hart, B.L., Melese-D'Hospital, P.Y., 1983. Penile mechanisms and the role of the striated penile muscles in penile reflexes. *Physiol Behav.* 31, 807-13.
- Hebel, R., Stromberg, M., 1986. Anatomy and Embriology of the rat. Editorial BioMed. Verlag. Alemania. pp. 65-69.
- Holmes, G.M., Chapple, W.D., Leipheimer, R.E., Sachs, B.D., 1991. Electromyographic analysis of male rat perineal muscles during copulation and reflexive erections. *Physiol Behav.* 49, 1235-46.

- Jannini, E.A., Lenzi, A., 2005. Ejaculatory disorders: epidemiology and current approaches to definition, classification and subtyping. *World J Urol.* 23, 68-75.
- Juarez, M., Hernandez, I., Cruz, Y., 2012. Genitourinary dysfunction in male rats after bilateral neurectomy of the motor branch of the sacral plexus. *Neurourol Urodyn.*
- Juárez, R., 2010. Características anatómicas del esfínter externo de la uretra de la rata macho. Tesis de Licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Juárez, R., 2012. Contribución de los músculos isquiocavernoso y bulboesponjoso en la micción de la rata macho. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Juarez, R., Cruz, Y., 2014. Urinary and ejaculatory dysfunction induced by denervation of specific striated muscles anatomically related to the urethra in male rats. *Neurourol Urodyn.* 33, 437-42.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., Siegelbaum, S.A., Hudspeth, A.J., 2013. The somatosensory system. En: *Principles of neural science.* Mark S (ed) 5th edición. Editorial Mc Graw Hill, EUA. pp. 475-498.
- Lehtoranta, M., Streng, T., Yarkin, E., Paranko, J., Kolts, I., Talo, A., Santti, R., 2006. Division of the male rat rhabdosphincter into structurally and functionally differentiated parts. *Anat.Rec.A Discov.Mol.Cell Evol.Biol.* 288, 536-542.
- Martínez, A., 2003. Caracterización anatómica y funcional de la uretra y de su esfínter externo de la rata macho. Tesis de Doctorado en Neuroetología. Universidad Veracruzana.
- McKenna, K.E., Nadelhaft, I., 1986. The organization of the pudendal nerve in the male and female rat. *J.Comp Neurol.* 248, 532-549.
- McKenna, K.E., Chung, S.K., McVary, K.T., 1991. A model for the study of sexual function in anesthetized male and female rats. *Am J Physiol.* 261, R1276-85.
- McKenna, K.E., 1999. Ejaculation. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *Encyclopedia of Reproduction*, vol. 1. Academic Press, London, pp. 1002–1008.
- McMahon, C.G., Abdo, C., Incrocci, L., Perelman, M., Rowland, D., Waldinger, M., Xin, Z.C., 2004. Disorders of orgasm and ejaculation in men. *J Sex Med.* 1, 58-65.
- Mostwin, J.L., 2001. Clinical Physiology of micturition. En: *Textbook of Female Urology and Urogynaecology.* Cardozo L y Staskin D (eds). Editorial ISIS Medical. pp. 126-138.
- Pacheco, P., Camacho, M.A., Garcia, L.I., Hernandez, M.E., Carrillo, P., Manzo, J., 1997. Electrophysiological evidence for the nomenclature of the pudendal nerve and sacral plexus in the male rat. *Brain Res.* 763, 202-208.
- Pacheco, P., Martínez, A., Hernández, M.E., Manzo, J., 2002. Anatomy and histology of the external urethral sphincter of the male rat. *Society for Neuroscience.* Washington, DC. Abstract. 667.22.
- Pacheco, P., Martínez, A., Alvarado, M., Hernández, M.E., Manzo, J., 2003. Innervation of the striated muscular complex at the external urethral sphincter in the rat. *Society for Neuroscience.* Washington, DC. Abstract. 392.27.
- Pastelin, C.F., Zempoalteca, R., Pacheco, P., Downie, J.W., Cruz, Y., 2008. Sensory and somatomotor components of the "sensory branch" of the pudendal nerve in the male rat. *Brain Res.* 1222, 149-155.

- Pastelin, C.F., Pacheco, P., Camacho, M., Cruz, Y., 2011. Another component of the pelvic plexus that innervates the penis in the rat. *Urology*. 78, 232 e7-13.
- Sachs, B.D., 1982. Role of striated penile muscles in penile reflexes, copulation, and induction of pregnancy in the rat. *J Reprod Fertil*. 66, 433-43.
- Schroder, H.D., 1980. Organization of the motoneurons innervating the pelvic muscles of the male rat. *J.Comp Neurol*. 192, 567-587.
- Steers, W.D., de Groat, W.C., 1988. Effect of bladder outlet obstruction on micturition reflex pathways in the rat. *J.Urol*. 140, 864-871.
- Steers, W.D., Mallory, B., de Groat, W.C., 1988. Electrophysiological study of neural activity in penile nerve of the rat. *Am.J.Physiol*. 254, R989-1000.
- Sugaya, K., Nishijima, S., Miyazato, M., Ogawa, Y., 2005. Central nervous control of micturition and urine storage. *J Smooth Muscle Res*. 41, 117-32.
- Tórtora, G.J., Grabowski, S.R., 2000. Sistema urinario. En: *Principios de Anatomía y Fisiología*. Tórtora, G.J., Grabowski, S.R., (eds) 9na edición. Editorial Oxford México DF. pp. 954-958.
- Watanabe, H., Yamamoto, T.Y., 1979. Autonomic innervation of the muscles in the wall of the bladder and proximal urethra of male rats. *J Anat*. 128, 873-86.
- Wester, C., FitzGerald, M.P., Brubaker, L., Welgoss, J., Benson, J.T., 2003. Validation of the clinical bulbocavernosus reflex. *Neurourol Urodyn*. 22, 589-91; discussion 591-2.
- Wolters, J.P., Hellstrom, W.J., 2006. Current concepts in ejaculatory dysfunction. *Rev Urol*. 8 Suppl 4, S18-25.

Anexos

Constancias de seminarios

Artículo publicado



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



Otorga la presente

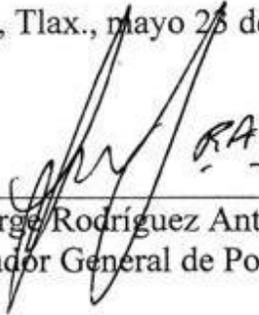
CONSTANCIA

A Raúl Juárez Mendieta
Estudiante Doctorado en Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Tlaxcala

Por impartir el seminario

"Musculatura estriada del aparato urogenital de la rata macho: actividad refleja e inervación"

Tlaxcala, Tlax., mayo 23 de 2014



Dr. Jorge Rodríguez Antolín
Coordinador General de Posgrado



Otorga la presente

CONSTANCIA

A Raúl Juárez Mendieta
Estudiante del Doctorado en Ciencias Biológicas

Por impartir el seminario

**"Actividad refleja e inervación del complejo esfínter
externo de la uretra de la rata macho"**

Tlaxcala, Tlax., agosto 28 de 2015

Dr. Jorge Rodríguez Antolín
Coordinador General de Posgrado

Activity of the External Urethral Sphincter Evoked by Genital Stimulation in Male Rats

Raúl Juárez,¹ René Zempoalteca,² Pablo Pacheco,³ Rosa Angélica Lucio,² Alfonso Medel,² and Yolanda Cruz^{1,2*}

¹Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México

²Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México

³Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, D.F., México

Aims: To determine whether the external urethral sphincter (EUS) fasciculi of male rats respond to the mechanical stimulation of genital structures and to characterize the pattern of the electromyographic (EMG) activity of the three regions of the EUS: the cranial (CrEUS), the medial (MeEUS) and the caudal (CaEUS). **Methods:** Electromyographic signals were recorded from the CrEUS, MeEUS and CaEUS regions of the male rat's EUS, before, during and after the mechanical stimulation of the urogenital structures. **Results:** The CrEUS, MeEUS and CaEUS regions responded when brushing and squeezing the foreskin and glans as well as to penile and prostatic urethral distension. The CaEUS EMG amplitude ($P < 0.01$) and frequency ($P < 0.05$) were lower in comparison to the CrEUS and MeEUS responses to the mechanical stimulation. In addition, the CaEUS was characterized by a short or no afterdischarge. In contrast, the CrEUS and MeEUS responded by presenting a long discharge after the penile or prostatic urethral distension. **Conclusions:** The activity of the EUS is modulated by both, cutaneous and visceral genitourinary stimuli, with motor units being activated by mechanoreceptors located in the foreskin, glans, bladder, and urethra. The CrEUS, MeEUS and CaEUS have differential EMG patterns, indicating that the EUS consists of three anatomically and functionally different regions. Precise coordination in the muscular activity of these regions may be crucial for the control of male expulsive urethral functions, i.e., during voiding and ejaculation. *NeuroUrol. Urodynam.* © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: ejaculation; micturition; penis; urethra

INTRODUCTION

The external urethral sphincter (EUS) is a layer of the urethra composed of striated musculature. Its basal tonic activity during bladder filling contributes to maintaining urethral closure,¹ and its increased firing frequency and amplitude during high intravesical pressure, a guarding bladder-EUS-reflex response, supports urinary continence throughout effort.²

In rats, the EUS is a sexually dimorphic muscle that is thicker and larger in males than in females,³ therefore, as well as its contribution to the control of urinary function, the EUS might play an important role in sexual function.

In female rats, the mechanical stimulation of the clitoris and vagina evokes EUS reflex activity,⁴ suggesting that during copulation, in addition to the bladder-EUS-reflex, the activation of the genito-EUS-reflex contributes to maintaining urinary continence. However, it has not been documented whether the EUS of male rats responds to stimulation of somatic or visceral genital structures.

In male rats, the EUS extends from the prostatic urethra up to the bulbar urethra.⁵ It is made up of fast-twitch-type fibers organized in fasciculi that surround the prostatic and membranous regions of the urethra.^{6,7} The cranial region of the EUS (CrEUS) contains circular fibers encircling the prostatic urethra and accessory glands ducts; the middle region (MeEUS) presents two symmetrical halves, with circular and oblique-orientated muscle fibers, and the caudal region (CaEUS) includes fibers covering the distal portion of the membranous urethra.^{6,7} The anatomical regionalization of the EUS may have a functional meaning, the fasciculi arrangement may be differentially activated during urethral expulsive functions.

The aims of this study were to determine whether the EUS responds to mechanical stimulation (brushing, squeezing or distension) of genital structures (scrotum, foreskin, glans and urethra) and to characterize the pattern of the electromyographic (EMG) activity of its CrEUS, MeEUS and CaEUS fasciculi.

MATERIALS AND METHODS

Ten adult male Wistar rats, weighing 300–350 g, underwent investigation. The animals were housed in plastic cages and maintained on a 12/12 light/dark cycle with food and water provided ad libitum. The experimental protocol was approved by the Tlaxcala University Committee on Laboratory Animals in accordance to the guidelines of the Mexican Council of Laboratory Animals Care (NOM-062-Z00-1999). The EUS reflex electromyographic activity (EMG) was analyzed in rats anesthetized with an intraperitoneal injection of urethane (ethyl carbamate, 1.2 g/kg, i.p). Additional doses were applied when necessary.

Potential conflicts of interest: Nothing to disclose.

Dr. Kai-Erik Andersson led the peer-review process as the Associate Editor responsible for the paper.

Grant sponsor: CONACYT; Grant numbers: 183446; 328853; NIFR-2014-01-1010/186/2014; C-122/2014-10107163/2014

*Correspondence to: Yolanda Cruz, Ph.D., Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Carretera Tlaxcala-Puebla km 1.5, Tlaxcala, Tlax 90000. E-mail: cruzgomezy@yahoo.com.mx

Received 24 April 2015; Accepted 22 July 2015

Published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com)

DOI 10.1002/ruu.22850

EUS Reflex EMG Activity

The EUS was localized according to previous work.⁸ Briefly, a midline incision was made below the abdominal region, and the urethra was exposed by cutting the pubic symphysis. Using a stereomicroscope, the tips of platinum wires electrodes (0.002 mm in diameter and insulated except for the tip) were inserted on the left side of the EUS to record EMG signals: into the cranial (below the ventral lobe of the prostate), medial (lateral to the ventral tendon of the membranous urethra) and/or caudal regions on the distal portion of the membranous urethra, Fig. 1). The electrodes were connected to a Grass P511 amplifier which was connected to an electrophysiological recording system (Digidata 1440A, Molecular Devices, 10 kHz sampling connected to a computer running AxoScope software) to store and print the action potential. The EMG activity was amplified 20,000-fold and the bandpass filtered at 100 Hz to 3 kHz. Five of the 10 rats had the EMG activity of the CrEUS, MeEUS and/or CaEUS fasciculi recorded in pairs (two at a time), while in the other five rats, the three regions of the EUS were recorded simultaneously.

The EUS EMG activity was triggered by gently brushing (10 sweeps of ~25 g during 3–4 sec) with a cotton bud or squeezing (1 squeeze during 1 sec) the scrotum, foreskin, and glans with forceps (4.8" stainless steel Adson forceps without teeth), or by urethral stimulation with a lubricated polyethylene tube (PE-50, 0.97 mm outer diameter; Warner Instruments, Hamden, CT). The tube was introduced into the 3–5 mm penile or prostatic urethra (passing through the urinary bladder dome) and then withdrawn (Fig. 1). The glans was uncovered cutting the dorsal wall of the foreskin to avoid overlapping the foreskin and glans stimulation. This enabled the glans and foreskin to be stimulated independently.

The activity of the EUS was recorded in each rat before, during, and after the stimulation. Each stimulus was administered at least twice, with an interstimulus interval of 2–3 min. When an afterdischarge or inhibition occurred, the second stimulus was applied 3–5 min after the afterdischarge or inhibition had ceased.

Data Analysis

The EUS EMG responses of the ten rats were all analyzed to determine the percentage of animals with the CrEUS, MeEUS and CaEUS responding to each mechanical stimulation. The duration of the response was also quantified. However, only the five rats with simultaneous recording were used for the inferential statistical analysis shown in Figure 5. This was in order to make the EMG segments of the three regions of the EUS comparable with respect to the same stimulation. To do the analysis, a one-second recording sample before mechanical stimulation (basal), during stimulation and right after stimulation was segmented and archived by using AxoScope (Axon Instruments). Values of each EUS region per animal were averaged and used to calculate the mean and standard error. A two way ANOVA was used to determine significant differences in urinary parameters (Factor A: CrEUS, MeEUS and CaEUS Factor B: basal, stimulation, post-stimulation), with the Holm-Sidak method for pairwise multiple comparison.

RESULTS

Basal activity was characterized by low amplitude tonic activity in the three regions of the EUS (Figs. 1 and 2). Consistent tonic responses (action potential amplitude increased > 30% of basal) were observed when squeezing the foreskin and the

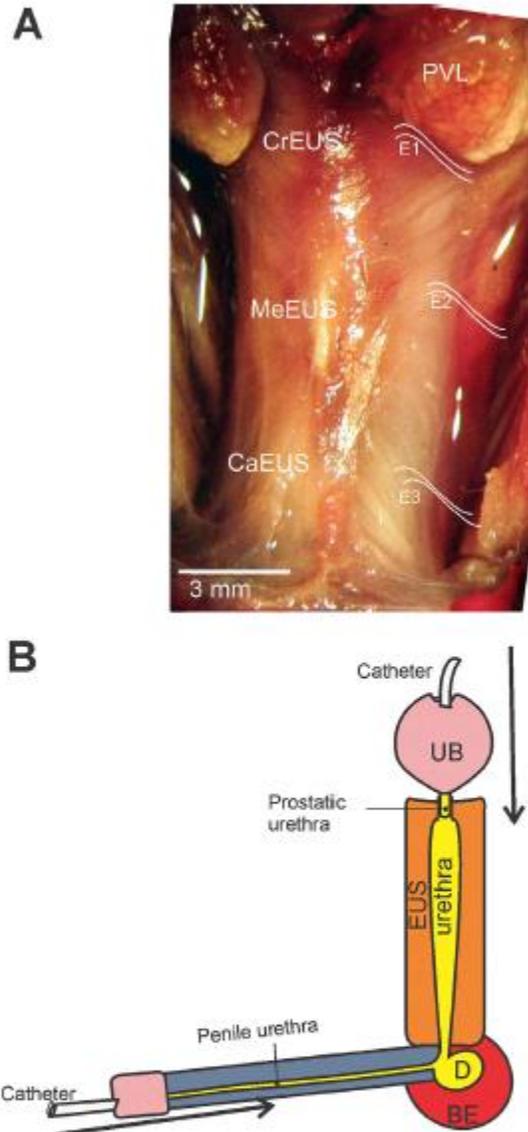


Fig. 1. Photograph of the EUS of a male rat after removing the pelvic bone (A) and the drawing of the urethra (B) indicating sites of stimulation (arrows). A, E1, E2, and E3 indicate the sites where the electrodes were placed for the CrEUS, MeEUS and CaEUS EMGs. The arrows in B indicate the sites where the catheter was introduced for urethral distension. PVL, ventral prostate lobe; UB, urinary bladder.

glans and while stimulating the urethra. Detailed responses are described below.

Scrotum

Brushing did not activate the CrEUS, MeEUS or the CaEUS fasciculi in any rat. Squeezing produced variable effects on the EUS EMG activity: in 40% of the animals (4/10) the EUS did not

respond and in 60% the CrEUS region was activated (EMG amplitude: $78 \pm 11 \mu\text{V}$) when the stimulus was applied to the proximal scrotum.

Foreskin

In 60% of the animals, brushing only activated fibers of the CrEUS (6/10, Fig. 2A). In the other 40%, the stimulation activated the CrEUS, MeEUS and CaEUS, EMG amplitude $98 \pm 46 \mu\text{V}$, $121 \pm 11 \mu\text{V}$, $9 \pm 3 \mu\text{V}$, respectively. Squeezing the foreskin activated the three regions of the EUS in all animals (Fig. 3A) (EMG amplitude: CrEUS = $110 \pm 25 \mu\text{V}$, MeEUS = $132 \pm 55 \mu\text{V}$, CaEUS = $16 \pm 13 \mu\text{V}$). The EMG activity of the CrEUS started 150–180 ms prior to the MeEUS and CaEUS activities. The EUSMe EMG had an afterdischarge of 12 ± 5 sec.

Glans

In 70% of animals, brushing (especially when was applied to the tip of the glans) activated all EUS regions (EMG amplitude: EUSCr = $81 \pm 35 \mu\text{V}$, EUSMe = $125 \pm 20 \mu\text{V}$, EUSCa = $17 \pm 6 \mu\text{V}$). The EUSMe showed an afterdischarge >5 sec (Fig. 2B). In 100% of rats, squeezing the glans also induced EMG activity in all regions of the EUS (amplitude: $126 \pm 42 \mu\text{V}$ for the CrEUS, $140 \pm 29 \mu\text{V}$ for the MeEUS and $24 \pm 4 \mu\text{V}$ for the CaEUS). In all cases, the EMG activity of the CrEUS started approximately 400 ms later than the discharge of the MeEUS or CaEUS (Fig. 3B).

Penile Urethra

Stimulation of the distal penile urethra induced, in all animals, EMG activity of the CrEUS, MeEUS and CaEUS regions, with an amplitude of $146 \pm 58 \mu\text{V}$, $189 \pm 79 \mu\text{V}$, and $40 \pm 18 \mu\text{V}$,

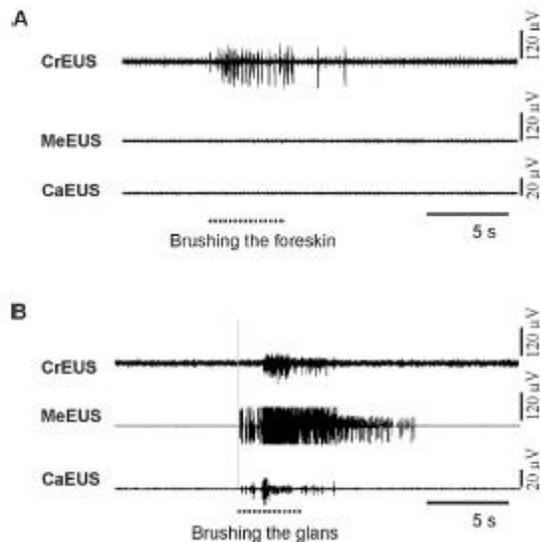


Fig. 2. Example of the electromyographic (EMG) activity of the three regions of the EUS (cranial, CrEUS; medial, MeEUS; caudal, CaEUS) recorded simultaneously during mechanical stimulation; before, during and after brushing the foreskin (A) or the glans (B) with a cotton bud. The horizontal broken line below each EMG recording indicates the duration of the stimulus.

Neurology and Urodynamics DOI 10.1002/nau

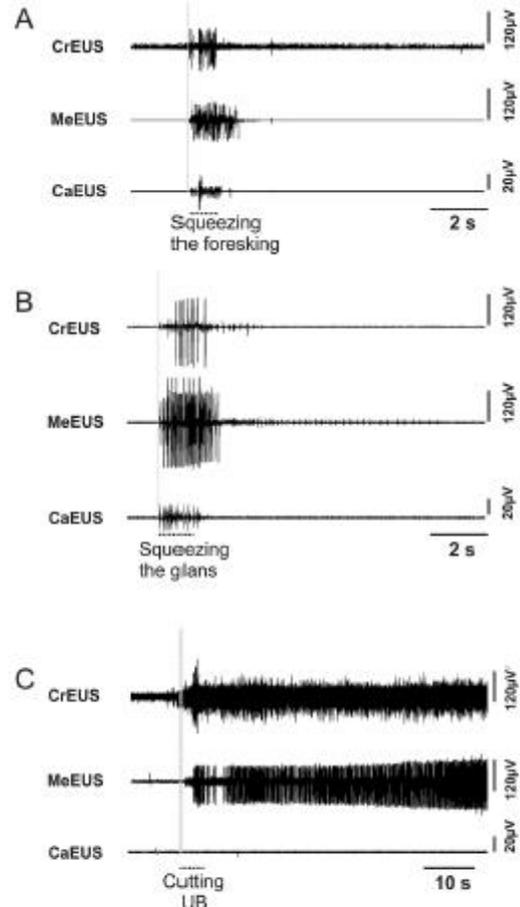


Fig. 3. Example of the electromyographic (EMG) activity of the three regions of the EUS (cranial, CrEUS; medial, MeEUS; caudal, CaEUS) recorded simultaneously during mechanical stimulation; before, during and after squeezing the foreskin (A) or the glans (B), or when the urinary bladder was cut (C). Note in C the long afterdischarge. The horizontal broken line below each EMG recording indicates the duration of the stimulus.

respectively (Fig. 4A and B). The CrEUS and MeEUS showed an afterdischarge of 60–108 sec. The EMG response of the three EUS regions appeared synchronized (Fig. 4A and B).

Prostatic Urethra

When the bladder dome was cut to introduce the catheter to stimulate the prostatic urethra, the fibers of the CrEUS and MeEUS regions had long discharges (more than 20 min; Fig. 3C). In most cases, the EMG activity did not come back to the basal levels. In 100% of the rats, when the catheter reached the prostatic urethra, the activity of the CrEUS, MeEUS and CaEUS fibers increased, with amplitudes of $172 \pm 43 \mu\text{V}$, $188 \pm 31 \mu\text{V}$ and $38 \pm 11 \mu\text{V}$. The CrEUS and MeEUS fibers had a long afterdischarge (>10 min; Fig. 4C and D).

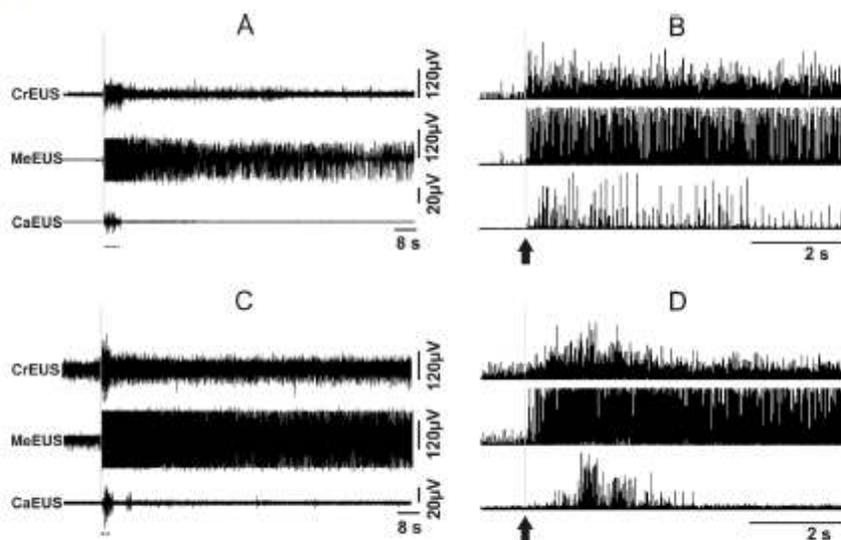


Fig. 4. Example of the electromyographic (EMG) activity of the three regions of the EUS (cranial, CrEUS; medial, MeEUS; caudal, CaEUS) recorded simultaneously during mechanical stimulation; before, during and after distention of the urethra by introducing a catheter into the last 5 mm of the penile urethra (A, B) or 5 mm of the prostatic urethra (C, D). In A and C, the horizontal broken line below each EMG recording indicates the duration of the stimulus. In B and D, arrows indicate the timing when the stimulation began. Note that the CrEUS and MeEUS regions had a long-lasting afterdischarge so that the EMG traces were cut before the muscle returned to the basal levels. B and D show 800 ms of A and C, respectively.

The statistical analysis of the EMG response of the EUS regions to the mechanical stimulation of the glans and urethra indicates that the amplitude and frequency of the EMG activity of the CrEUS and MeEUS fibers were significantly higher than that of the CaEUS (Fig. 5).

DISCUSSION

The EUS of male rats contains circular and oblique-orientated muscle fibers that cover the prostatic and membranous regions of the urethra, respectively.^{5,7} Thus, the EUS is structurally divided into cranial, medial, and caudal regions.⁶

The present study demonstrates that the three regions of the EUS of male rats respond to mechanical stimulation of genital structures, suggesting that this musculature may be reflexively activated during copulation. The cranial region contributes to maintaining urinary continence and the medial and caudal regions support the urinary and seminal expulsive functions.

The high amplitude tonic activity of the CrEUS recorded during mechanical stimulation of the genital structures resembles the EMG activity observed in male rats during cystometry when bladder pressure rises before the voiding period.³ An EUS tonic activity has also been found in female rats in response to clitoral and vaginal stimulation.⁴

During copulation, when mounts and intromissions occur, mechanical stimulation of the foreskin and glans may induce a long-term activation of the CrEUS as well as a short-term response of the MeEUS and CaEUS (this was deduced by the fact that brushing and squeezing did not induce a long afterdischarge). This pattern of activation of the EUS fasciculi could increase the pressure of the rostral region of the urethra to maintain urinary continence but not prevent semen entering into the membranous urethra during seminal emission.

The fact that urethral stimulation induced a long afterdischarge in the CrEUS and MeEUS but not in the CaEUS suggests that urethral pressure may differ along the tract during ejaculation, with lower pressure at the CaEUS region. Differential pressure throughout the urethra may be of high relevance to the facilitation of antegrade semen ejection. After seminal emission, contraction of the circular fibers of the CrEUS may contribute to occluding the bladder neck in order to prevent semen from entering into the bladder. Contraction of the MeEUS may propel semen through the urethral meatus.⁵⁻⁸ Activation of the CaEUS may augment the urethral lumen⁶ and most likely facilitates semen transport through the transitional urethra, a narrowed site between the membranous urethra and the penile diverticle.⁹ Concurrent rhythmic contraction of bulbospongiosus muscles¹⁰ may contribute to expelling semen through the penile urethra.

The pattern of the EUS EMG activity in response to the mechanical stimulation of the external and internal genitalia varied among the EUS regions. This corroborates the view that the EUS of the male rat is a complex muscle⁵, structurally and functionally differentiated into three regions whose differential contraction facilitates the fluid expulsion of semen and urine through a long and curved urethra.⁶ Damage or denervation of the EUS fasciculi impair both urinary and sexual functions inducing signs of urinary incontinence, voiding deficiency, post-micturition dribbling and retrograde ejaculation.⁸

The response of the EUS to mechanical stimulation of the perigenital skin is congruent with previous reports in rats and cats.^{5,11,12} The fact that the EUS responds to mechanical stimulation of the foreskin, glans, urethra, and urinary bladder indicates that sensory receptors located in those structures activate afferent pathways converging onto the EUS motoneurons within the dorsolateral nuclei of the lumbosacral spinal segments.^{1,3,14} Afferent pathways of these somatomotor

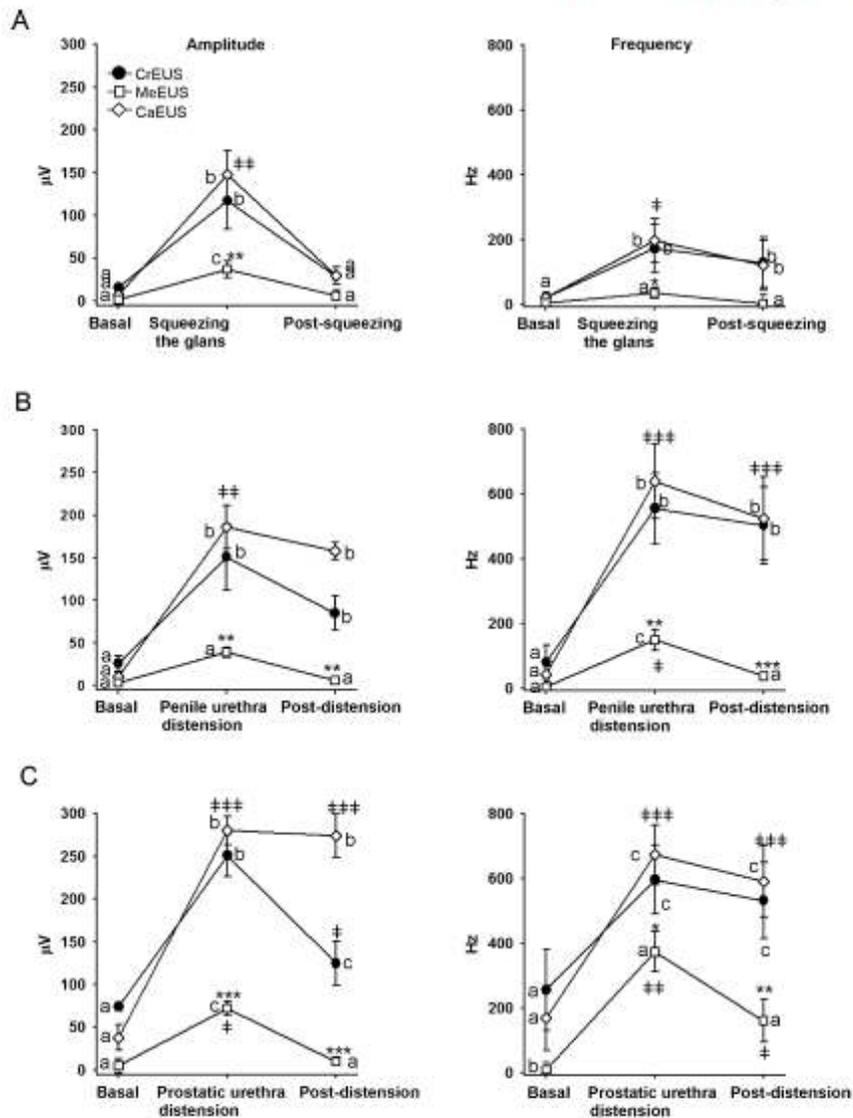


Fig. 5. Graphs of electromyograms, amplitude and firing frequency, of the cranial (CrEUS), medial (MeEUS) and caudal (CaEUS) regions of the external urethral sphincter of male rats. Data of a one second recording sample at three time points - before mechanical stimulation (Basal) during mechanical stimulation (glans squeezing (A), penile urethra distension (B), prostatic urethra distension (C)) and after stimulation - are presented as the mean SEM of five rats. * Indicates statistical differences within group and † between groups. * and P < 0.05; ** and †† P > 0.01, *** and ††† P > 0.001. Different letters indicate statistical differences.

and visceromotor reflexes include the dorsal nerve of the penis, innervating the penis and foreskin,¹⁵ and the pelvic nerve, innervating the urinary bladder¹⁶ and rostral urethra. The efferent axons are carried by the motor branch of the sacral plexus.¹⁷

Brushing and squeezing the external genitalia induced EUS responses of shorter duration than those evoked by bladder or urethral stimulation. Similar results have been reported in female rat studies where the EUS response to clitoral stimulation had a short duration compared to the bladder contraction from vaginal stimulation.¹⁶ This could mean that the afferents

of visceral genitourinary structures have a larger amount of sensory receptors or more excitatory connection to the EUS motoneurons which enable them to recruit more motor units.

During the micturition of human beings and cats, the EUS is relaxed as the bladder contracts.^{18,19} In contrast, rats show concurrent activation of the bladder and the EUS during voiding,^{3,6,20} and the EUS fasciculi contracts tonically during the bladder filling and rhythmically during voiding.^{3,20,21} It has been described that some EUS motor units only discharge during the voiding period of the bladder contraction²² which may suggest some kind of segregation between the tonic and

phasic motor units. The tonic EUS activity seems to be controlled by neural circuitries located at the L6-S1 spinal segments and the bursting activity at the T8, T9, L3, and L4 spinal segments.^{2,3}

In previous studies, urethral distension did induce a bursting contraction of the bulbospongiosus muscles. This spinal-like ejaculatory reflex is called the urethro-genital reflex.^{2,4}

A limitation of this study was that neither the stimulation of the external nor the internal genitalia induced the rhythmic-like ejaculatory reflex activity of the EUS. There is a possibility that the characteristics of the mechanical stimulation applied (rubbing or squeezing the skin or inserting a catheter into a portion of the urethra instead of all of the urethra) did not provide enough stimulation to recruit EUS burst motor units. Other limitations were: 1) the unknown fact that the stimulation of the urethra with the catheter may activate nociceptors, in addition to the mechanoreceptors, which might have influenced the visceromotor reflex response; 2) the retrograde direction of the penile stimulation (from the urinary meatus to the diverticle) may have a negative impact on the EUS fasciculi activity. Despite these limitations, the results strongly indicate that there exists reflex activity of the EUS evoked by genital structures and a differential response of the EUS fasciculi to mechanical stimulation. Recordings of the EUS fasciculi patterns of animals during copulation are pending.

CONCLUSION

In male rats, the EUS fasciculi responds to mechanical stimulation of the genital and urinary structures, with motor units being activated by mechanoreceptors located in the foreskin, glans, urinary bladder, and urethra. The cranial, medial, and caudal regions of the EUS have differential EMG patterns indicating that the EUS consists of three anatomically and functionally different regions. Precise coordination of the three regions of the EUS may be crucial for normal expulsive urethral functions during voiding and ejaculation.

ACKNOWLEDGMENTS

Grant sponsor: CONACyT; 183446 (YCG), 328833 (RJM), NIFR-2014-01-1010/186/2014 (CTBC), C-122/2014-10107163/2014 (PNPC, PCB).

REFERENCES

1. Ashton-Miller JA, Howard D, DeLancey JO. The functional anatomy of the female pelvic floor and stress continence control system. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2001;207:1-7; discussion 106-25.
2. Jiang HH, Salcedo LR, Damaser MS. Quantification of neurological and other contributors to continence in female rats. *Brain Res* 2011;1382:198-205.
3. Cruz Y, Downie JW. Sexually dimorphic micturition in rats: relationship of perineal muscle activity to voiding pattern. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289:R1307.
4. Pastelin CF, Juárez R, Damaser MS, et al. Neural pathways of somatic and visceral reflexes of the external urethral sphincter in female rats. *J Comp Neurol* 2012;520:8120.
5. Pacheco P, Martínez A, Hernández ME, et al. Anatomy and histology of the external urethral sphincter of the male rat. *Neuroscience Meeting Planner*. Orlando, FL: Society for Neurosci; 2002.
6. Ichtoranta M, Streng T, Yarkin E, et al. Division of the male rat mabdosphincter into structurally and functionally differentiated parts. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2006;288:536.
7. Bierinx AS, Sebille A. The urethral striated sphincter in adult male rat. *Anat Embryol (Berl)* 2006;211:435.
8. Juárez R, Cruz Y. Urinary and ejaculatory dysfunction induced by denervation of specific striated muscles anatomically related to the urethra in male rats. *NeuroUrol Urodyn* 2014;33:437.
9. Ciner M, van Voorenbosch CI, Dijkstra G, et al. Penile bulb and its relationship with the pelvic urethra and the penile urethra in the rat. Light and scanning electron microscopical observations. *Anat Rec* 1996;244:452.
10. Holmes GM, Chapple WD, Leftholmer KE, et al. Electromyographic analysis of male rat penile muscles during copulation and reflexive erections. *Physiol Behav* 1991;49:1235.
11. Sasaki M, Morrison JF, Sato Y, et al. Effect of mechanical stimulation of the skin on the external urethral sphincter muscles in anesthetized cats. *Jpn J Physiol* 1994;44:575.
12. Morrison JF, Sato A, Sato Y, et al. The influence of afferent inputs from skin and viscera on the activity of the bladder and the skeletal-muscle surrounding the urethra in the rat. *Neurosci Res* 1995;23:195.
13. McKenna KE, Nadelhaft I. The organization of the pudendal nerve in the male and female rat. *J Comp Neurol* 1986;248:532.
14. Schroder HD. Organization of the motoneurons innervating the pelvic muscles of the male rat. *J Comp Neurol* 1980;192:567.
15. Pastelin CF, Zempoalteca R, Pacheco P, et al. Sensory and somatomotor components of the "sensory branch" of the pudendal nerve in the male rat. *Brain Res* 2008;1222:149.
16. Shea VK, Cai R, Crepps B, et al. Sensory fibers of the pelvic nerve innervating the rat's urinary bladder. *J Neurophysiol* 2000;84:1924.
17. Pacheco P, Camacho MA, García LI, et al. Electrophysiological evidence for the nomenclature of the pudendal nerve and sacral plexus in the male rat. *Brain Res* 1997;763:202.
18. Sackman JE, Sims MH. Electromyographic evaluation of the external urethral sphincter during cystometry in male cats. *Am J Vet Res* 1990;51:1237.
19. Yalla SV, Resnick NM. Initiation of voiding in humans: The nature and temporal relationship of urethral sphincter responses. *J Urol* 1997;157:590.
20. Kruse MN, Bolton AL, de Groat WC. Changes in bladder and external urethral sphincter function after spinal cord injury in the rat. *Am J Physiol* 1993;264:R1157.
21. Conte B, Maggi CA, Parlani M, et al. Simultaneous recording of vesical and urethral pressure in urethane-anesthetized rats: Effect of neuromuscular blocking agents on the activity of the external urethral sphincter. *J Pharmacol Methods* 1991;26:161.
22. D'Amico SC, Collins WF, 3rd. External urethral sphincter motor unit recruitment patterns during micturition in the spinally intact and transected adult rat. *J Neurophysiol* 2012;108:2554.
23. Chang HY, Cheng CI, Chen JJ, et al. Serotonergic drugs and spinal cord transections indicate that different spinal circuits are involved in external urethral sphincter activity in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292:F1044.
24. McKenna KE, Chung SK, McVary KT. A model for the study of sexual function in anesthetized male and female rats. *Am J Physiol* 1991;261:R1276.