

Universidad Autónoma de Tlaxcala



Posgrado en Ciencias Biológicas

Modelo de distensión vaginal en rata: disfunciones
urinarias en animales no anestesiados y tratamiento
con estimulación eléctrica

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

José Luis Palacios Galicia

Directora

Dra. Yolanda Cruz Gómez

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2019



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Modelo de distensión vaginal en rata: disfunciones
urinarias en animales no anestesiados y tratamiento
con estimulación eléctrica

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

José Luis Palacios Galicia

Comité tutorial

Dra. Yolanda Cruz Gómez
Dra. Estela Cuevas Romero
Dr. Álvaro Muñoz Toscano

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

El proyecto fue desarrollado dentro del programa de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, el cual está registrado en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

Su financiamiento fue otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Proyecto: YCG 183446; Beca: JLPG 488223).

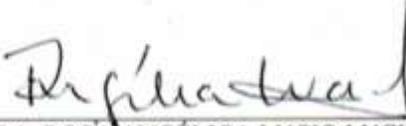


COORDINACIÓN DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
PRESENTE

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **José Luis Palacios Galicia** 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 **“Modelo de distensión vaginal en rata: disfunciones urinarias en animales no anestesiados y tratamiento con estimulación eléctrica”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., FEBRERO 20 DE 2019



DRA. ROSA ANGÉLICA LUCIO LUCIO



DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO



DRA. CAROLINA MORÁN RAYA



DR. ÁLVARO MUÑOZ TOSCANO



DRA. MARGARITA JUÁREZ ROMERO



Agradecimientos

- Al posgrado del CTBC, UAT, por la oportunidad de realizar el Doctorado en Ciencias Biológicas.
- Al CONACyT por la beca de estudio otorgada (JLPG 488223).
- A mi directora de tesis la Doctora Yolanda Cruz Gómez por su gran apoyo y comprensión durante mi estancia en el Doctorado.
- A los miembros del comité tutorial: Doctor Álvaro Muñoz Toscano y Doctora Estela Cuevas Romero, por sus oportunas observaciones y consejos durante los tutorales y en el mejoramiento de este proyecto.
- A los demás integrantes del Laboratorio de Neurofisiología: Dra. Margarita Juárez Romero, Ricardo Juárez Mirto, Nancy Mirto Aguilar, Jorge Arellano Hernández, Karla Zamora Sánchez, Yarely Victoria Grande Fernández, Aarón Pérez Gutiérrez, Rebeca Varela Arzate, Luis Fernando Zetina Gómez y Blanca Batana Reyes por su apoyo, comentarios y sugerencias.
- A todos los profesores y compañeros del Doctorado en Ciencias Biológicas por sus enseñanzas dentro y fuera del aula.
- A los directivos, amigos y personal que labora en el CTBC por su valiosa amistad.

Dedicatoria

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

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

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

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

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

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

Resumen

El parto vaginal está relacionado con la aparición de patologías urinarias, de las que se desconocen sus mecanismos fisiopatológicos. Para conocer el daño causado por el parto sobre el aparato urogenital (AUG) y su inervación, se ha desarrollado el modelo de distensión vaginal (DV) en ratas. El objetivo general del presente estudio fue determinar en ratas anestesiadas el efecto de la DV sobre el AUG y su inervación, y en ratas no anestesiadas, el efecto de la DV sobre las características de la conducta de micción y la actividad refleja del esfínter externo de la uretra (EEU), así como el efecto de la estimulación eléctrica transcutánea (EET) del nervio dorsal del clítoris (NDC) sobre la recuperación funcional del tracto urinario inferior en ratas con DV. Los objetivos específicos fueron: 1) Determinar el efecto de la DV sobre el AUG y su inervación de la rata, 2) Determinar si la DV induce signos conductuales de disfunciones urinarias y lesión nerviosa a corto plazo, 3) Establecer si la DV modifica los parámetros urinarios a corto y mediano plazo, 4) Precisar el tiempo de recuperación post-DV de la función urinaria en ratas conscientes y la actividad eléctrica del NDC y de los reflejos del EEU (clitoro-EEU y vesico-EEU) en ratas anestesiadas, y 5) Comprobar si la estimulación transcutánea del NDC facilita la recuperación funcional del tracto urinario inferior en ratas con DV. Para ello, empleamos ratas hembra adultas nulíparas de la cepa Wistar (250 - 300 g), las cuales fueron asignadas para someterse a 4 h de DV o procedimiento sham de DV (SH DV). En los animales con DV, se insertó un catéter Foley del número 10 en la vagina por un periodo de 4 h, inflado con 4 ml de agua. En los animales SH DV el catéter fue insertado en la vagina, pero no fue inflado. Los animales con DV o SH DV fueron asignados aleatoriamente a tres experimentos. En el experimento 1, se determinaron los cambios estructurales y funcionales del tracto urinario inferior en animales anestesiados inmediato a la DV, mediante estudios de anatomía gruesa del AUG y su inervación, electrofisiología del NDC e histología de la vejiga urinaria y ganglio pélvico mayor (GPM). En el experimento 2, se determinó el efecto de la DV sobre la conducta de micción y la actividad del EEU mediante técnicas conductuales y electrofisiológicas. En el experimento 3, se determinó el efecto de la EET del NDC sobre la conducta de micción y parámetros urinarios en animales con DV. Se encontró que la DV incrementó significativamente el ancho de la vagina distal, la longitud de la rama motora del plexo lumbosacro, del NDC y de los nervios vesicales ($p < 0.05$), y disminuyó la amplitud y frecuencia de la actividad eléctrica

del NDC ($p < 0.05$). La DV ocluyó a la uretra e indujo retención urinaria, hematomas y disminuyó significativamente el grosor del epitelio y del músculo liso de la vejiga urinaria, en comparación con los animales SH DV ($p < 0.05$). La DV no modificó significativamente el área del GPM ni de sus neuronas ($p > 0.05$). En el día 3 post-DV, el 100% de los animales presentaron goteo de orina asociado a conductas que implicaron esfuerzo como erguirse en dos patas para alcanzar el alimento, y durante el estornudo y el rascado. En ese mismo lapso, la frecuencia de expulsiones de orina disminuyó, y el intervalo y la duración de las expulsiones incrementó significativamente vs los animales SH DV ($p < 0.01$). El goteo de orina desapareció en el día 13 post-DV en la fase de oscuridad y en el día 11 post-DV en la fase de luz. En los animales SH DV no se presentó goteo ni hubo diferencias significativas en los parámetros urinarios en ningún día de registro ($p > 0.05$). La amplitud de la actividad del NDC se recuperó en alrededor de un 90% en el día 3 post-DV. El EEU respondió consistentemente a la estimulación de la vaina clitoral (amplitud, $54.2 \pm 6 \mu\text{V}$; frecuencia, $255 \pm 25 \text{ Hz}$) y a la vejiga urinaria (amplitud, $87.4 \pm 11 \mu\text{V}$; frecuencia, $344 \pm 50 \text{ Hz}$) en los animales SH DV. La respuesta del EEU en los animales SH DV no varió a lo largo de los días ($p > 0.05$) y su amplitud fue considerada como 100 % y fue comparada con la amplitud de los animales con DV. La actividad refleja del EEU y su actividad fásica durante los cistometrogramas fueron abolidos inmediatamente y en el día 3 post-DV. La actividad refleja se recuperó en ~26% en el día 6 post-DV durante la estimulación de la vaina clitoral y en ~16% durante la estimulación vesical y al 100% en el día 12 post-DV. La DV abolió las oscilaciones de alta frecuencia durante la expulsión de orina en los cistometrogramas y disminuyó significativamente la eficiencia vesical ($p < 0.05$) en los primeros 6 días post-DV. El número de gotas disminuyó significativamente en el grupo DV con EET en comparación con los grupos DV y DV con SH EET en el día 5 post-DV ($p < 0.01$). Se concluye que la DV lesiona la estructura e inervación del AUG a corto plazo, induce signos conductuales de incontinencia urinaria de esfuerzo y abole temporalmente la actividad EMG del EEU. El sistema neuromuscular del EEU y la continencia urinaria se recuperan gradualmente a partir de la primera semana post-DV. La estimulación transcutánea del nervio dorsal del clítoris facilita la recuperación de la continencia urinaria en ratas con DV. Los resultados del presente estudio nos ayudarán a conocer más sobre los mecanismos de la incontinencia urinaria postparto y a diseñar nuevas terapias no invasivas para el tratamiento de esta patología.

ÍNDICE

	Pág.
1. Introducción.....	1
1.1 Aparato urogenital femenino (AUG).....	1
1.1.1 Anatomía del tracto urinario inferior.....	2
1.1.1.1 Vejiga urinaria.....	2
1.1.1.2 Uretra.....	4
1.1.2 Control nervioso del tracto urinario inferior.....	7
1.2 Piso pélvico femenino.....	9
1.3 Patologías urinarias.....	10
2. Antecedentes.....	12
3. Justificación.....	23
4. Hipótesis.....	25
5. Objetivos.....	25
5.1 Objetivo general.....	25
5.2. Objetivos particulares.....	25
6. Animales.....	26
6.1 Diseño experimental.....	26
7. Experimento 1. Cambios estructurales y funcionales del tracto urinario inferior en animales anestesiados con DV.....	27
7.1 Métodos del experimento 1.....	27
7.2 Resultados del experimento 1.....	33
7.3 Discusión del experimento 1.....	39
7.4 Conclusiones del experimento 1.....	42
8. Experimento 2. Efecto de la DV sobre la conducta de micción y la actividad del EEU.....	43
8.1 Métodos del experimento 2.....	43
8.2 Resultados del experimento 2.....	51

8.3	Discusión del experimento 2.....	69
8.4	Conclusiones del experimento 2.....	73
9.	Experimento 3. Estimulación eléctrica transcutánea del nervio dorsal del clítoris...74	
9.1	Métodos del experimento 3.....	74
9.2	Resultados del experimento 3.....	76
9.3	Discusión del experimento 3.....	80
9.4	Conclusiones del experimento 3.....	81
10.	Conclusión general.....	82
11.	Perspectivas.....	82
12.	Referencias.....	83
13.	Publicaciones.....	89
14.	Congresos y reconocimientos.....	97

ABREVIATURAS

AUG	Aparato urogenital
ACV	Amplitud de la contracción vesical
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CMG	Cistometrograma
CV	Capacidad vesical
DCV	Duración de la contracción vesical
DV	Distensión vaginal
EET	Estimulación eléctrica transcutánea
EEU	Esfínter externo de la uretra
EMG	Electromiograma
ENG	Electroneurograma
EV	Eficiencia vesical
GPM	Ganglio pélvico mayor
Hz	Hertz
HFO	Oscilaciones de alta frecuencia
IIC	Intervalo intercontráctil
μ V	Microvoltio
mA	Microamperio
min	Minuto
ml	Mililitro
ms	Milisegundo
NDC	Nervio dorsal del clítoris
OR	Orina residual
PU	Presión umbral
RMPLS	Rama motora del plexo lumbosacro
RSNP	Rama sensorial del nervio pudendo
s	Segundo
SH DV	Cirugía testigo de distensión vaginal
SH EET	Estimulación testigo de estimulación eléctrica transcutánea
TE	Tiempo de expulsión de orina
VE	Volumen por expulsión de orina

1. Introducción

1.1 Aparato urogenital femenino (AUG)

El AUG femenino participa en procesos urinarios, reproductivos y sexuales. Está formado por la vejiga urinaria, la uretra, el útero, el cérvix y la vagina, órganos en estrecha relación anatómica que se alojan en la cavidad pélvica (Figura 1; Bekker y cols. 2012). Los dos primeros componentes forman al tracto urinario inferior.

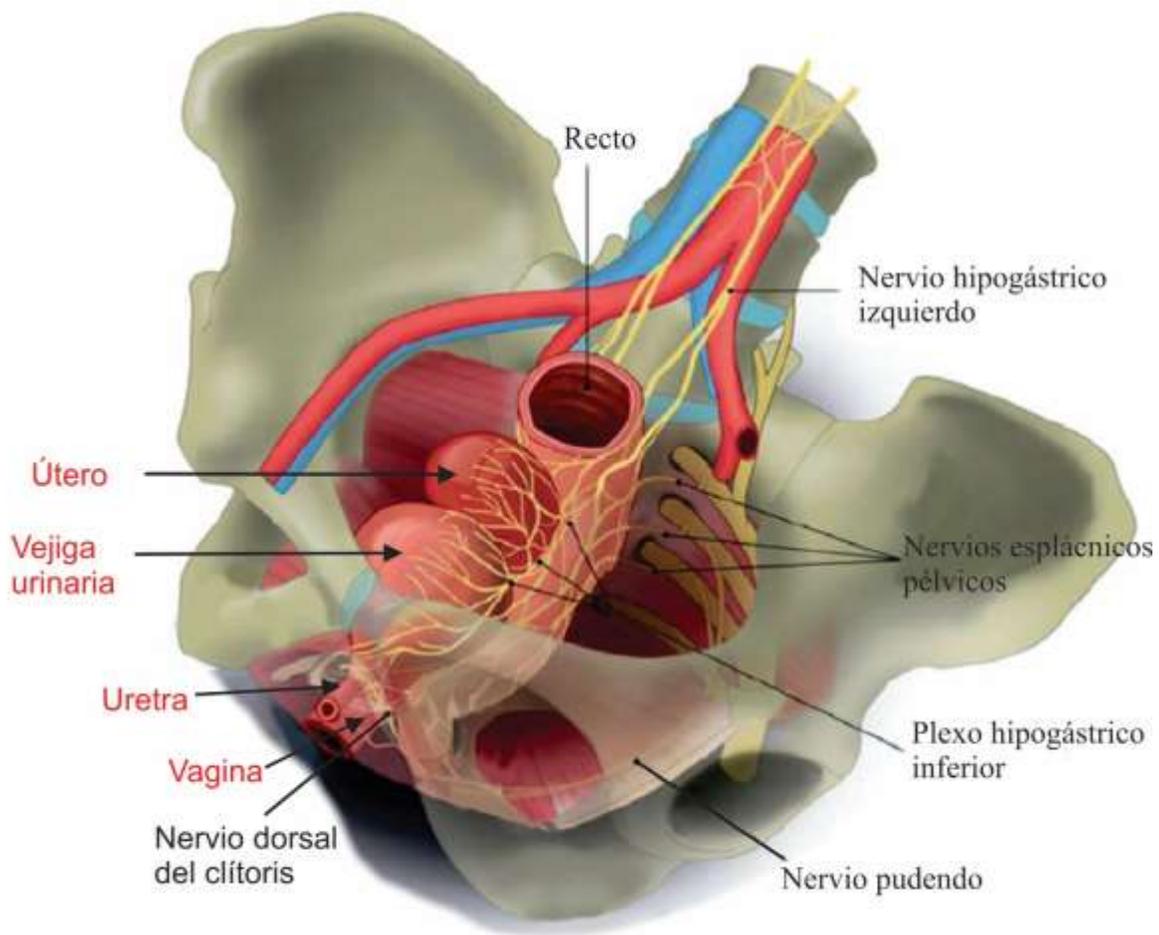


Figura 1. Esquema del AUG femenino y su inervación en una vista latero-frontal. Modificado de Bekker y cols. 2012.

1.1.1 Anatomía del tracto urinario inferior

El tracto urinario inferior consta de dos estructuras funcionales: la vejiga urinaria, un depósito para contener y expulsar la orina, y la uretra, un conducto de salida para liberar la orina hacia el exterior del cuerpo.

1.1.1.1 Vejiga urinaria

La vejiga urinaria es un órgano sacular musculoelástico. Está situada en la porción inferior del abdomen, craneal al hueso pélvico y ventral al cuerpo uterino y al cérvix (Hebel y Stromberg 1986). Se le pueden distinguir varios componentes, entre ellos el domo (ápice) en la parte superior, el cuerpo en la parte media (fundus) y el cuello (trígono) en la transición con la uretra (Olivetti y Grazioli 2009).

De su parte más interna a la más externa se encuentran diferentes componentes celulares: el urotelio, la lámina propia, el músculo detrusor y la capa adventicia.

El urotelio es una capa de epitelio transicional formado de tres subcapas: una compuesta de células hexagonales largas conocidas como células “sombrija” que contienen pequeñas microvellosidades de glucosaminoglucanos, una de células intermedias y otra de células basales. Este conjunto de elementos forma una barrera casi impermeable, lo que permite que la vejiga urinaria pueda almacenar la orina. Las células del urotelio tienen la capacidad de sensar los cambios de su ambiente extracelular y responden a estímulos químicos, mecánicos y térmicos liberando sustancias como ATP, óxido nítrico y acetilcolina (Birder y Andersson 2013).

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

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

La capa adventicia está compuesta de tejido conectivo (Figura 2).

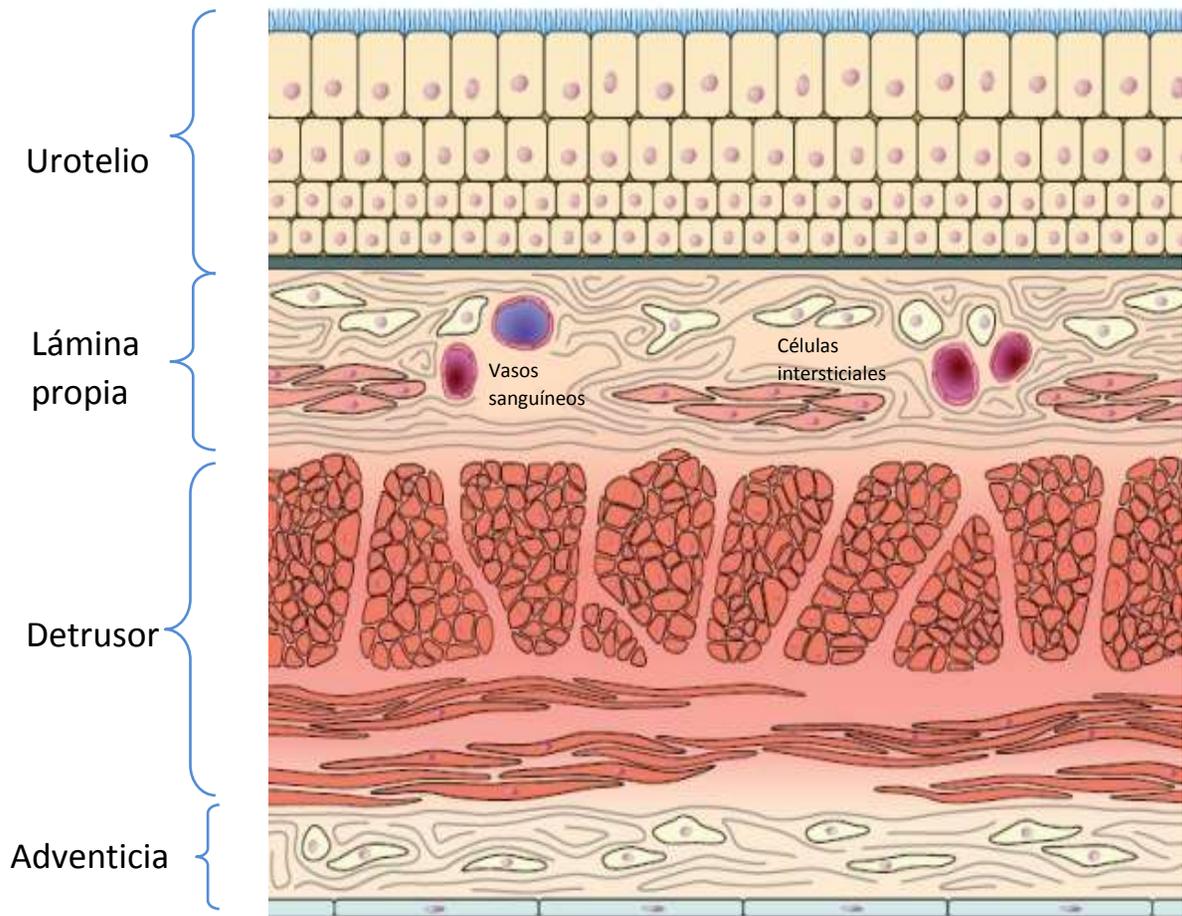


Figura 2. Esquema que muestra los componentes de la pared vesical. Modificado de Birder y Andersson 2013.

1.1.1.2 Uretra

La uretra es un órgano tubular por el que pasa la orina desde la vejiga urinaria hacia el exterior del cuerpo. En la rata, la uretra tiene una longitud de 20.36 ± 0.64 mm y se ha dividido en 5 segmentos: pre-pélvica, pélvica, bulbar y clitoral (Mirto y cols. 2019).

La región pre-pélvica (1.6 ± 0.37 mm) se encuentra rostral al hueso pélvico, la pélvica (5.3 ± 0.35 mm) se encuentra dorsal a la sínfisis púbica, la bulbar (5.9 ± 0.17 mm) empieza del arco isquiático y termina antes del clítoris, y la clitoral que inicia al nivel del clítoris y termina en el meato urinario (Figura 3).

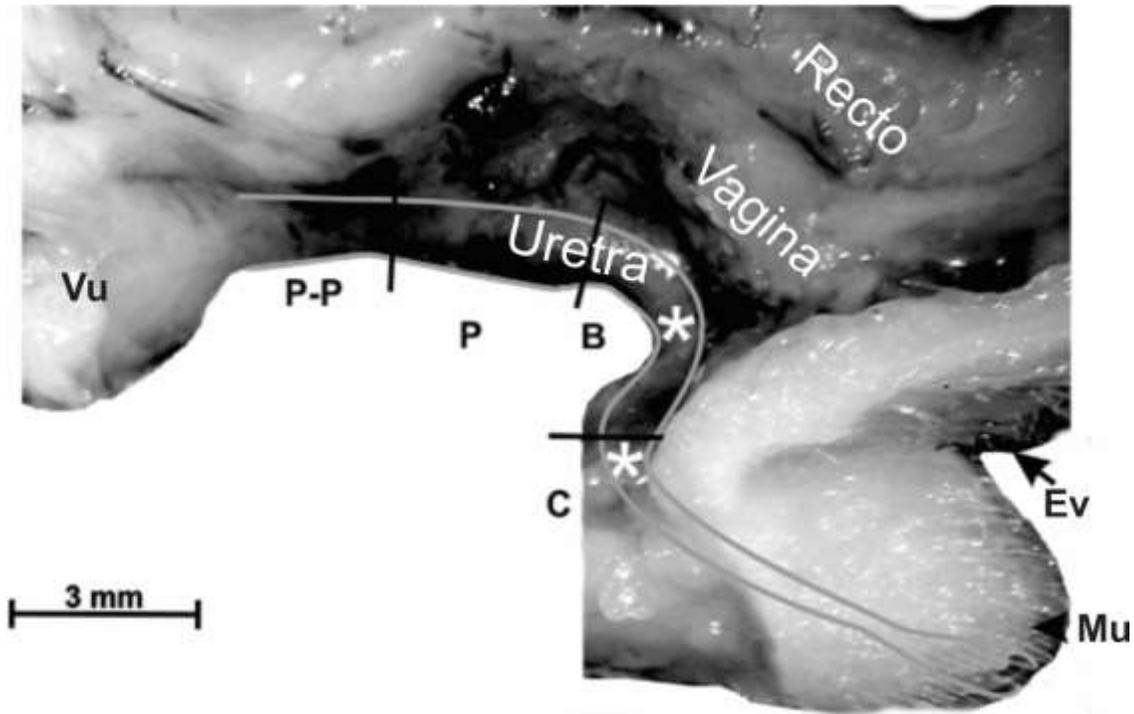


Figura 3. Anatomía gruesa del aparato urogenital de la rata hembra. Se observa la topografía de la uretra y sus dos curvaturas marcadas en asterisco. Regiones de la uretra: P-P, región pre-pélvica; P, región pélvica; B, región bulbar; C, región clitoral. Vu, vejiga urinaria. Ev, entrada vaginal. Mu, meato urinario. Modificado de Mirto y cols. 2019.

Histológicamente se pueden observar diferentes capas uretrales (Figura 4). De la luz hacia la periferia, se encuentran el tejido epitelial (urotelio uretral) y conectivo (submucosa) que se distribuyen a lo largo de todas las regiones de la uretra. Le continúan, el tejido muscular liso (longitudinal y circular) y estriado, el esfínter externo de la uretra (EEU), que se distribuyen en todos las regiones de la uretra, a excepción de la clitoral (Figura 4; Mirto y cols. 2019).

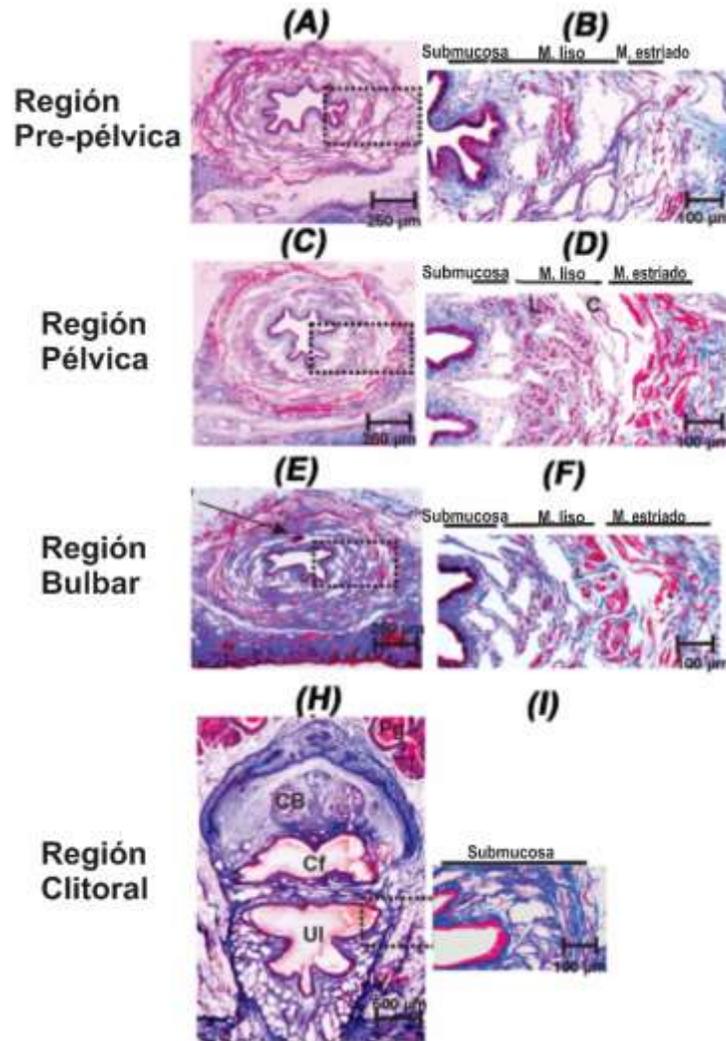


Figura 4. Histología de la uretra de la rata hembra teñida con Tricrómica de Masson. Se muestran las cuatro regiones de la uretra y sus tipos de tejidos que los conforman. B, D, F e I son magnificaciones de A, C, E y H, respectivamente. Modificado de Mirto y cols. 2019.

El EEU está formado por fibras que corren en diferentes direcciones. Así por ejemplo, la región pre-pélvica contiene fibras musculares estriadas circulares, la región pélvica contiene fibras estriadas circulares, diagonales y longitudinales. Las fibras diagonales forman un cincho, ya que estas se insertan en el tejido conectivo de la pared ventral de la vagina. Finalmente, la región bulbar contiene fibras circulares escasas (Figura 5; Mirto y cols. 2019).

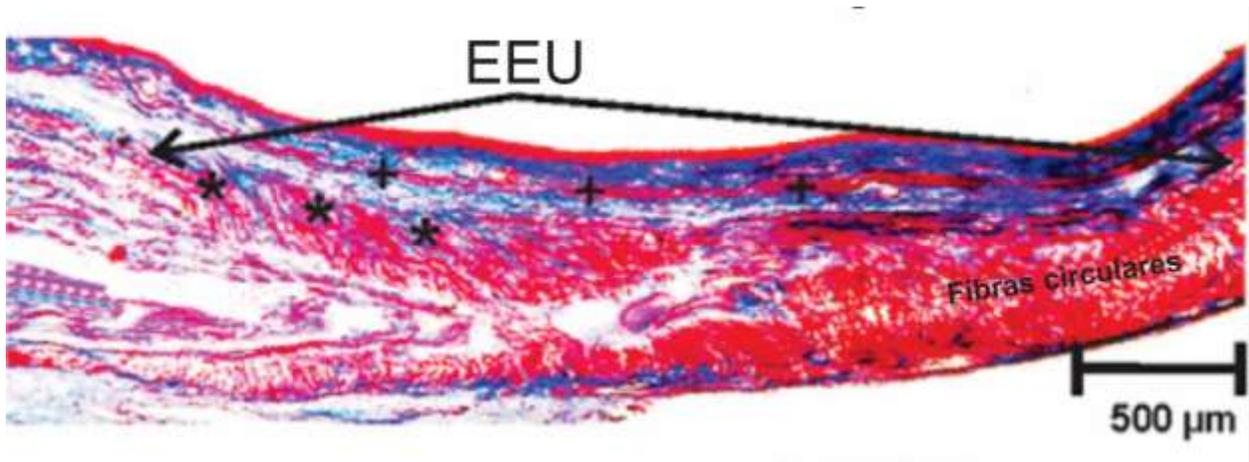


Figura 5. Histología de la uretra de la rata hembra en un corte longitudinal. Se observa la dirección de las fibras musculares del EEU las cuales incluyen a fibras longitudinales (+), circulares y diagonales (*). Modificado de Mirto y cols. 2019.

1.1.2 Control nervioso del tracto urinario inferior

Las funciones del tracto urinario son el almacenamiento y la expulsión de orina (Mostwin y cols. 2001). Durante el almacenamiento, la orina, proveniente de los riñones, se va acumulando en la vejiga urinaria, esto ocurre en más del 99% del tiempo y es posible porque el músculo detrusor (músculo liso de la vejiga) está relajado, mientras que la musculatura lisa y estriada de la uretra está contraída, cerrando así al lumen uretral. Esto evita que la orina almacenada fluya por la uretra y se mantenga la continencia urinaria.

En la expulsión de orina la musculatura lisa y estriada de la uretra se relajan mientras que el detrusor se contrae, favoreciendo la expulsión de orina. El incremento de la presión vesical y la relajación de la uretra permite el paso de la orina al exterior del cuerpo (Sugaya y cols. 2005).

La coordinación de la actividad de los músculos lisos y estriado del tracto urinario inferior es mediado por un complejo circuito neuronal que activa reflejos espinales y supraespinales, involucrando al cerebro, a la médula espinal y al sistema nervioso periférico. Esa regulación es mediada por múltiples receptores y neurotransmisores en la que participan mecanismos sensoriales, así como de vías eferentes somáticas y autonómicas; simpáticas y parasimpáticas (Figura 6; Fowler y cols. 2008).

El tracto urinario inferior está inervado por tres conjuntos de nervios que llevan información motora y/o sensorial. Las vías parasimpáticas sacras viajan por el nervio pélvico, las vías simpáticas toracolumbares viajan por el nervio hipogástrico y las vías somáticas sacras viajan a través del nervio pudendo (Figura 6; Fowler y cols. 2008).

Las vías simpáticas contribuyen, mediante la activación de receptores adrenérgicos beta y alfa a la relajación del músculo detrusor y a la contracción del cuello vesical durante el almacenamiento de orina, respectivamente (Fowler y cols. 2008). Las neuronas parasimpáticas son responsables de la contracción del músculo detrusor vesical y las motoneuronas somáticas de controlar la actividad del EEU. Además de llevar información motora, los nervios que inervan a la vejiga urinaria también transportan información sobre el grado o nivel de llenado vesical (sensorial) a la médula espinal (Figura 6; Fowler y cols. 2008).

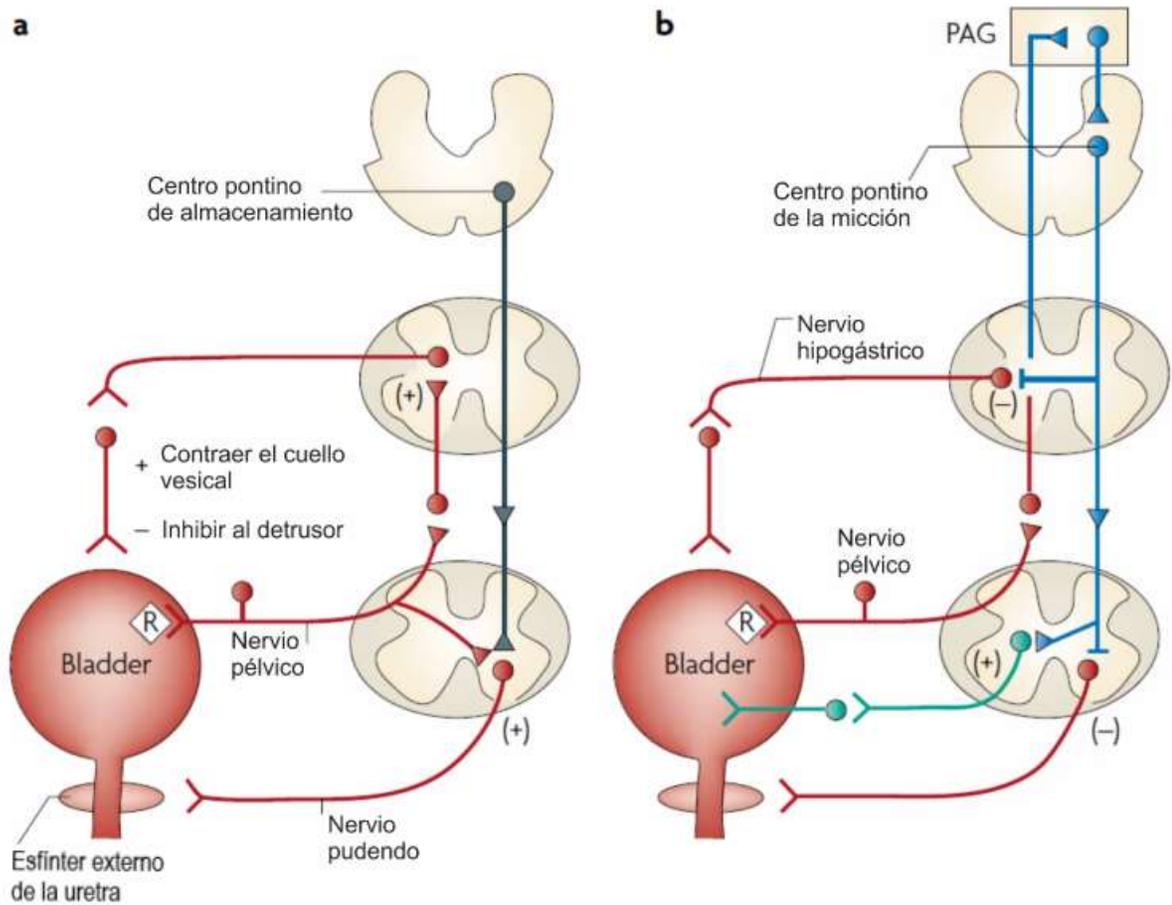


Figura 6. Circuitos nerviosos que controlan la fase de almacenamiento (a) y expulsión de orina (b). PAG, materia gris periacueductal. R, receptores sensoriales. Modificado de Fowler y cols. 2008.

1.2 Piso pélvico femenino

El piso pélvico es un sistema complejo de componentes musculares y tejido conectivo que provee soporte a la visceras pélvicas y contribuye a mantener la continencia urinaria y fecal. Las fascias y los ligamentos proveen soporte pasivo mientras que los músculos, principalmente el levator ani, provee soporte activo. El piso pélvico tiene tres capas: la fascia pélvica, el diafragma pélvico y el diafragma urogenital, las cuales están íntimamente relacionadas con la uretra, el esfínter anal y la vagina.

La fascia pélvica está constituida por los arcos tendinoso y levator ani. El diafragma pélvico está constituido por el músculo levator ani, cuyas fibras se insertan en el pubis y en el arco tendinoso de levator ani, y está conformado por los músculos pubococcígeo, iliococcígeo y coccígeo (Figura 7A). El diafragma urogenital, también llamado espacio perineal profundo, está constituido principalmente por el músculo transverso profundo del perineo, el cuál se origina en la superficie interna del ramo isquial (Figura 7B; Stoker y cols. 2001, Raizada y Mittal 2008).

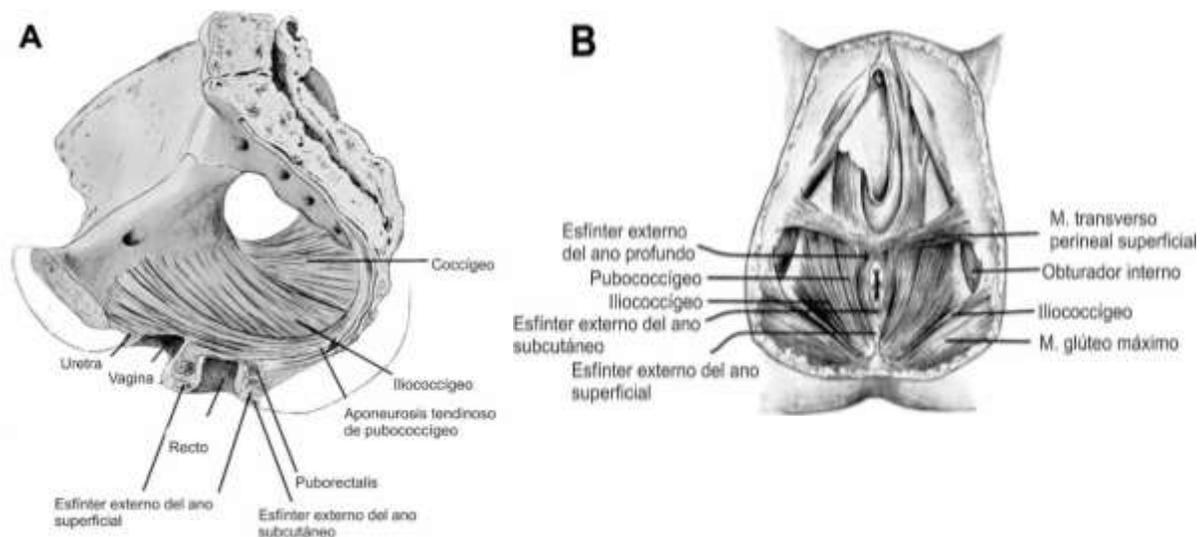


Figura 7. Esquema del piso pélvico femenino en una vista lateral (A) y vista desde la superficie perineal (B). Modificado de Raizada y Mittal 2008.

1.3 Patologías urinarias

Los síntomas son los indicadores subjetivos de una enfermedad o cambio de una condición, puede ser percibida por el paciente, por su cuidador o compañero y puede llevarlo (a) a buscar ayuda a los profesionales de salud (Abrams y cols. 2002). Existen varios síntomas de disfunciones urinarias, estos incluyen a los de incontinencia urinaria, los de almacenamiento vesical, los sensoriales, y los de expulsión de orina y postmicción (Haylen y cols. 2010).

Los síntomas de incontinencia urinaria son (Haylen y cols. 2010):

- Incontinencia urinaria de esfuerzo: Es la pérdida involuntaria de orina asociada con esfuerzo físico como actividades deportivas, estornudos o al toser.
- Incontinencia urinaria de urgencia: Es la pérdida involuntaria de orina asociada con urgencia.
- Incontinencia urinaria mixta: Es la combinación de las dos anteriores.
- Enuresis nocturna: Es la pérdida involuntaria de orina durante el sueño.

Los síntomas de almacenamiento vesical son:

- Frecuencia urinaria: Es la queja que las micciones ocurren más frecuente durante las horas de vigilia que lo normal.
- Nocturia: Es la queja de interrumpir el sueño uno o más veces para orinar.
- Urgencia: Es la queja de un repentino deseo de expulsar orina, la cual es difícil de aplazar.
- Síndrome de vejiga hiperactiva: Es la urgencia urinaria usualmente acompañada por frecuencia y nocturia con o sin incontinencia urinaria de esfuerzo en ausencia de infecciones del tracto urinario inferior.

Los síntomas de expulsión de orina y postmicción son:

- Flujo lento de orina: Es la queja de un flujo de orina más lento, comparado a los realizados previamente.
- Intermitencia: Es la queja de que durante la expulsión de orina el flujo de orina para y luego vuelve a comenzar.
- Goteo postmicción: Es la queja de pérdida de orina posterior a la expulsión de orina.

-Retención urinaria: Es la queja de la incapacidad de expulsar orina a pesar de un esfuerzo persistente.

En las mujeres se presentan varias patologías urogenitales tales como incontinencia urinaria, retención urinaria y disfunciones sexuales. La prevalencia promedio de incontinencia urinaria en mujeres de 15 a 85 años es de 27.6%, con un rango amplio de 4.8 - 58.4% debido a la variación entre mujeres de los factores de riesgo de la incontinencia como la edad, número de partos, obesidad, histerectomía e isquemia cerebral (Minassian y cols. 2003). La prevalencia de retención urinaria es del 1.5% en mujeres mayores a 65 años y la de las disfunciones sexuales de 43% en mujeres de 57 a 85 años (Laumann y cols. 1999, Cohn y cols. 2017). Existen múltiples factores relacionados con la aparición de estas patologías, entre los cuales se encuentran la edad, la histerectomía, la obesidad, la diabetes, el embarazo y el parto vaginal (Peyrat y cols. 2002, Minassian y cols. 2003).

2. Antecedentes

El parto es el proceso fisiológico por el cual el feto es expulsado del útero (Snegovskikh y cols. 2006) y se divide en tres etapas: La primera corresponde a la dilatación del cérvix, que en mujeres nulíparas dura alrededor de seis horas; la segunda concierne a la expulsión de feto, y duración promedio es de alrededor de 50 minutos; y la tercera involucra la expulsión de la placenta, con una duración promedio de 30 minutos (Jones y Larson 2003). La prolongación de una o más horas de la primera o segunda etapa conduce a partos distócicos o de larga duración (Shields y cols. 2007). Esta anomalía es uno de los problemas más comunes en mujeres nulíparas y justifican el 50% de las cesáreas (Shields y cols. 2007, Kjaergaard y cols. 2009).

Se ha reportado que inmediatamente después del parto hay una incidencia de retención urinaria del 11% y de incontinencia urinaria del 31.15% (Kekre y cols. 2011), y que un año después la incidencia de incontinencia urinaria disminuye a 29% (Thom y cols. 2011).

En los Estados Unidos de América, el costo anual del tratamiento de la incontinencia urinaria es de 65.9 billones de dólares (en México no se ha calculado su costo), lo que muestra que además de afectar a la salud de la mujer, también afecta a la economía (Coyne y cols. 2014).

Efectos del parto sobre el aparato urogenital y su inervación

Durante la segunda etapa del parto, el AUG, el piso pélvico y su inervación están expuestos a fuerzas de presión y tracción. Por ejemplo, durante esta etapa se ha sugerido que la musculatura del piso pélvico es estirada y el hiato genital es distendido, lo que podría afectar su función (Figura 8; Schüssler 1994). De hecho, este evento ha sido asociado con un aumento en la incidencia de incontinencia urinaria, de 6% en mujeres nulíparas a un 9.7, 16.3 y 23.9% en mujeres con 1, 2 o 3 partos, respectivamente (Nygaard y cols. 2008).

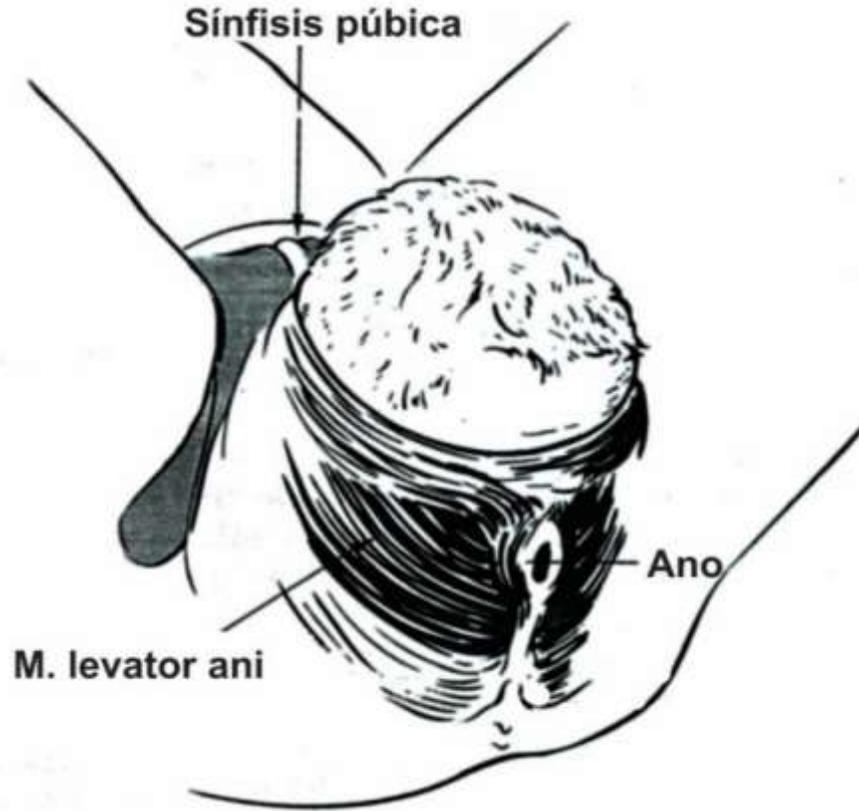


Figura 8. El piso pélvico durante la expulsión del feto en la segunda etapa del parto. Note el sobrestiramiento del músculo levator ani. Modificado de Schüssler 1994.

Se ha reportado que la incontinencia urinaria es más común inmediatamente después del parto y es más probable que ocurra en mujeres con partos distócicos con/sin intervención quirúrgica (uso de pinzas obstétricas y episiotomias) y presencia de macrosomía (peso fetal >3.5 kg) (Snooks y cols. 1986, Dietz y Schierlitz 2005, Gartland y cols. 2012).

Además, se ha reportado que conforme aumenta el número de partos se incrementa el porcentaje de prevalencia de mujeres con incontinencia urinaria de esfuerzo, incontinencia urinaria de urgencia y prolapsos (Figura 9; MacLennan y cols. 2000).

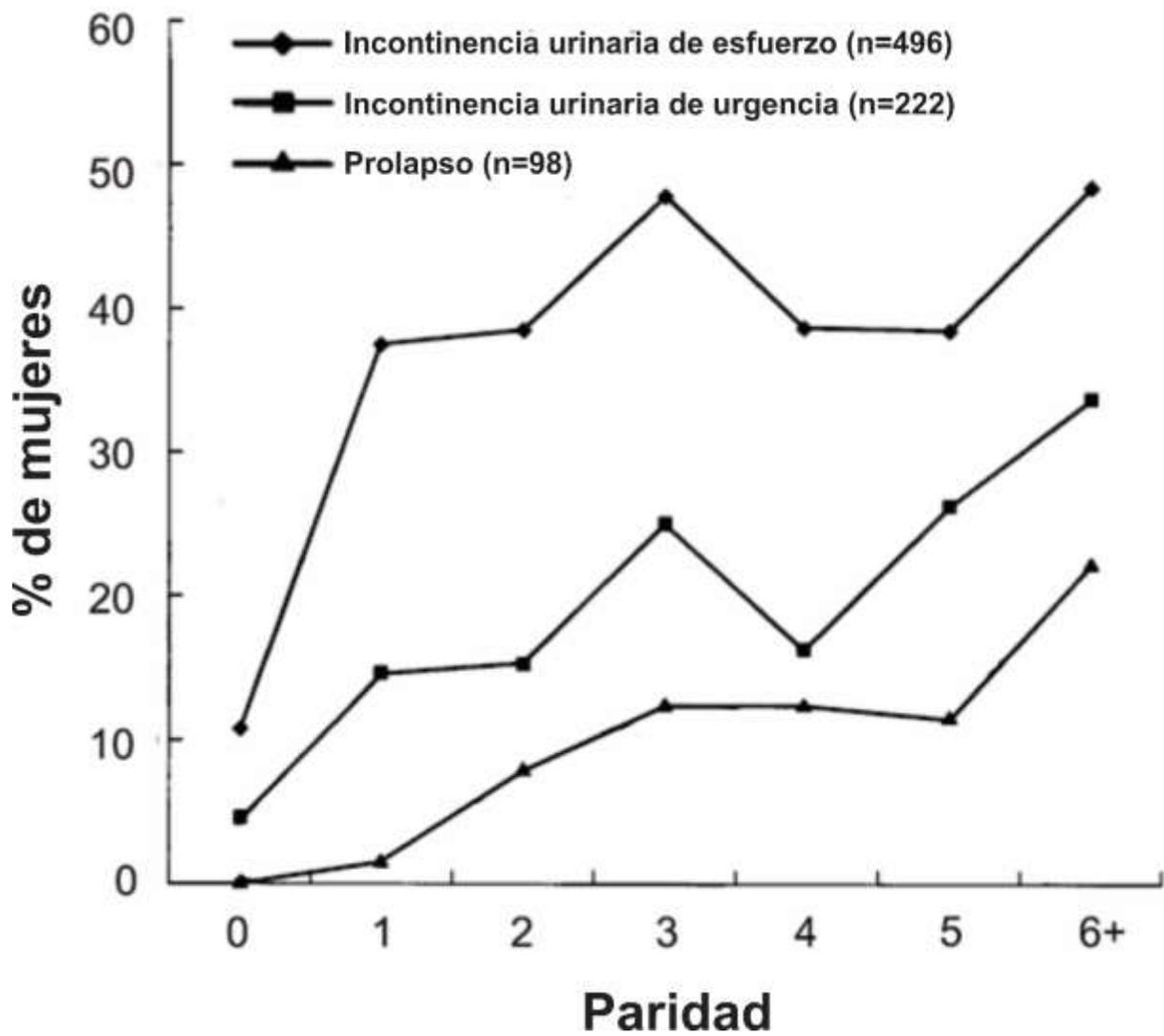


Figura 9. Gráfica del porcentaje de prevalencia de patologías urinarias en mujeres nulíparas y múltiparas. Modificado de MacLennan y cols. 2000.

El mecanismo de lesión asociado al parto y su relación con la aparición de los desórdenes del AUG es incierto. Sin embargo, existen algunos estudios en mujeres que han indicado que la lesión del piso pélvico y de su inervación durante ese proceso fisiológico podrían ser factores determinantes.

En un estudio de mujeres primíparas y multíparas de 3 meses posparto se mostró un descenso del piso pélvico (m. pubococcígeo) cuando este se encontraba relajado (1.7 cm), durante la máxima contracción voluntaria (1.6 cm) o durante esfuerzo máximo de estiramiento (intento de expulsar heces, 4 cm). Este descenso fue mayor en las mujeres que habían tenido parto prolongado (>0.5 h; Tsunoda y cols. 1999).

En otro estudio, empleando imágenes de resonancia magnética, se encontró que 20% de las mujeres primíparas presentaban anomalías del piso pélvico, por ejemplo, desinserción de las fibras musculares en el hueso púbico (DeLancey y cols. 2003). Esto sugiere que el parto vaginal induce lesión anatómica del piso pélvico de la mujer.

Diversos estudios electrofisiológicos han mostrado que también se afecta la conducción eléctrica del nervio pudendo. En mujeres de cinco días postparto, la latencia del potencial motor evocado del nervio pudendo (tiempo que pasa entre la estimulación de los nervios sacros S2-S3 y la deflexión del potencial evocado del esfínter anal) aumenta alrededor del 100% vs mujeres no gestantes (7.44 ± 3.14 ms vs 4.10 ± 1.15 ms, respectivamente). Es decir, la respuesta es más lenta y este efecto se mantiene hasta por 5 meses postparto (Sato y cols. 2001).

Para conocer el grado de estiramiento del piso pélvico y de su inervación durante la expulsión del feto se han creado modelos computacionales en 3-D basados en mediciones del AUG y su inervación en cadáveres de mujeres. En este tipo de estudios se encontró que cuando la cabeza del feto se encuentra alrededor de 10 cm por debajo de las espinas isquiales, los componentes del músculo levator ani sufren estiramiento. Por ejemplo, las fibras mediales del músculo pubococcígeo y del iliococcígeo tuvieron un 326% y 273% de estiramiento, respectivamente, mientras que el puborectalis alcanzó un grado de estiramiento de 228% (Lien y cols. 2004). Además, en otro estudio se encontró que las ramas del nervio pudendo se estiran en diferente porcentaje conforme la cabeza fetal desciende a través del canal de parto. Así por ejemplo, la rama que va al recto se estira en alrededor del 5% cuando el feto está a la mitad del

canal de parto, aumenta a alrededor del 20% en la parte distal y aumenta hasta 35% en la parte distal del canal (Figura 10; Lien y cols. 2005).

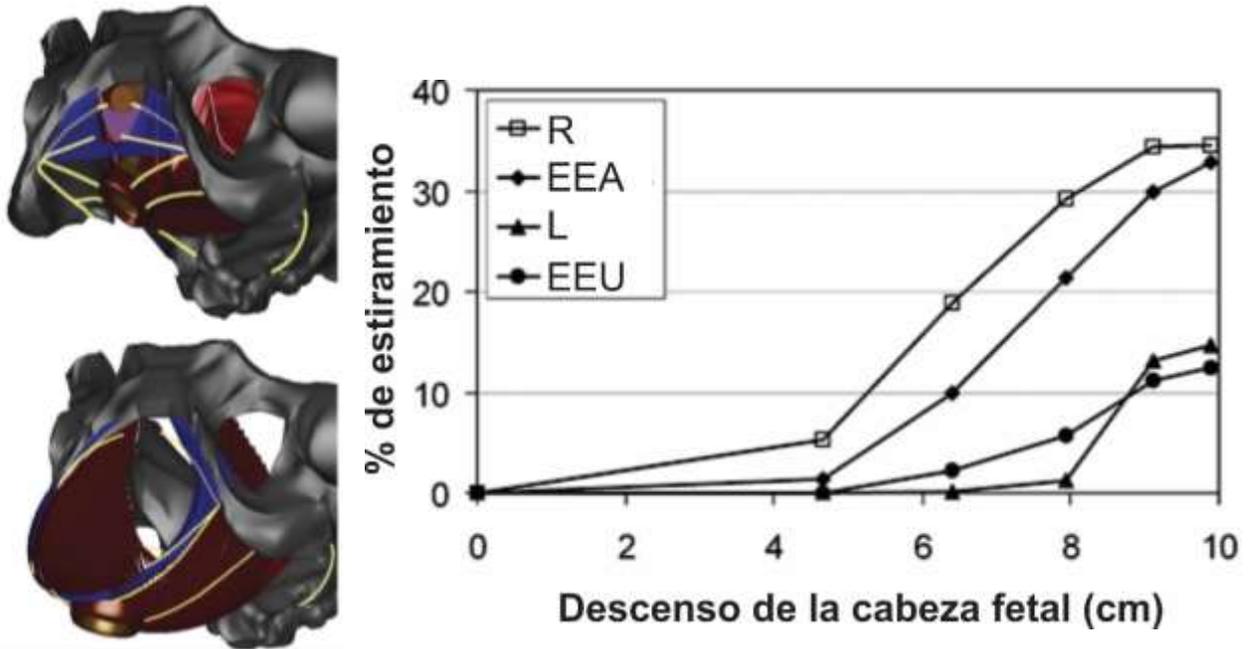


Figura 10. Esquema en 3-D del estiramiento del piso pélvico y su innervación de la mujer. En guinda se muestra la musculatura estriada del piso pélvico, en rosa, la vagina, en amarillo, las ramas del nervio pudendo, y en morado, la membrana perineal. La gráfica muestra el porcentaje de estiramiento de las ramas del nervio pudendo conforme el feto desciende por el canal de parto: R, rama al recto; EEA, rama al esfínter externo del ano; L, rama a los labios menores; EEU, rama al esfínter externo de la uretra. Modificado de Lien y cols. 2005.

Tratamientos de disfunciones urinarias

Entre los tratamientos más comunes para la incontinencia urinaria están el quirúrgico y el farmacológico. En el primero se coloca una malla sintética en la uretra media u otras regiones del piso pélvico y el farmacológico puede ser por la administración de hormonas (terapia de reemplazo hormonal), agonistas al receptor alfa adrenérgico o anticolinérgicos. Sin embargo, los resultados no han sido muy positivos e incluso en algunos casos fueron contraproducentes. Así por ejemplo, los agentes farmacéuticos no son muy selectivos y tienen efectos secundarios dañinos (Daneshgari y cols. 2008, Malallah y Al-Shaiji 2015), por lo que se buscan terapias alternativas como el de la neuromodulación.

Neuromodulación por estimulación eléctrica

Estudios en animales han mostrado que la estimulación eléctrica directa a un nervio lesionado facilita su regeneración. Por ejemplo, la estimulación eléctrica por 15 minutos del nervio Soleus del conejo, lesionado experimentalmente, aceleró la recuperación funcional de su órgano blanco el músculo Soleus (fuerza de contracción) (Nix y Hopf 1983), lo que indica que hubo regeneración nerviosa. También se ha observado que posterior a la lesión del nervio ciático y su estimulación eléctrica directa durante 1 h (3V, 0.1 ms, 20 Hz), ocurrió un incremento en la velocidad de su potencial de acción compuesto (15 m/s, grupo sin estimulación eléctrica vs 21 m/s, grupo con estimulación eléctrica) y un engrosamiento de la capa de mielina de sus fibras, comparado con el grupo no estimulado pero lesionado. En contraste, la amplitud del potencial de acción y el diámetro del axón se mantuvieron sin cambios (Zhang y cols. 2013).

El primer estudio sistemático para promover la regeneración del axón a través de estimulación eléctrica fue realizado por Al-Majed y colaboradores en el año 2000 (Al-majed y cols. 2010). Ellos encontraron que la estimulación directa del nervio femoral (3V, 0.1 ms, 20 Hz), una hora por día durante dos semanas, casi duplicó el número de motoneuronas regeneradas después de 3 semanas de su transección. Resultados similares se observaron con la estimulación de nervios sensoriales de la pierna (Brushart y cols. 2005).

También se ha mostrado que la lesión y estimulación eléctrica inmediata del nervio femoral por una hora produce efectos máximos de regeneración de fibras nerviosas sensoriales (100% mayor de regeneración de fibras nerviosas con respecto a su control). Sin embargo, con

períodos de estimulación mayores a una hora se disminuye el número de neuronas sensoriales regeneradas, tanto musculares como cutáneas (Figura 11; Geremia y cols. 2007).

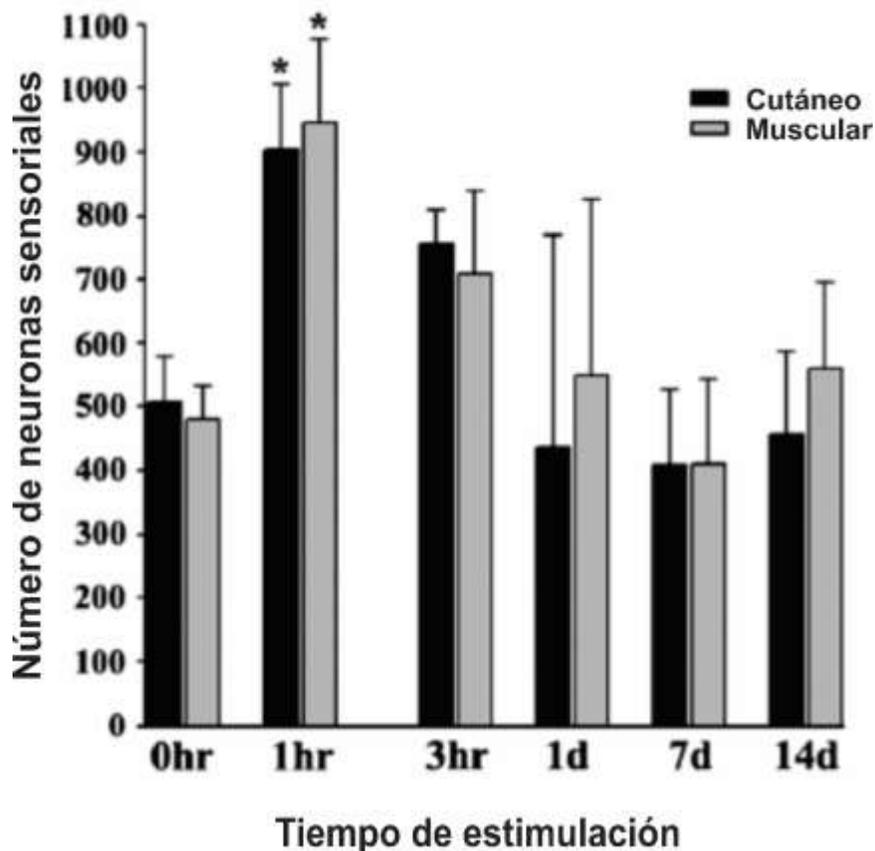


Figura 11. Gráfica del número de neuronas sensoriales regeneradas del nervio femoral con y sin (0 h) estimulación eléctrica directa del nervio. Modificado de Geremia y cols. 2007.

Finalmente, se ha reportado que la estimulación eléctrica de la rama motora del nervio pudendo de la rata (20 Hz, 0.3 mA, 0.1 ms) aumenta la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) y de B_{II}-tubulina en el núcleo de Onuf de ratas con DV (Figura 12; Jiang y cols. 2012). El BDNF es un elemento muy importante en la regeneración de los nervios (Geremia y cols. 2007, Faroni y cols. 2015) ya que promueve la formación de conos de crecimiento que están compuestos por proteínas citoesqueléticas, como actina y B_{II}-tubulina y que favorecen la reconexión de los axones lesionados.

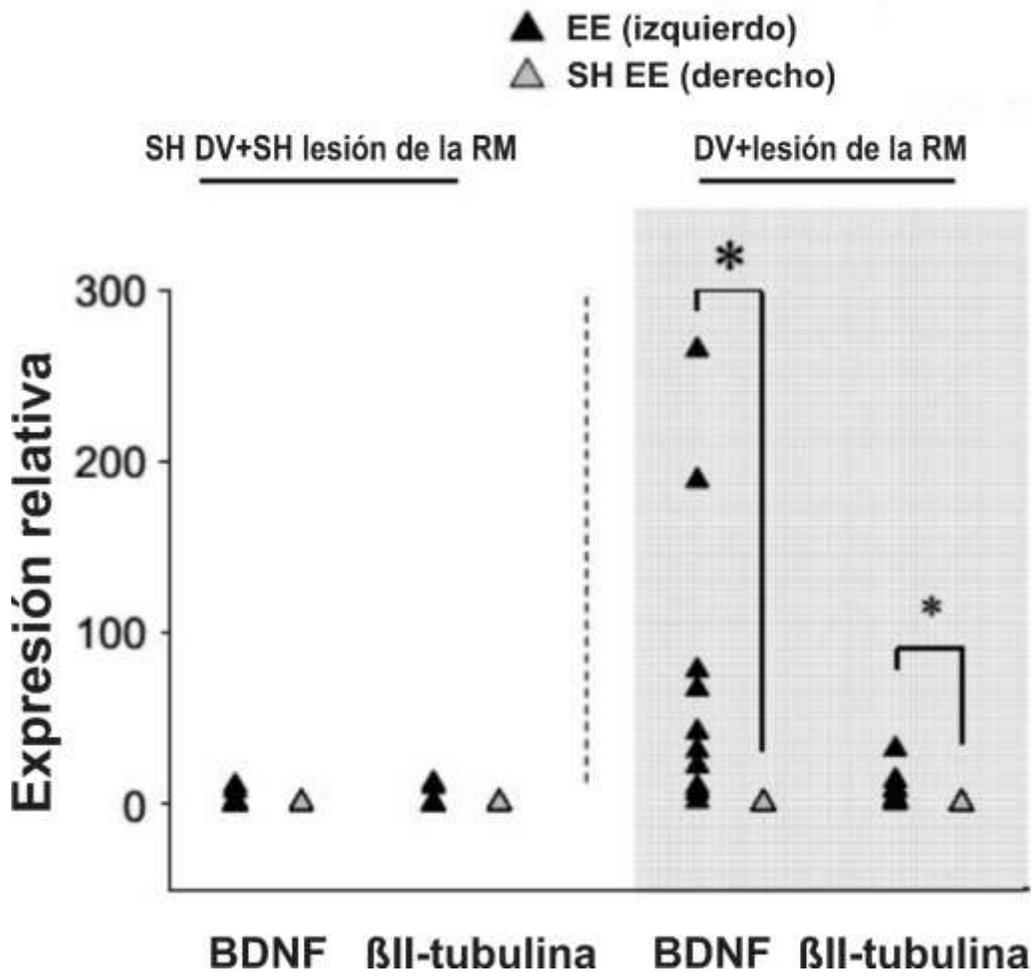


Figura 12. Expresión relativa del BDNF y β II-tubulina en el núcleo de Onuf de ratas con DV y con lesión de la rama motora. Modificado de Jiang y cols. 2012.

Los estudios anteriores muestran una alternativa de la estimulación eléctrica como terapia de patologías urogenitales a la estimulación eléctrica de las raíces sacras. Esta técnica se usa en pacientes a quienes se les implanta un neuroestimulador. La aplicación de corriente incrementa la eficiencia de vaciamiento vesical en pacientes con retención urinaria idiopática (Peeters y cols. 2014). Después de 2 años de la terapia, cerca del 70% de los pacientes con disfunciones urinarias como frecuencia urinaria e incontinencia urinaria de urgencia se recuperaron, sin embargo, en el 40% de los pacientes al año se le tuvo que reimplantar el estimulador por problemas de infección.

Dado que la estimulación eléctrica directa de los nervios es un procedimiento invasivo y poco práctico en la clínica, se han buscado sitios alternos para aplicar la estimulación eléctrica, tal es el caso de la piel cercana al nervio o del músculo de interés, lo que originó la técnica de neuromodulación percutánea y transcutánea.

La neuromodulación, a través de la activación de vías sensoriales, ofrece un tratamiento alternativo reversible y con una mínima invasión al paciente (Bartley y cols. 2013). Una técnica empleada en la neuromodulación es la estimulación percutánea del nervio dorsal del clítoris y del nervio tibial. Éstas terapias se han utilizado para el tratamiento de contracciones involuntarias de la vejiga hiperactiva. Se ha encontrado que en los pacientes con vejiga hiperactiva que reciben este tratamiento disminuye alrededor del 40% el número de micciones en 24 horas y tres meses posteriores a la estimulación eléctrica (Van der Pal y cols. 2006). Sin embargo, este tipo de tratamiento continúa evolucionando ya que la vejiga urinaria tiene la capacidad de relajarse o contraerse vía refleja de acuerdo a la frecuencia de estimulación eléctrica dada. La estimulación del nervio dorsal del clítoris menor a 20 Hz induce relajación vesical mientras que mayor a 20 Hz induce contracción vesical (Tai y cols. 2006). Este es el motivo por el cual la estimulación de este nervio es un blanco apropiado para el tratamiento de vejiga urinaria hiperactiva e hipoactiva.

Por lo anterior, es importante conocer los mecanismos de lesión de los nervios autonómicos y somáticos que controlan al AUG durante el trauma por parto vaginal y diseñar, en modelos animales, nuevas terapias de neuromodulación que faciliten su regeneración.

Modelo de distensión vaginal en ratas

Para conocer qué estructuras del AUG y su inervación se pueden lesionar durante el trauma ocasionado por el feto durante su descenso en la vagina se han creado modelos de estudio en animales de laboratorio. Uno de los más utilizados es el modelo de distensión vaginal (DV) en ratas.

El modelo de DV en ratas anestesiadas consiste en insertar un catéter Foley dentro de la vagina. El globo es inflado con agua destilada y se deja así por diferentes períodos de tiempo (Lin y cols. 1998). En general, la duración de la DV experimental es mayor al de la segunda etapa de un parto normal en mujeres, que es de alrededor de 1 hora (Jones y Larson 2003).

Lin y cols. (1998) emplearon en ratas vírgenes un catéter Foley número 12 inflado con 2.0 ml de agua y una DV de cuatro horas. Mostraron que cuatro semanas posteriores a la DV, el 46% de las ratas presentaron signos de incontinencia urinaria de esfuerzo, tales como la expulsión de gotas de orina durante una prueba de estornudo inducido en animales anestesiados. En estas hembras, el grosor de la musculatura lisa y la estriada de la pared uretral disminuyeron alrededor del 50%. Sievert y cols. (2001) utilizaron ratas postparto a las que distendieron la vagina con un catéter Foley 22 inflado con 5.0 ml de agua durante tres horas inmediatamente después del parto. Encontraron que a las cuatro semanas posteriores a la DV la capacidad media vesical fue mayor en las hembras con DV que la de las controles (1.4 ml en ratas control vs 2.1 ml en ratas con DV, sin análisis estadístico). El volumen de orina residual también se incrementó, de 0.3 ml en ratas control vs 1.31 ml en ratas con DV. Además, el 58% de las ratas con DV mostraron signos de incontinencia urinaria de esfuerzo (goteo durante estornudo).

En estudios a corto plazo se ha observado que cuatro días después de una DV de 30 min ó 1 hora se presenta adelgazamiento y separación de las fibras del EEU, una menor resistencia uretral a la salida de orina (presión intravesical, 31.4 cmH₂O, grupo con DV vs 41.1 cmH₂O, grupo sham DV; Cannon y cols. 2002, Damaser y cols. 2003) y una disminución en el número de fascículos nerviosos cercanos al EEU (sham DV, 45.5±4.1 vs DV, 32.5±7.7; Damaser y cols. 2003). La DV también induce isquemia en la vejiga urinaria, la uretra y la vagina, así como hipoxia del detrusor, del epitelio vaginal y vesical, y de la submucosa uretral (Damasar y cols. 2005). Cuatro días posteriores a la DV la actividad electromiográfica del EEU está abolida,

habiendo cierto grado de recuperación a las tres semanas después de la DV (Figura 13; Jiang y cols. 2009).

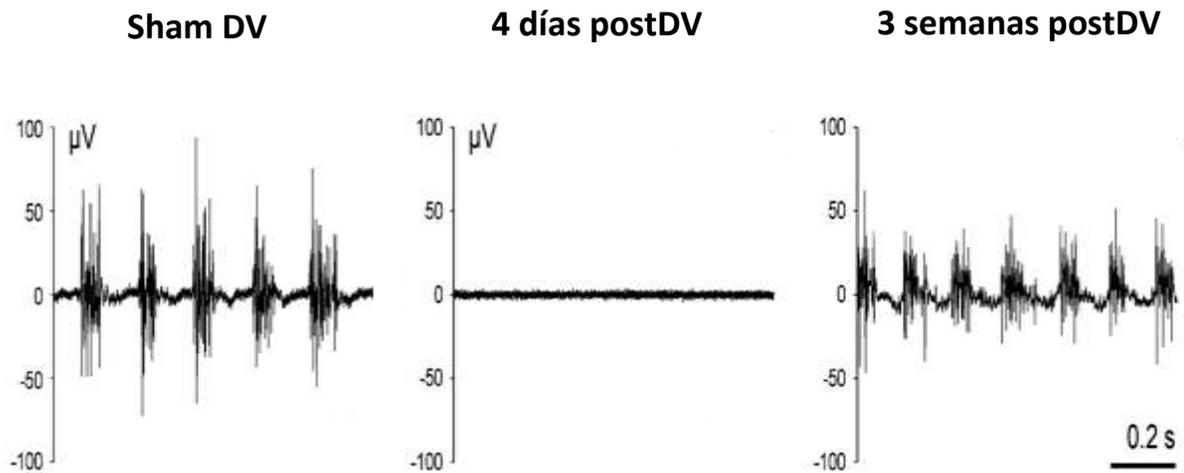


Figura 13. Electromiogramas del EEU de la rata hembra durante la expulsión de orina inducida, en diferentes condiciones. Modificado de Jiang y cols. 2009.

3. Justificación

Los estudios mencionados anteriormente sólo evalúan el efecto de la DV sobre el EEU y su control somático, la rama motora del nervio pudendo. Sin embargo, en el laboratorio hemos caracterizado la topografía de nervios autonómicos y somáticos que controlan el aparato urogenital de la rata hembra, y debido a su ubicación, otros nervios también se podrían lesionar por estiramiento o compresión durante la DV (Figura 14).

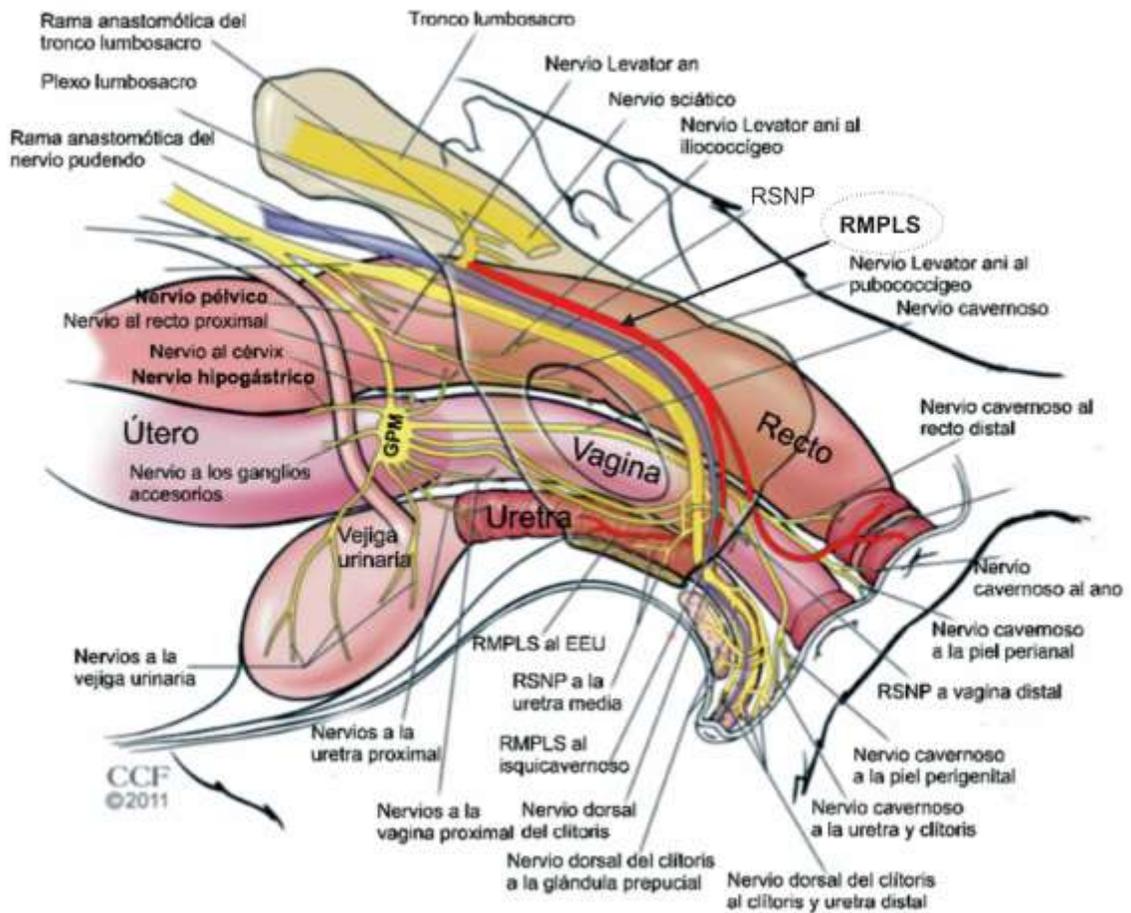


Figura 14. Esquema del AUG de la rata hembra y su inervación autonómica y somática. Note en rojo la inervación del EEU, la rama motora del plexo lumbosacro (RMPLS). RSNP, rama sensorial del nervio pudendo. Modificado de Pastelín y cols. 2012.

Además, todos los efectos de la DV han sido observados y evaluados en animales anestesiados, sin embargo, es sumamente importante conocer si estos cambios estructurales y funcionales del aparato urinario se correlacionan con signos de disfunción urinaria a nivel conductual.

Así también, es primordial el determinar si la recuperación de la función urinaria está correlacionada con la recuperación de los reflejos del esfínter externo de la uretra.

Finalmente, es fundamental el investigar si un tratamiento de neuromodulación poco invasivo, como la aplicación transcutánea de pulsos eléctricos, es efectivo para disminuir las disfunciones urinarias causadas por el daño mecánico y funcional inducido por la DV.

4. Hipótesis

En esta tesis doctoral se probaron cuatro hipótesis:

- La DV inducirá, por estiramiento y/o compresión, lesión de los órganos del AUG y su inervación.
- Debido al estiramiento y compresión de los nervios y órganos del AUG por la DV, las ratas presentarán signos conductuales de disfunciones urinarias y lesión nerviosa a corto plazo.
- La lesión nerviosa y los signos conductuales desaparecerán a mediano plazo, cuando se recupere el circuito neuromuscular del EEU, evidenciado por la reaparición de la actividad refleja.
- La estimulación transcutánea del NDC facilitará la recuperación funcional del tracto urinario inferior en ratas con DV.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar en ratas anestesiadas el efecto de la DV sobre el AUG y su inervación, y en ratas no anestesiadas, el efecto de la DV sobre las características de la conducta de micción y la actividad refleja del EEU, así como el efecto de la estimulación eléctrica transcutánea del NDC sobre la recuperación funcional del tracto urinario inferior en ratas con DV.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar el efecto de la DV sobre el AUG y su inervación de la rata.
- Determinar si la DV induce signos conductuales de disfunciones urinarias y lesión nerviosa a corto plazo.
- Establecer si la DV modifica los parámetros urinarios a corto y mediano plazo.
- Precisar el tiempo de recuperación post-DV de la función urinaria en ratas conscientes y la actividad eléctrica del NDC y de los reflejos del EEU (clitoro-EEU y vesico-EEU) en ratas anestesiadas.
- Comprobar si la estimulación transcutánea del NDC facilita la recuperación funcional del tracto urinario inferior en ratas con DV.

6. Animales

Se utilizaron ratas hembra vírgenes de la cepa Wistar de 250 - 350 g de peso. Los animales fueron mantenidos en condiciones de bioterio con ciclo oscuridad-luz invertido (12/12 h). La luz se programó para apagarse y encenderse a las 2:00 y 14:00 h, respectivamente. El alimento y agua se proporcionó *ad libitum*. La temperatura se mantuvo a alrededor de 24 °C.

6.1 Diseño experimental

Las ratas fueron asignadas a los siguientes grupos: 1) hembras sham de DV (SH DV), 2) hembras con DV, 3) hembras con DV y estimulación eléctrica transcutánea del NDC (EET), y 4) hembras con DV y sham de estimulación eléctrica transcutánea del NDC (SH EET). Los dos primeros grupos se asignaron al experimento 1 y 2, y los dos últimos al experimento 3.

En el experimento 1, se determinaron los cambios estructurales y funcionales del tracto urinario inferior en animales anestesiados con DV. Para ello, inmediato a la DV o SH DV, se midió la longitud del AUG y sus nervios (n=6 por grupo), se registraron electroneurogramas (ENGs) del NDC (n=4 por grupo) y se determinaron las características histológicas de la vejiga urinaria y ganglio pélvico mayor (GPM) (n=4 por grupo).

En el experimento 2, se determinó el efecto de la DV sobre la conducta de micción y la actividad del EEU. Por ello, se registró la conducta de micción y se determinaron los parámetros urinarios previamente y en los días 3, 5, 7, 9, 11 y 13 post-DV (n=8) o SH DV (n=5) en la fase de oscuridad y de luz. En otros animales se realizaron ENGs del NDC al día 3 post-DV (n=4) y electromiogramas (EMGs) del EEU en respuesta a la estimulación mecánica de la vaina clitoral (reflejo clitorio-EEU), vejiga urinaria (reflejo vesico-EEU) y durante cistometrogramas, inmediatamente y a los 3–15 días post-DV (n=57) o SH DV (n=8, un solo grupo).

En el experimento 3, se determinó el efecto de la estimulación eléctrica transcutánea del NDC sobre la conducta de micción y parámetros urinarios en animales con DV. Se aplicó EET (n=5) o SH EET (n=6) a la vaina clitoral de los animales durante 1 h, inmediatamente y a los días 2 y 4 post-DV. Se evaluó la conducta de micción y se determinaron los parámetros urinarios del día 5 al 13 post-DV, en la fase de oscuridad.

7. Experimento 1. Cambios estructurales y funcionales del tracto urinario inferior en animales anestesiados con DV

7.1 Métodos del experimento 1

Modelo de distensión vaginal

Las ratas fueron anestesiadas con una combinación de Ketamina (60 mg/kg) y Xilazina (7.5 mg/kg). Luego de alcanzar el plano anestésico, se insertó en la vagina de la rata un catéter Foley del número 10, previamente lubricada con un cotonete y aceite mineral, hasta tocar el cérvix. Se suturó el catéter a la piel lateral del orificio vaginal para asegurar su permanencia y posicionamiento en la vagina. Posteriormente se infló con 4.0 ml de agua destilada. En los animales SH DV sólo se insertó el catéter en la vagina por cuatro horas, pero no se infló con el agua destilada (Figura 15).

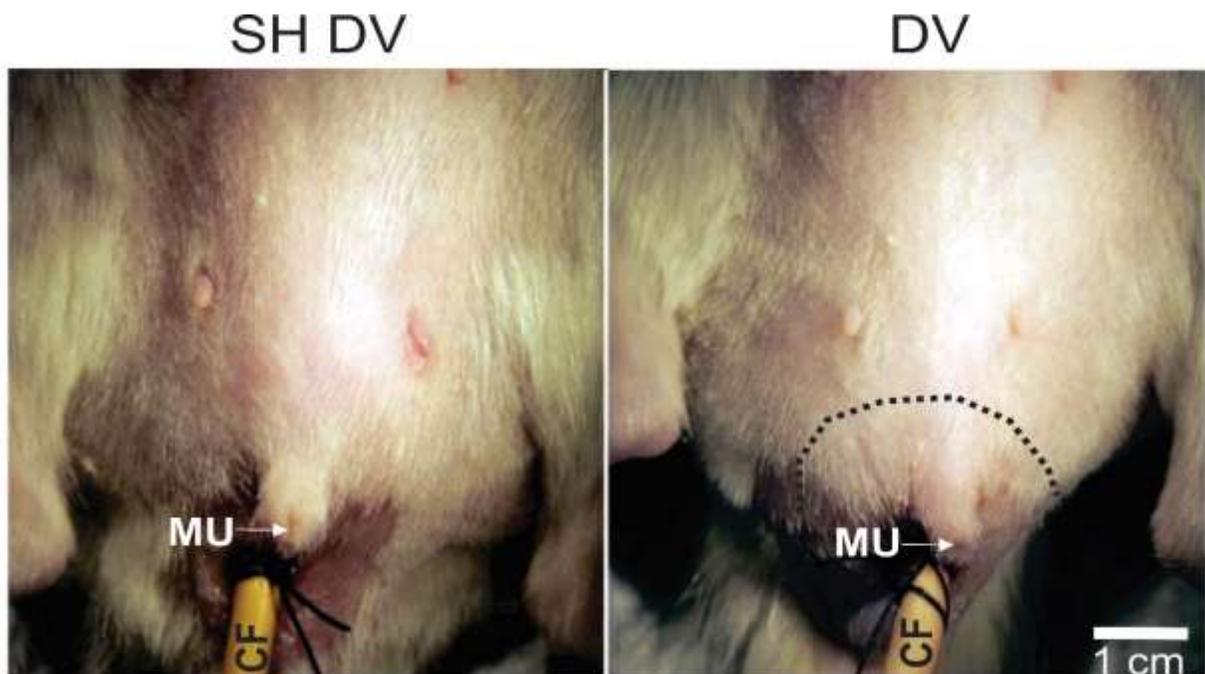


Figura 15. Fotografía de la piel perigenital de la rata hembra en posición supina durante la SH DV o DV. Se muestra el catéter Foley (CF) inflado con 4 ml de agua destilada insertado en la vagina de la rata. Note el área distendida durante la DV, el cual es señalado en líneas punteadas. MU, meato urinario.

Anatomía gruesa

Inmediatamente a la DV o SH DV con el catéter Foley en la vagina y sin desinflarlo, se realizó una incisión de la piel abdominal y pélvica longitudinalmente. Posteriormente, con la ayuda de un microscopio estereoscópico (MZ6 Leica) se removieron el hueso púbico e isquion y se midió el ancho de la vagina, la longitud de la vejiga urinaria y de la uretra. También se midió el volumen de orina vesical con una aguja de insulina. Finalmente, se localizaron y se midió, en una dirección anteroposterior, la longitud de los nervios vesicales, la del NDC y de los nervios que corren sobre la pared ventral de la vagina (Figura 16). En una dirección ventro-dorsolateral se midió la longitud de la RMPLS. Para medir la longitud de los nervios se empleó un hilo que se colocó encima de cada nervio y posteriormente se midió su longitud con un vernier digital (Mitutoyo, Japón). Los puntos de medición son mostrados en la Figura 16.

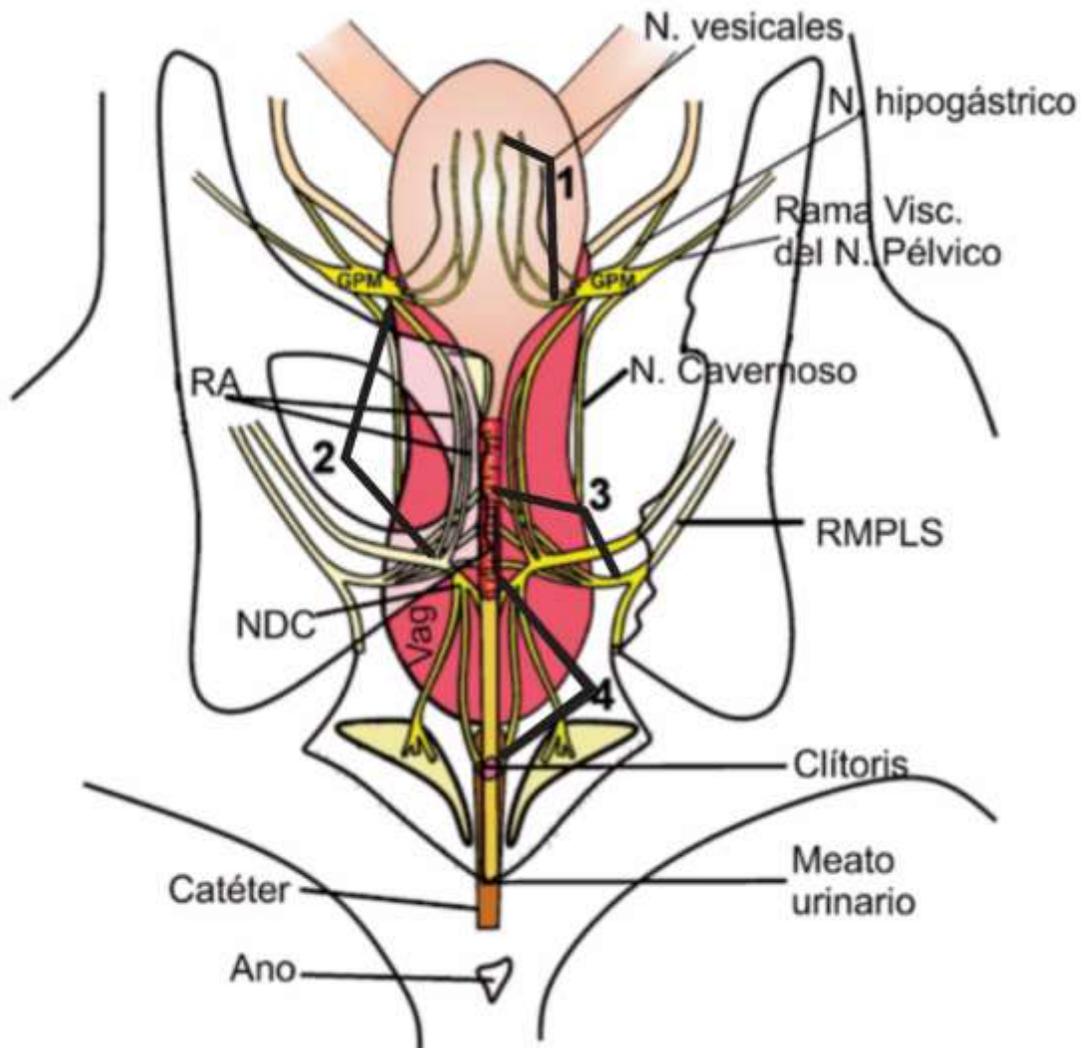


Figura 16. Aparato urogenital de la ratona hembra y su inervación. Las líneas en las que se encuentran los números indican los puntos de medición de cada nervio. RA, ramas anastomóticas. RMPLS, rama motora del plexo lumbosacro. NDC, nervio dorsal del clítoris. GPM, ganglio pélvico mayor. Vag, vagina distal.

Registro de la actividad electroneurográfica del NDC

Los animales fueron anestesiados con uretano (1.2 g/kg, i.p.) y con la ayuda de un microscopio estereoscópico se disecó el NDC en el nivel del arco isquiático. Luego, el NDC derecho fue cortado y se montaron un par de electrodos de acero inoxidable en forma de gancho en la parte distal a la sección para registrar su actividad eléctrica. Los electrodos fueron conectados a un amplificador de señales eléctricas Grass 7P511, y éste a un convertidor de señales analógicas a digitales (Digidata 1440A). Este último estuvo sincronizado con el software AxoScope para la observación, el almacenamiento y el análisis de la actividad eléctrica del NDC.

Se analizó la actividad eléctrica del NDC durante un período de tiempo de un segundo, seleccionado a la mitad de la duración de la estimulación mecánica (presión con unas pinzas quirúrgicas, Lawton 22-0910) de la vaina clitoral con el programa Clampfit-Axoscope, versión 10.4 (Figura 17).

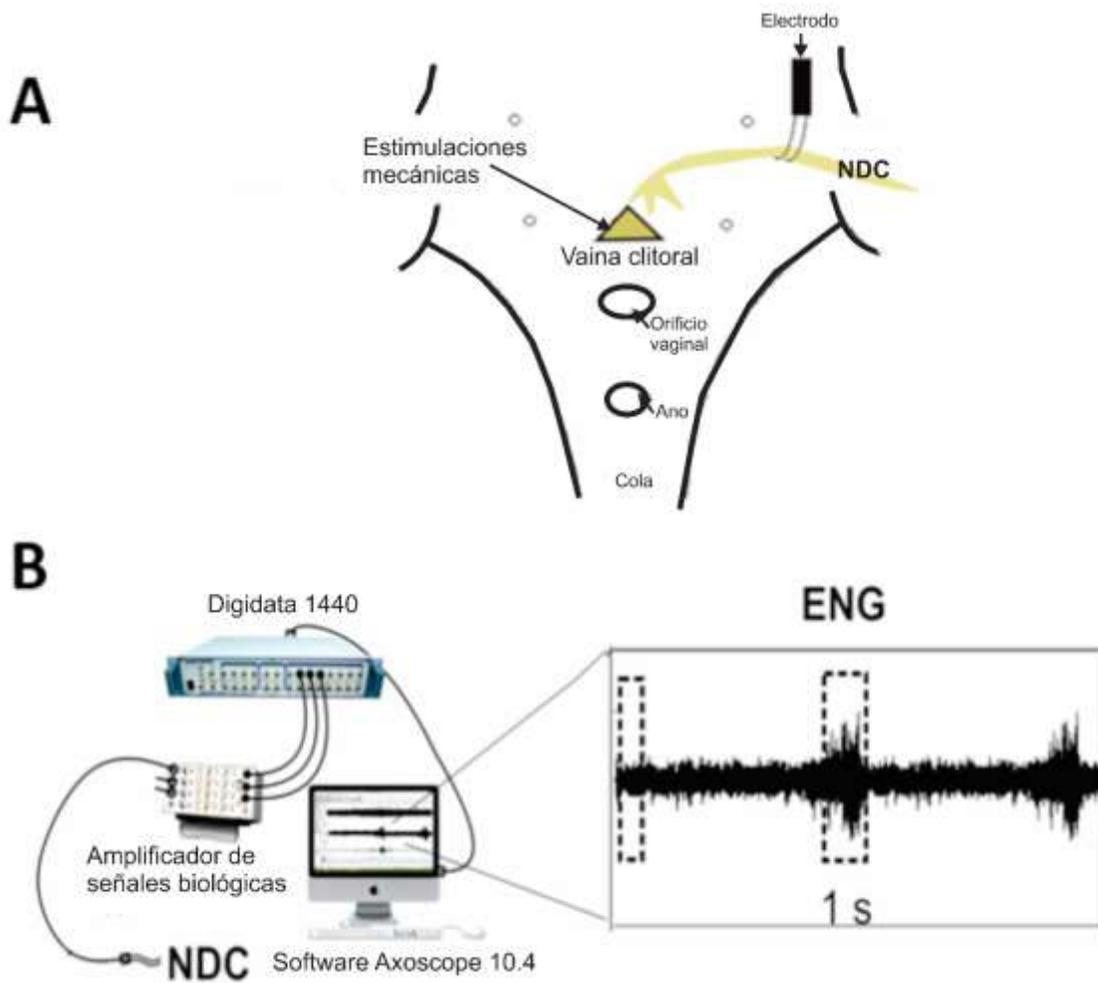


Figura 17. Topografía del NDC y componentes del sistema electrofisiológico para el registro del nervio. **A.** Esquema de la piel perineal de la rata hembra en una vista ventral. Se puede observar los electrodos montados en el NDC. **B.** Sistema del registro electrofisiológico del NDC y muestra de ejemplo de actividad electroneurográfica (ENG).

Histología de la vejiga urinaria y ganglio pélvico mayor

Inmediatamente posterior a la DV o SH DV, y con la ayuda de un microscopio estereoscópico, se extirparon la vejiga urinaria y el GPM derecho. Los tejidos fueron fijados en formalina al 4%, embebidos en parafina y cortados con un microtomo a 7 μm de grosor. Los cortes fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina, examinados con un microscopio óptico (Carl Zeiss, EUA) y fotografiados con una cámara digital (Cannon PowerShot S50, EUA).

Se analizó el grosor de las capas vesicales de tres cortes transversales por animal usando un procesador de imágenes digitales (AxioVision, 4.6, EUA). El grosor de las capas vesicales fue calculado al promediar el grosor de la línea media de la pared ventral y dorsal de la vejiga urinaria. El promedio del grosor de cada animal sirvió para calcular a su vez el promedio por cada grupo (DV o SH DV).

Se determinó también el área del GPM al medir y promediar tres cortes de la región media del ganglio por rata. De estas secciones, se promedió el área de 20 neuronas con un núcleo visible y que se localizaron en la región media del GPM. Para obtener el área del GPM y de sus neuronas se trazó el contorno de cada estructura y el programa AxioVision calculó el área delimitada. El grosor del GPM se determinó sumando el número de cortes a 7 μm en donde se encontraron neuronas y multiplicándolo por 7 μm .

Análisis estadístico

Todos los resultados son presentados con el valor de la media \pm el error estándar. Los análisis estadísticos y las gráficas se realizaron con los programas Sigma Plot y Graphpad Prism 5. Con la prueba paramétrica *t* de student se comparó la media del ancho de la vagina, la longitud de la uretra y de los nervios del AUG, así como el grosor de las capas vesicales y área del GPM y de sus neuronas entre el grupo DV con el grupo SH DV. El valor de significancia para los análisis estadísticos fue de $p < 0.05$.

7.2. Resultados del experimento 1

Anatomía gruesa del AUG

La DV incrementó significativamente el ancho de la vagina distal (SH DV = 9.8 ± 0.2 mm vs DV = 17 ± 0.3 mm, $p < 0.0001$) y la longitud de la vejiga urinaria (SH DV = 12 ± 0.5 mm vs DV = 25 ± 1.1 mm, $p < 0.0001$) pero no la longitud de la uretra (SH DV = 22.5 ± 0.5 mm vs DV = 27 ± 0.6 mm, $p = 0.07$).

En los animales con DV, el catéter presionó a la uretra pélvica con el hueso pélvico, lo que ocasionó oclusión uretral, no expulsión de orina durante la DV, y en consecuencia, retención urinaria durante la DV (volumen de orina: SH DV = 0.40 ± 0.15 ml vs DV = 1.67 ± 0.25 ml, $p < 0.001$) (Figura 18 A-B). También, se observaron hematomas en la vejiga urinaria de las ratas con DV pero no en los SH DV (Figura 18 C-D).

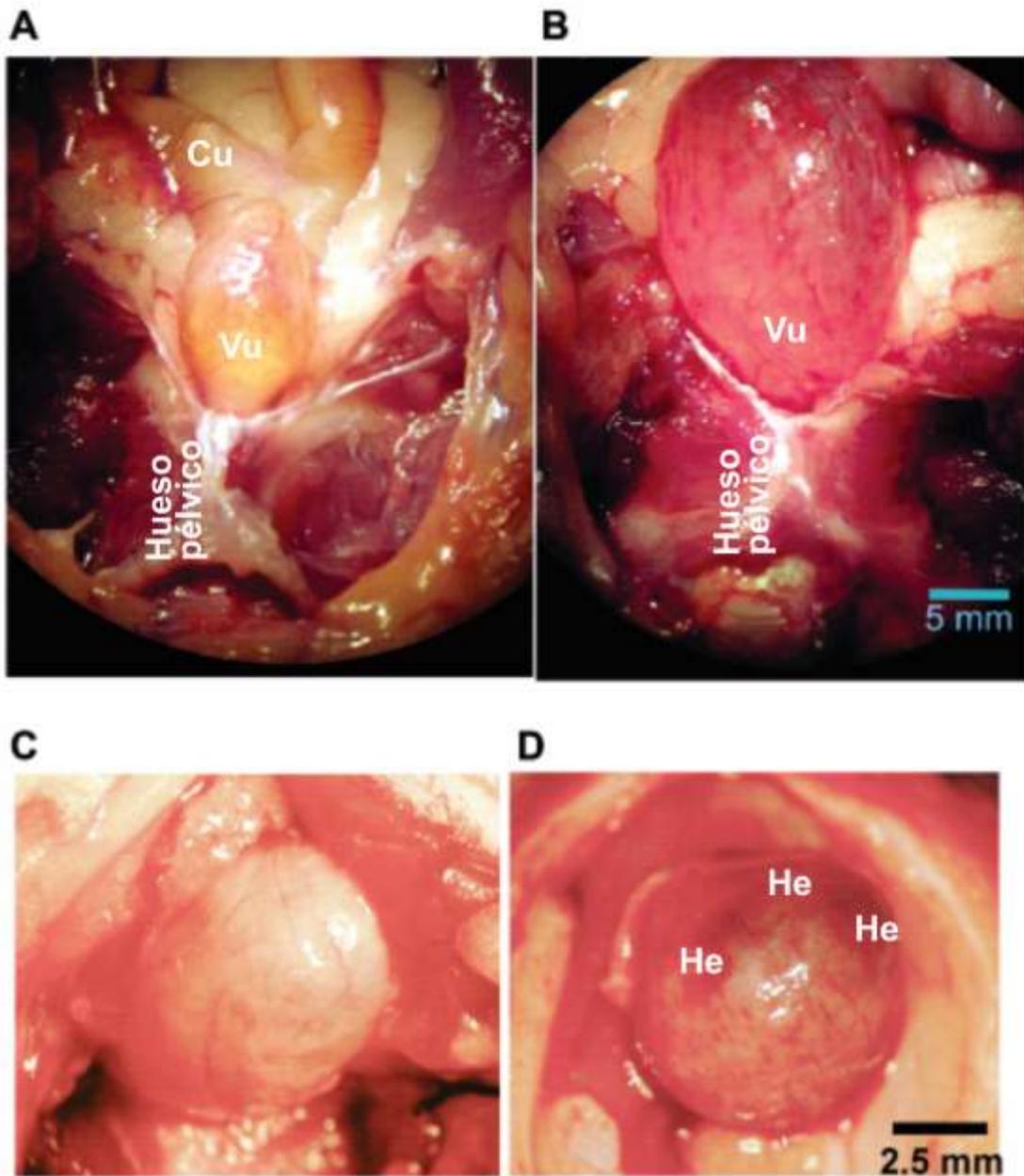


Figura 18. Fotografías del aparato urogenital durante SH DV (A y C) o DV (B y D). Note que durante la DV, el globo distiende el aparato urogenital distal y comprime la uretra pélvica con el hueso púbico provocando retención urinaria, sobredistensión vesical y hematomas en la vejiga urinaria. Cu, cuerno uterino; Vu, vejiga urinaria; He, hematoma.

La DV estiró a los nervios que controlan al AUG, tanto autonómicos como somáticos. Los nervios vesicales fueron elongados en alrededor del 56%, las ramas anastomóticas que se originan del GPM en alrededor del 36%, y la rama motora del plexo lumbosacro (RMPLS) y el NDC en alrededor del 50% (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la DV sobre la longitud de los nervios del AUG

Nervios	SH DV	DV
Ramas vesicales	16 ± 0.26	25 ± 0.5**
Ramas anatomóticas	11 ± 0.45	15 ± 1.7*
RMPLS	11.6 ± 1.67	17.5 ± 0.05*
NDC	10 ± 1.0	15 ± 1.0*

Los valores indican promedio ± error estándar, *t* de student **p*<0.05, ***p*<0.01. RMPLS, rama motora del plexo lumbosacro; NDC, nervio dorsal del clítoris.

Electroneurogramas del NDC

La actividad eléctrica del NDC se incrementó durante la estimulación mecánica de la vaina clitoral en los animales SH DV (Figura 19). Sin embargo, tanto la amplitud y la frecuencia de la actividad ENG del NDC disminuyó significativamente inmediatamente a la DV en comparación con los animales SH DV (Figura 19).

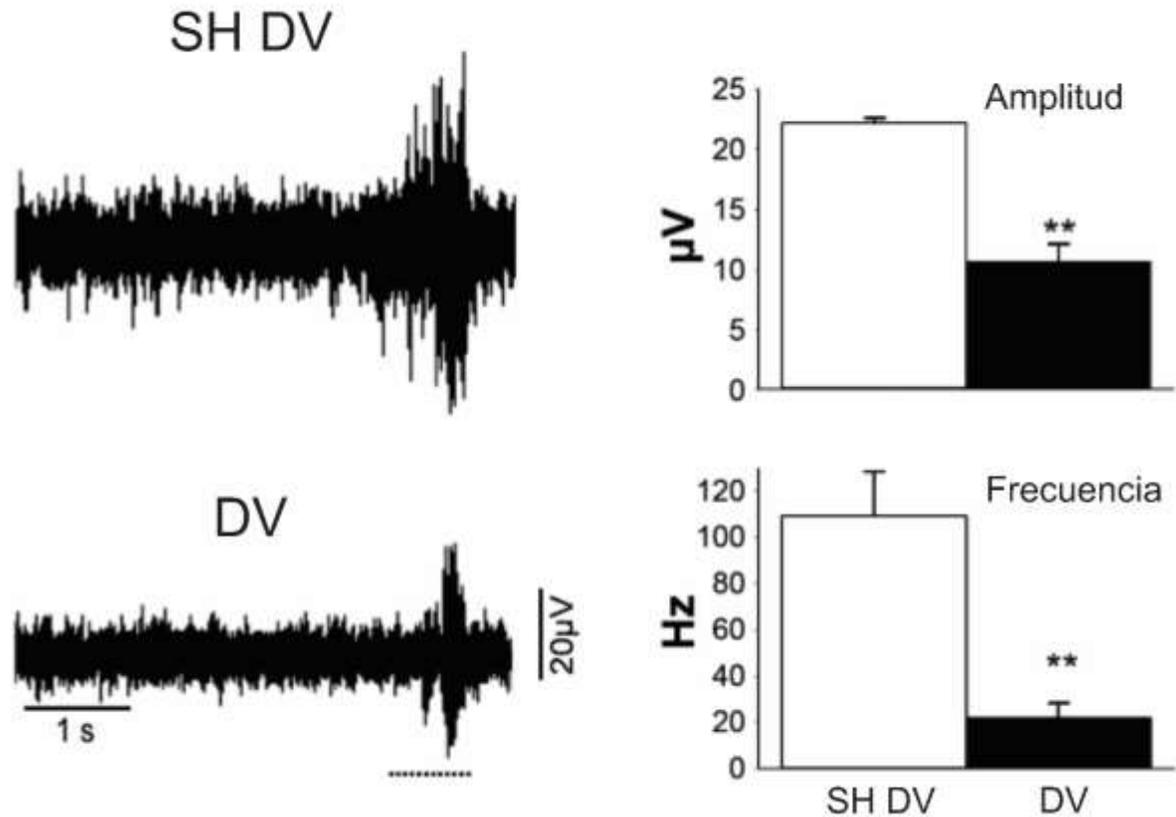


Figura 19. Ejemplos de la actividad eléctrica del NDC previo, durante y posterior a la estimulación mecánica de la vaina clitoral de animales con SH DV o DV. La línea punteada debajo del ENG indica el tiempo de estimulación de ambas actividades. Los valores de las gráficas representan el promedio \pm error estándar. ** indican diferencias significativas vs el grupo SH DV, $p < 0.01$.

Histología de la vejiga urinaria y del ganglio pélvico mayor

La DV sobredistendió la vejiga urinaria y decrementó significativamente el grosor de su epitelio ($p < 0.05$) y del detrusor ($p < 0.01$) pero no de la submucosa ($p > 0.05$) (Figura 20). La DV también indujo extravasación de leucocitos, principalmente en la submucosa. Por otra parte, la DV no afectó las características morfométricas del GPM ni de sus neuronas (Figura 21).

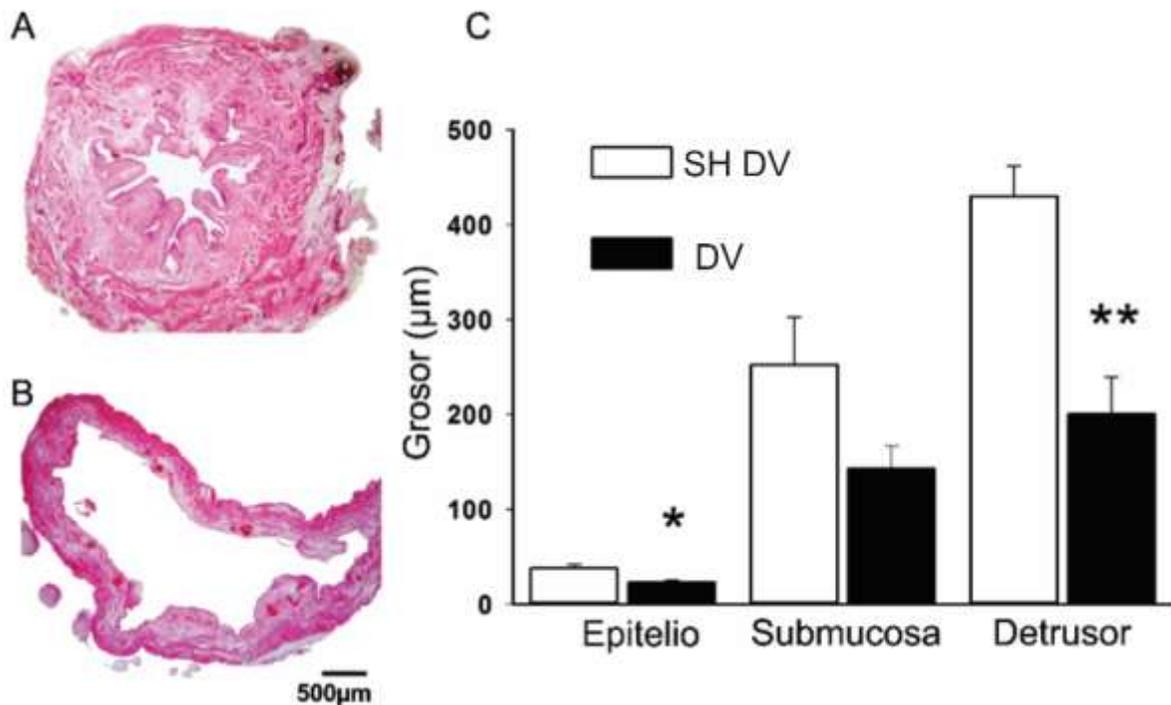


Figura 20. Fotografías de cortes transversales de la vejiga urinaria media (tinción con H&E) de animales SH DV (A) y con DV (B). Note que el grosor del epitelio y del detrusor son decrementados en animales con DV (C). Los valores representan el promedio \pm error estándar. Analizado con prueba *t* de student, donde * representa diferencias significativas vs animales SH DV, $p < 0.05$.

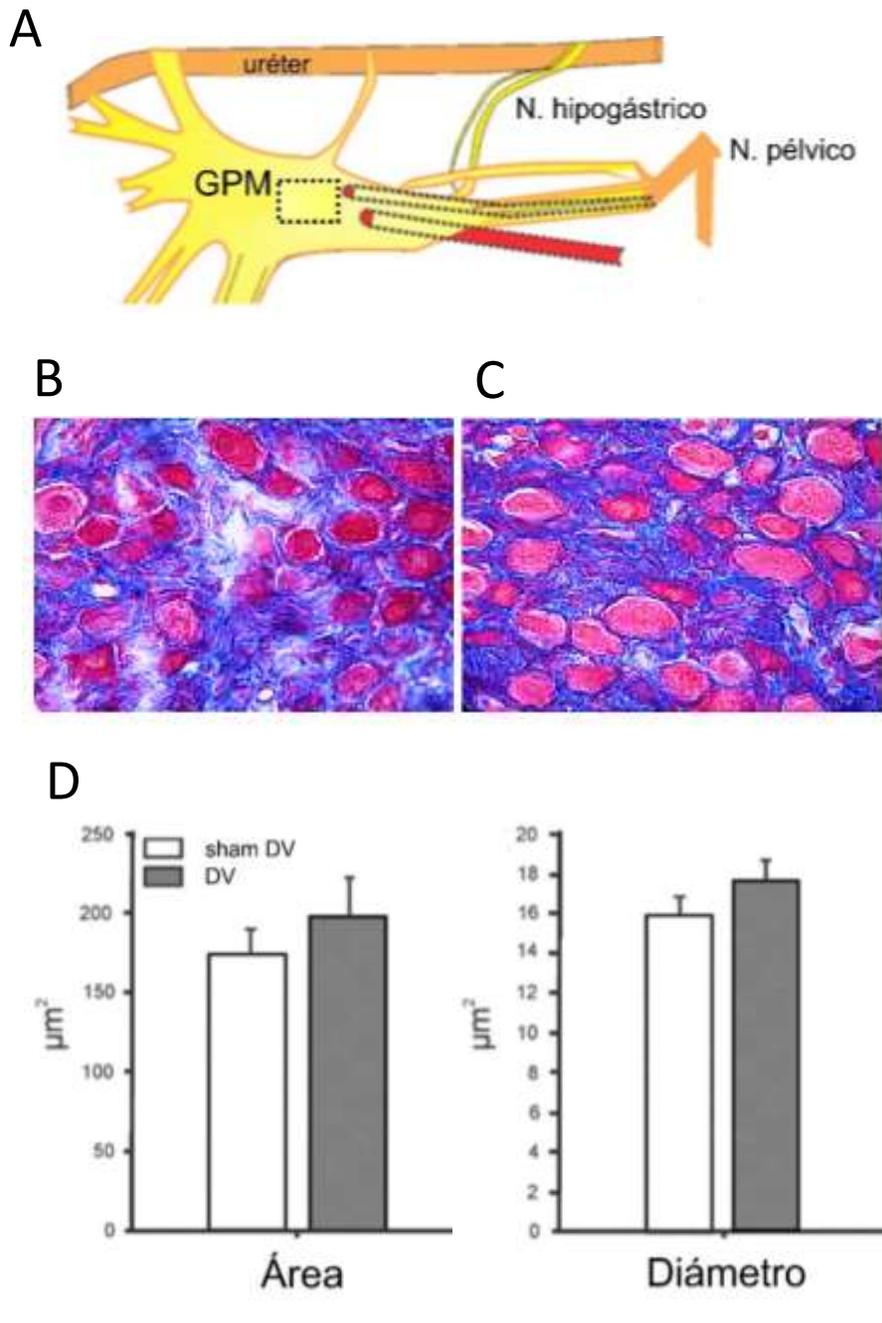


Figura 21. Neuronas del ganglio pélvico mayor (GPM) de la rata hembra. El dibujo representa la ubicación del GPM y el recuadro es el sitio donde fueron tomadas las microfotografías que se muestran en B y en C (B, neuronas tomadas de un animal SH DV y C, de un animal con DV. Tinción con H&E). Las gráficas indican el área y el diámetro de 20 neuronas de animales SH DV y con DV (D). Los valores indican el promedio \pm error estándar. Valores analizados con prueba *t* de student, $p > 0.05$.

7.3 Discusión del experimento 1

El parto es considerado un factor de riesgo importante para la aparición de disfunciones del piso pélvico en la mujer (Rortveit y cols. 2003). Para probar el efecto del parto vaginal sobre el aparato urogenital y su inervación, se ha propuesto el modelo animal de DV en ratas (Lin y cols. 1998).

Se ha mostrado que la DV induce hipoxia a los órganos del aparato urogenital (Damaser y cols. 2005), y daño anatómico y funcional de la uretra (Cannon y cols. 2002, Jiang y cols. 2009). El presente experimento agrega información de las regiones del AUG y los nervios que son distendidas durante la DV, y el efecto de la DV sobre la retención urinaria y capas vesicales.

Durante la DV, el globo (parte inflada del catéter Foley) no permaneció completamente en la cavidad pélvica por lo que también distendió a la vagina distal y por lo que fue necesario suturar el catéter Foley con la piel circundante de la entrada vaginal para evitar que el globo fuera expulsado. Por ello, el globo comprimió a algunos órganos del área pélvica contra el hueso pélvico, estos incluyeron a la pared ventral de la vagina pélvica, la uretra pélvica, la musculatura estriada pélvica, y los vasos y nervios. También el globo distendió el AUG perineal que incluye a la región distal de la vagina y uretra, y los vasos y nervios adyacentes.

La lesión mecánica que produce la DV en la uretra pélvica y al AUG distal explicaría la desorganización, el adelgazamiento y la abolición de la actividad del EEU (Cannon y cols. 2002, Pan y cols. 2007), así como, la hipoxia e isquemia de la vagina y la uretra (Damaser y cols. 2005), y el decremento del umbral de presión que induce goteo (leak point pressure, LPP) (Lin y cols. 1998, Sievert y cols. 2001, Kamo y cols. 2006), lo que sugiere que la DV induce incompetencia del cerrado uretral.

La disfunción uretral inducida por la DV puede resultar no solo por la lesión del EEU sino también puede ser resultado de la lesión de la musculatura lisa, tejido conectivo y epitelial de la uretra y/o lesión de su inervación, la RMPLS, ya que se ha demostrado que estas estructuras contribuyen a la continencia urinaria (Jiang y cols. 2011).

La DV distendió a la vagina distal y a nervios somáticos como el NDC y la RMPLS. Estos nervios fueron elongados en alrededor del 50%, mayor a lo reportado en un modelo de simulación por computadora del estiramiento del nervio pudiendo durante la segunda etapa del parto en mujeres (Lien y cols. 2005). Sin embargo, una diferencia entre nuestro estudio y el del

modelo computacional es que en el modelo, el punto de medición del nervio pudiendo para medir su estiramiento fue más proximal al nuestro, al nivel de la espina isquial, y se ha mostrado que entre más proximal es la medición, el estiramiento de los nervios es menor (Lien y cols. 2005).

Otro estudio mostró que un 74% del estiramiento de la rama motora sólo abole temporalmente la actividad del EEU, la cual retornó después de 30 minutos (Sajadi y cols. 2012). Sin embargo, el estiramiento se realizó en el canal de Alcock, en donde el nervio aún no se ha ramificado. Contrario a esto, la DV no sólo estira a los nervios previo a su ramificación sino que también puede estirar a sus ramas delgadas antes de inervar a sus órganos blanco, las cuales pueden lesionarse fácilmente, junto con las uniones neuromusculares.

Encontramos también que la DV disminuyó la actividad electroneurográfica del NDC inducida por la estimulación mecánica de la vaina clitoral. Este decremento sugiere que el estiramiento de este nervio, de alrededor del 50%, es suficiente para inducir disfunción axonal y quizás rompimiento de algunas de sus fibras en la parte distal de su trayecto y/o la separación de las terminales nerviosas de los receptores sensoriales que se encuentran en la vaina clitoral. Sin embargo, son necesarios estudios histológicos y electrofisiológicos para conocer el tipo y localización de la lesión a nivel celular y molecular. En un estudio previo, se ha mostrado que la lesión nerviosa por estiramiento decrementa la cantidad de microtubulos y de la proteína tau, elementos importantes en la función axonal (Kikukawa y cols. 2003).

El estiramiento del NDC y de la RMPLS inducido por la DV puede denervar al clítoris y al EEU, respectivamente, y eso podría ser el causal de la comorbilidad de disfunciones sexuales y urinarias en mujeres. Apoyando estos causales, en estudios preclínicos se ha mostrado que la lesión quirúrgica del NDC induce incontinencia urinaria coital (Cruz y cols. 2016) y que la lesión de la rama motora induce signos de incontinencia urinaria en ratas (Juárez y cols. 2012).

Observamos retención urinaria y sobredistensión vesical inmediato a la DV, presumiblemente como un efecto indirecto de la oclusión de la uretra pélvica debido a su compresión contra el hueso pélvico, evitando que el animal expulsara orina durante cuatro horas. Esto podría explicar los hematomas de la vejiga urinaria, y el adelgazamiento de las capas vesicales: epitelio y detrusor. Estas lesiones, aunadas al estiramiento de los nervios vesicales podrían resultar en disfunción vesical sensorial y motora. Si los canales y receptores sensoriales

como los canales TRP (receptores de potencial transitorio, siglas en inglés) y los receptores purinérgicos P2X₁₋₇ localizados en el epitelio y detrusor (Kanai y cols. 2011, Merrill y cols. 2016) disminuyeran, afectaría la señalización del llenado vesical e induciría inmediato a la DV retención urinaria. Por el contrario, una sobreexpresión de estos receptores, a largo plazo, puede inducir signos conductuales de vejiga hiperactiva, como frecuencia urinaria.

En ratas, la retención urinaria y la sobredistensión vesical inducen lesión a nervios motores vesicales, vejiga urinaria hipoactiva y decremento en la inervación adrenérgica y colinérgica de la vejiga urinaria ha sido observado posterior a una retención urinaria inducida y a una sobredistensión vesical en ratas (Tammela y cols. 1990, Lasanen y cols. 1992).

Aunque no se sabe si la mujer sufre de cambios neuroanatómicos en la vejiga urinaria posterior al parto, es eso posible ya que la retención urinaria es una condición prevalente inmediato al parto distócico, cuyos factores de riesgo incluyen la analgesia epidural, la episiotomía y la macrosomía fetal (peso mayor a 3.5 kg) (Kekre y cols. 2011, Mulder y cols. 2014, Mulder y cols. 2016). De hecho, la analgesia epidural comúnmente usada para evitar el dolor durante el parto causa hipotonía y elimina la sensación normal para expulsar orina (Weil y cols. 1983), lo que ocasiona sobredistensión vesical, que puede dañar al detrusor y consecuentemente inducir dificultades para expulsar orina a largo plazo (Yip y cols. 1998). En casos extremos, puede haber ruptura de la vejiga urinaria durante el parto (Yang 2011), lo cual puede también inducir vejiga hipoactiva. De este modo, la prevalencia de una contracción vesical reducida es más prevalente en mujeres con una historia de retención urinaria que en hombres (Valente y cols. 2014).

El GPM se encuentra adosado en tejido adiposo lateral al cérvix y se ha estimado que contiene alrededor de 5,000 neuronas (Greenwood y cols. 1985). Nuestros resultados sugieren que la DV, en el modelo de la rata nulípara no afecta la morfometría de las neuronas del GPM.

En contraste a nuestro estudio, un reporte previo mostró un decremento en el número de neuronas del GPM en ratas con DV, de 3 a 8 neuronas en el grupo SH DV a 0 a 1 neuronas en el grupo con DV (Lin y cols. 1998). La controversia puede estar relacionada el método usado para obtener el tejido. El estudio previo no da detalles de cómo se analizó ni recolectó el GPM completo, sólo se menciona que el tracto genitourinario fue colectado y analizado. Considerando que el GPM de la rata hembra es delgado y difícil de observar, es posible que los autores no

hayan colectado completamente el GPM, debido a que sólo reportan pocas neuronas en el grupo control (3-8 neuronas) (Lin y cols. 1998).

7.4 Conclusiones del experimento 1

- La DV produce lesiones directas e indirectas a los órganos del aparato urogenital y su inervación en las ratas hembras.
- El daño directo ocurre por la compresión del globo hacia la región pélvica del aparato urogenital y la distensión de su región distal y nervios somáticos como el NDC y RMPLS.
- El daño indirecto es consecuencia de la obstrucción uretral y produce sobredistensión vesical, lesión de la vejiga urinaria y estiramiento de sus nervios.
- La DV no induce lesión del ganglio pélvico mayor ni de sus neuronas.

8. Experimento 2. Efecto de la DV sobre la conducta de micción y la actividad del EEU

8.1 Métodos del experimento 2

Registro de la conducta de micción

Los animales fueron colocados en un sistema de registro para la conducta de micción implementado en el laboratorio de la Dra. Cruz Gómez (Figura 22). Para su habituación, los animales fueron colocados en el sistema 4 días antes del primer registro (pre-DV o SH DV). Las ratas fueron videograbadas por 12 horas, 6 en la fase de oscuridad y 6 horas en la fase de luz, iniciando a las 8:00 am y finalizando a las 8:00 pm. Las grabaciones fueron almacenadas en un grabador de video digital (DVR, siglas en inglés).

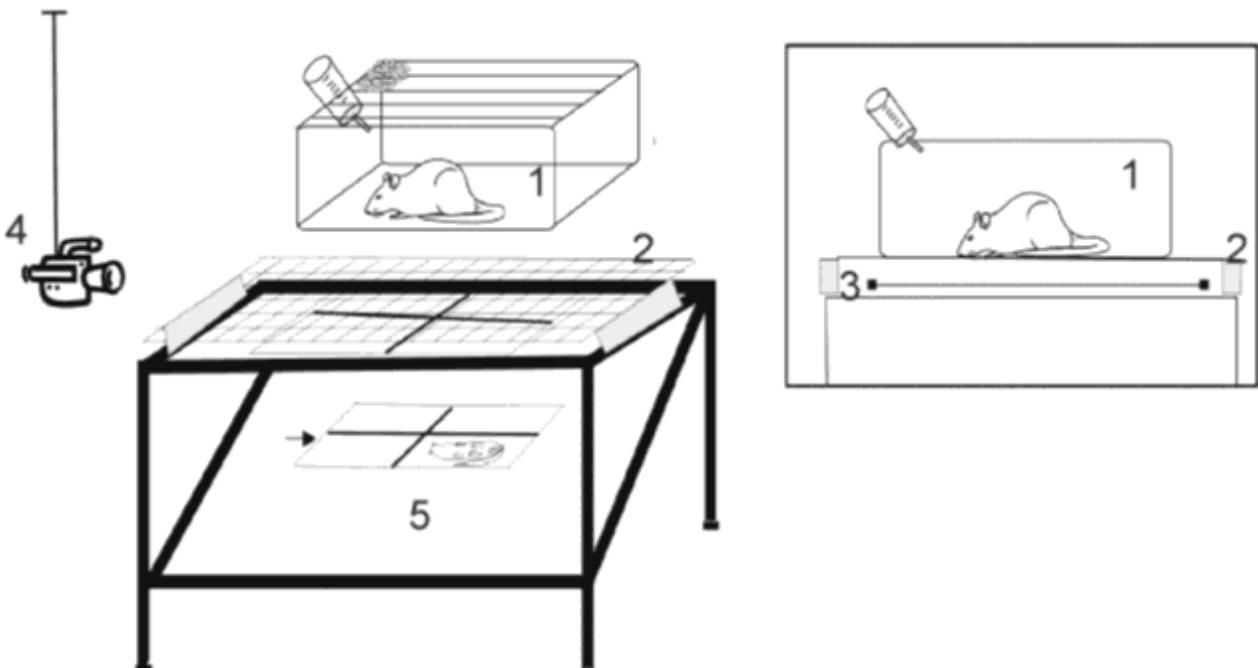


Figura 22. Esquema del sistema de registro de la conducta de micción en ratas. Se muestra sus componentes: caja de acrílico (1), malla de acero (2), colector de orina y heces (3), cámara conectada a un DVR (4) y espejo (5).

Sistema de registro de los parámetros urinarios

El sistema de registro consistió de una caja jumbo para rata, pero sin piso (43 X 53 X 20 cm), colocada sobre una malla de acero inoxidable (rejilla de 1 X 1 cm). Entre éstos dos se colocó un colector de orina (cuadro de madera forrado de plástico, 51 X 41 cm), todo esto fue soportado por una mesa con superficie de vidrio. Frente a la caja se colocó una videocámara conectada a su vez a un sistema de circuito cerrado de grabación, el cual consistió de un DVR, un monitor y de una computadora (Figura 22). Todo este arreglo permitió guardar el registro y observarlo *in vivo* en tiempo real.

Al inicio de cada registro, en ambas fases, se colocó un bebedero con 50 ml de agua y al final se cuantificó su volumen restante, esto para determinar la cantidad de agua ingerida durante las 6 h. Cuando se observó que la hembra expulsó orina, se midió con una jeringa de insulina el volumen. Se anotó en la hoja de registro la hora de expulsión de orina, su volumen, y posteriormente, se revisaron los videos para determinar el tiempo exacto de la micción y con ello el intervalo entre las micciones. Con los datos de la hoja de registro y con los videos se determinaron los siguientes parámetros de la función urinaria:

- Frecuencia de expulsiones: Número total de expulsiones en 6 h (núm. /6 h).
- Intervalo entre las expulsiones: Tiempo entre las expulsiones de orina (min).
- Duración de la expulsión: Tiempo que tarda el flujo de orina durante las expulsiones (s).
- Volumen de orina por expulsión: Cantidad de orina por expulsión (ml)
- Volumen total de orina: Cantidad de orina expulsada en 6 h (ml)

De las grabaciones se determinaron también los signos conductuales de incontinencia urinaria caracterizados por la expulsión de orina en forma de gotas durante las actividades cotidianas de cada animal, por ejemplo, cuando la rata bebe, come, se para en dos patas, husmea, estornuda, etc.

Registro de la actividad refleja del EEU

Los animales fueron anestesiados con uretano (1.2 g/kg, i.p.) y con la ayuda de un microscopio estereoscópico se removió el pubis y se localizó a la uretra. Luego se insertaron las puntas de un par de electrodos de plata en el EEU (diámetro de 0.05 mm) para registrar su actividad eléctrica. Los electrodos fueron conectados a un amplificador de señales eléctricas Grass 7P511 y este a un convertidor de señales analógicas a digitales (Digidata 1440A). Este último estuvo sincronizado con el software AxoScope para la observación, el almacenamiento y el análisis de la actividad eléctrica del EEU.

Usando el programa Clampfit-Axoscope, versión 10.4, se analizó la actividad eléctrica del EEU durante un segundo, identificado justo a la mitad de la duración de la estimulación mecánica (presión con unas pinzas quirúrgicas, Lawton 22-0910) de la vaina clitoral o de la vejiga urinaria (Figura 23).

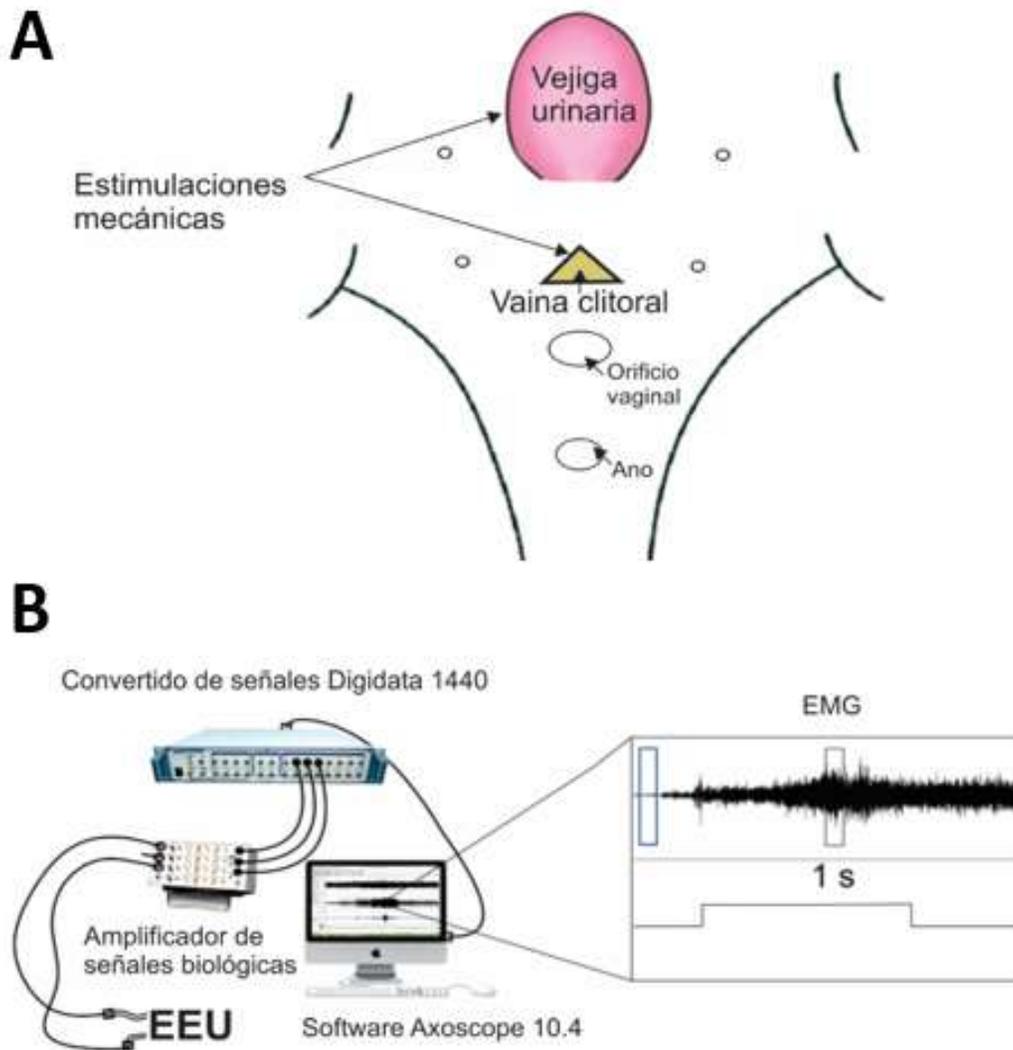


Figura 23. Órganos que inducen actividad refleja del esfínter externo de la uretra (EEU) y componentes del sistema electrofisiológico para el registro del músculo. **A.** Esquema de la piel perineal de la rata hembra en una vista ventral. Se muestran las estructuras estimuladas: la vaina clitoral y la vejiga urinaria. **B.** Sistema de registro electrofisiológico del EEU.

Registro de la actividad electromiográfica del EEU durante los cistometrogramas

Después del registro de la actividad refleja del EEU se localizó y se suturó un catéter en el domo vesical. El catéter se conectó a una bomba de infusión para llenar a la vejiga urinaria con solución salina (5 ml/h) y a un transductor de presión para medir la presión intravesical (Figura 24). Posteriormente, se suturaron la musculatura y piel abdominal.

Los datos de presión fueron registrados y almacenados por el mismo sistema de registro empleado en los EMGs del EEU. Se analizaron tres expulsiones de orina, 20 minutos después del inicio de la infusión. Durante la contracción vesical se analizó la amplitud y frecuencia de 5 s de actividad tónica del EEU, inmediato a la actividad fásica o bursting del EEU. Finalmente, también se analizó la amplitud, frecuencia y duración de tres fases activas de la actividad fásica del EEU, durante la expulsión de orina, con el programa Clampfit-Axoscope, versión 10.4.

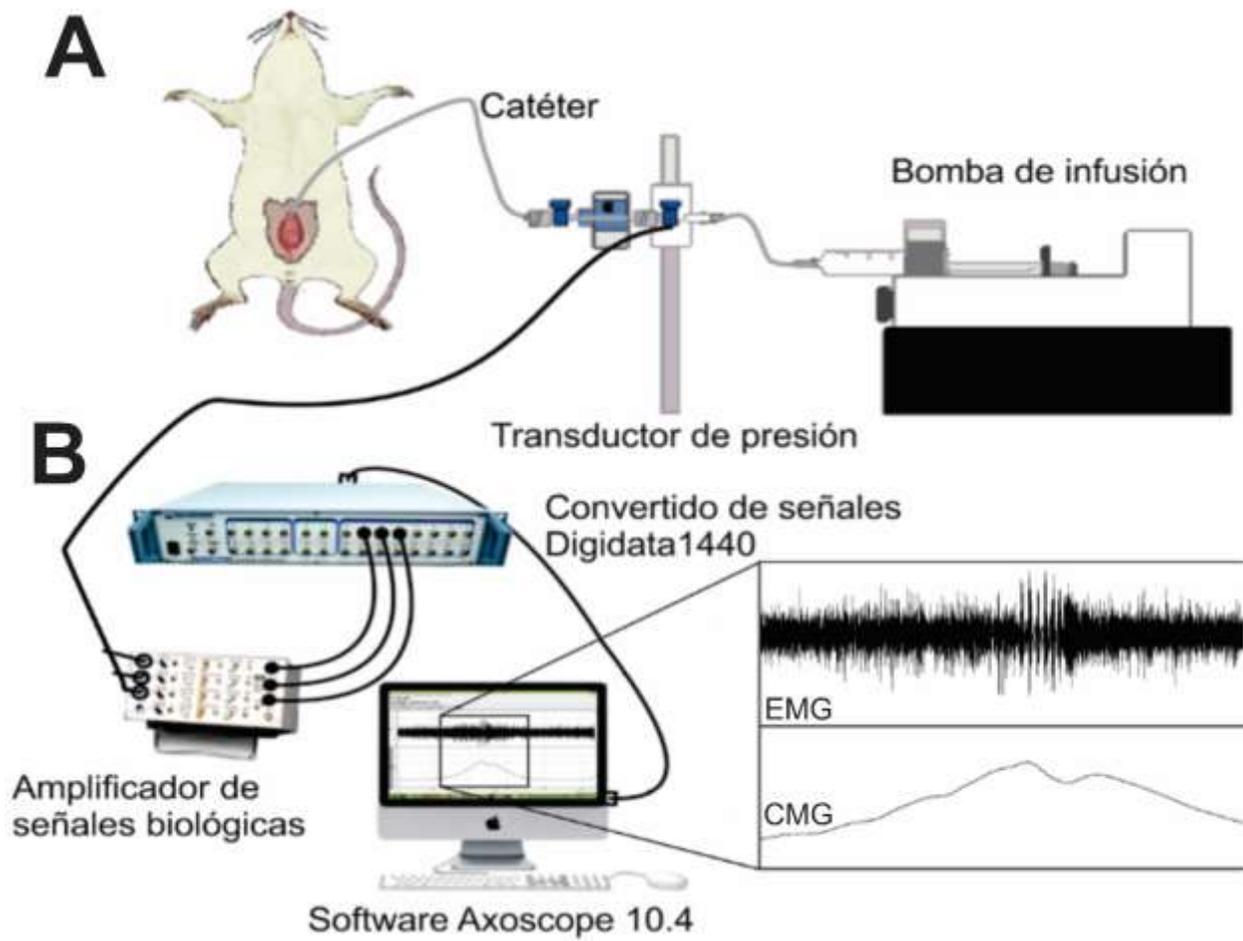


Figura 24. Sistema de registro de la actividad electromiográfica del EEU durante los cistometrogramas. **A.** Componentes para la infusión de solución salina en el domo vesical. **B.** Sistema electrofisiológico para el registro simultáneo de la actividad EMG del EEU y presión intravesical (CMG).

Parámetros cistométricos

Posterior a la infusión salina continua de 20 minutos se analizaron los parámetros cistométricos de tres episodios de expulsión de orina. Los parámetros cistométricos fueron los siguientes: presión umbral (PU, en cmH₂O), intervalo intercontráctil (IIC, en s), amplitud de la contracción vesical (ACV, en cmH₂O), duración de la contracción vesical (DCV, en s), tiempo de expulsión de orina (TE, en s), volumen por expulsión de orina (VE, en ml), orina residual (OR, en ml), capacidad vesical (CV, en ml) y eficiencia vesical (EV, en %) (Figura 25). La OR se obtuvo inmediatamente a la última expulsión de orina, la CV es el resultado de la suma de VE + OR.

La EV fue calculada bajo la siguiente fórmula:

$$EV = \frac{VE}{CV} \times 100$$

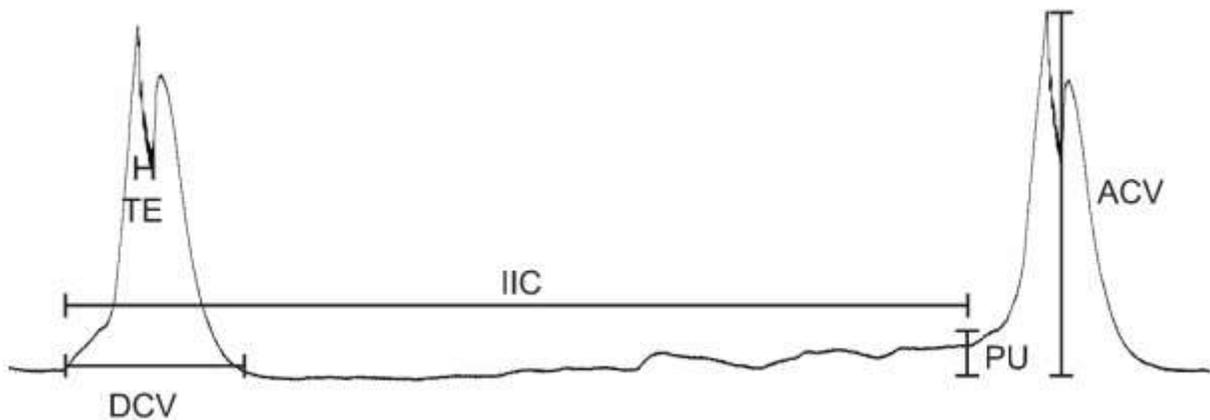


Figura 25. Ejemplo de dos episodios de expulsión de orina durante un cistometrograma. Los parámetros cistométricos que se evaluaron en el presente estudio fueron: TE, tiempo de expulsión de orina. DCV, duración de la contracción vesical. IIC, intervalo intercontráctil. PU, presión umbral. ACV, amplitud de la contracción vesical.

Análisis estadístico

Todos los resultados son presentados con el valor de la media \pm el error estándar. Los análisis estadísticos y las gráficas se realizaron con los programas Sigma Plot y Graphpad Prism 5. En el experimento 2 con una ANOVA de una o dos vías se compararon las medias de los parámetros urinarios, electrofisiológicos y cistométricos entre el grupo DV con el grupo SH DV. La prueba post-hoc de Tukey fue usada para comparar grupos individuales. El valor de significancia para los análisis estadísticos fue de $p < 0.05$.

8.2 Resultados del experimento 2

Conducta de expulsión de orina de la rata hembra intacta

Se encontró que la rata hembra presentó una conducta estereotipada de expulsión de orina (Figura 26). Para ello, la rata dejó de realizar sus actividades cotidianas como comer, beber, dormir, etc., se dirigió hacia la orilla de la caja, colocó su tren posterior sobre la pared de la caja y expulsó orina en un flujo continuo. El 100% de las expulsiones de orina fueron relacionadas con esta conducta estereotipada y ocurrieron en la orilla de la caja, principalmente en las esquinas.

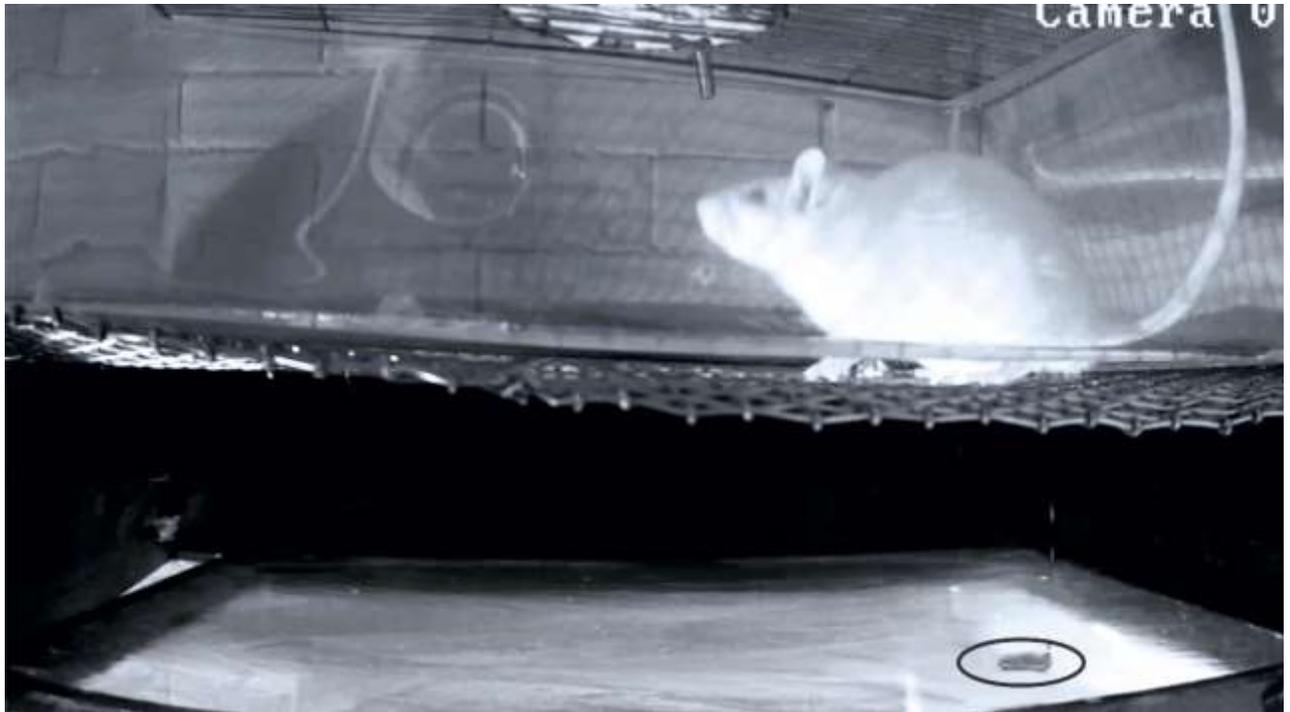


Figura 26. Fotografía de la conducta estereotipada de micción de la rata hembra. Note la orina delimitada con el óvalo color negro en el colector de plástico.

Los valores de los parámetros urinarios variaron durante el ciclo oscuridad-luz de la rata hembra intacta. El número de expulsiones de orina con la conducta estereotipada (oscuridad, 9.5 ± 0.8 expulsiones/6 h vs luz, 4.5 ± 0.3 expulsiones/6 h) y el volumen total de orina (oscuridad, 4.8 ± 0.6 ml vs luz, 3.4 ± 0.3 ml) fue significativamente mayor en la fase de oscuridad que la de luz (*t* pareada, $p < 0.001$). El intervalo entre las expulsiones de orina (luz, 85 ± 9 min vs oscuridad, 39 ± 3 min, *t* pareada, $p = 0.0048$), el volumen de orina por expulsión (luz, 0.7 ± 0.05 ml vs oscuridad, 0.5 ± 0.03 ml, *t* pareada, $p = 0.005$) y la duración de la expulsión (luz, 3.6 ± 0.1 s vs oscuridad, 2.9 ± 0.05 s, *t* pareada, $p < 0.001$) fue mayor en la fase de luz que en la de oscuridad.

Efectos de la DV sobre la conducta de micción

Los días 3 a 5 post-DV, el 100% de los animales presentan goteo de orina sin la conducta estereotipada de expulsión, los cuales fueron considerados signos conductuales de incontinencia urinaria. El goteo no se presentó previo a la DV o en los animales SH DV, en ningún día postcirugía (Figura 27). Este goteo fue asociado a conductas que implicaron esfuerzo, como cuando las ratas se pararon en dos patas para alcanzar el alimento, el bebedero o para husmear, y durante el estornudo, el rascado, y la marcha. Se observó que el 50% de los animales con DV gotearon de 1-10 gotas, el 35% de 11-49 y el 15% mayor a 50 gotas, en las 6 horas de la fase de oscuridad.

En la fase de oscuridad, la DV aumentó significativamente el número de gotas en los días 3 a 9 post-DV, y en la fase de luz en los días 3 a 7 vs pre-DV o SH DV (ANOVA de dos vías para mediciones repetidas, $p < 0.001$). En los días 7 a 9 disminuyó a un 75% los animales que expulsaron gotas de orina. El 100% de las ratas dejó de gotear en el día 11 post-DV en la fase de luz y en el día 13 post-DV en la fase de oscuridad.

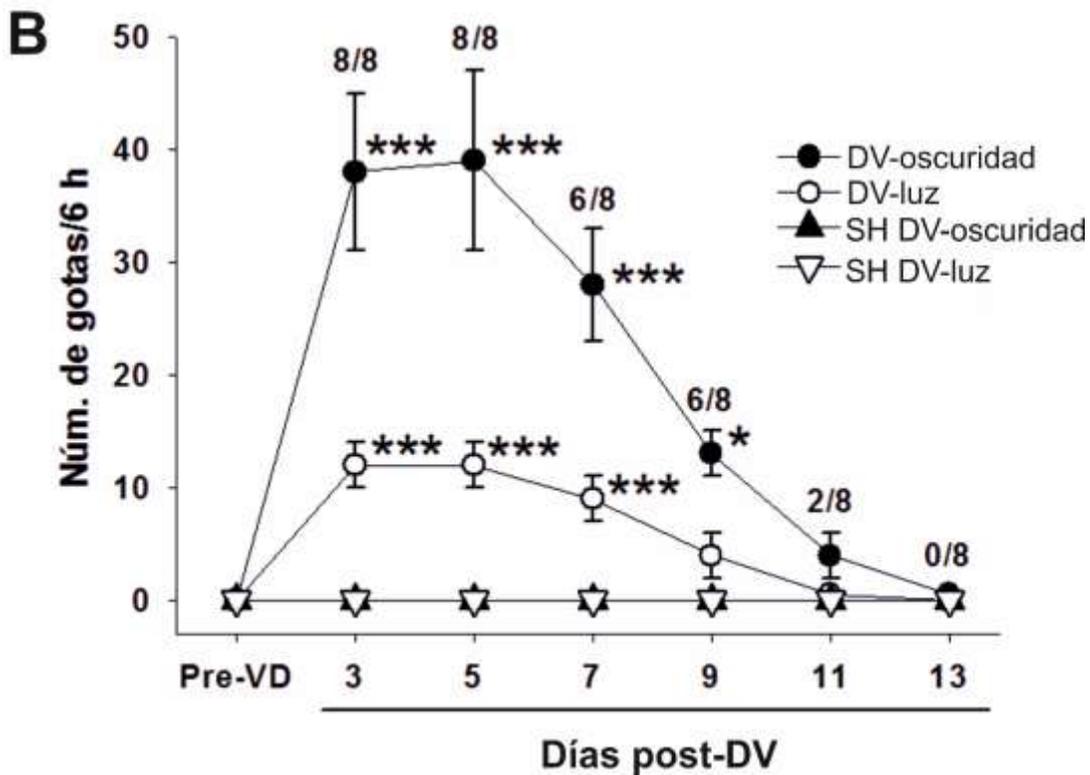
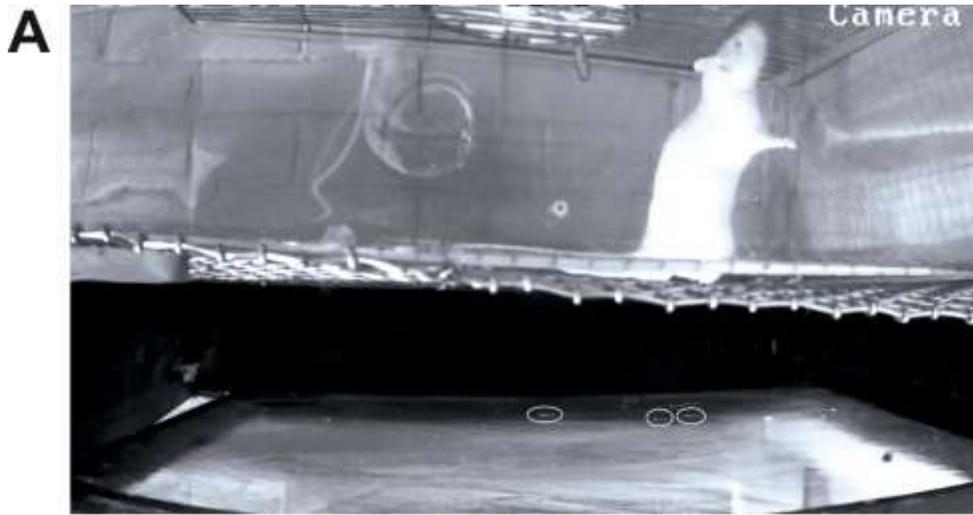


Figura 27. Conducta y gráfica del goteo de orina de la rata hembra con DV. **A.** Fotografía de la rata hembra al día 3 con DV posterior a la expulsión de gotas de orina las cuales fueron marcadas con los óvalos. **B.** Gráfica de la frecuencia del goteo de orina en la fase de oscuridad y de luz previo y en los días, 3, 5, 7, 9, 11 y 13 posteriores a la DV o SH DV. *** indica diferencias significativas entre las ratas DV con las ratas pre-DV y SH DV, en ambas fases del ciclo. ANOVA de dos vías para mediciones repetidas, $p < 0.0001$.

Efectos de la DV sobre los parámetros urinarios

Los parámetros urinarios fueron calculados considerando sólo las expulsiones de orina que coincidían con la conducta estereotipada de micción. En los animales SH DV, los parámetros urinarios no variaron en ningún día de registro (ANOVA de una vía para mediciones repetidas, $p>0.05$).

La DV disminuyó significativamente la frecuencia de expulsiones de orina y aumentó significativamente el intervalo entre las expulsiones de orina en el día 3 en comparación con los animales SH DV en el mismo día de registro, en ambas fases del ciclo luz-oscuridad (ANOVA de dos vías para mediciones repetidas, $p<0.05$; Tablas 2 y 3).

La DV también disminuyó significativamente la duración de la expulsión de orina en los días 3 a 9 en la fase de oscuridad y en los días 5 a 11 en la fase de luz en comparación con los animales SH DV en los mismos días de registro (ANOVA de dos vías para mediciones repetidas, $p<0.05$; Tablas 2 y 3).

No se presentaron diferencias significativas en el volumen por expulsión de orina ni volumen total entre los animales con DV y los animales SH DV, en ninguna de las dos fases del ciclo (ANOVA de dos vías para mediciones repetidas, $p>0.05$).

Tabla 2. Parámetros urinarios de ratas hembras con DV (n=8) o SH DV (n=5) registrados durante 6 h de la fase de oscuridad

Días	Frecuencia de expulsiones (número/6 h)		Intervalo entre expulsiones (min)		Volumen por expulsión (ml)		Volumen total de expulsión (ml)		Duración de la expulsión (s)	
	SH DV	DV	SH DV	DV	SH DV	DV	SH DV	DV	SH DV	DV
Pre	10 ± 0.7	9 ± 0.9	35.4 ± 2	43 ± 4	0.5 ± 0.06	0.49 ± 0.03	4.6 ± 0.6	5.1 ± 0.7	2.9 ± 0.04	3 ± 0.1
3	11.4 ± 0.8	8 ± 0.6**	34.2 ± 4	47.5 ± 4*	0.56 ± 0.04	0.71 ± 0.09	6 ± 0.3	5.9 ± 1	3 ± 0.2	3.6 ± 0.3*
5	9.5 ± 0.7	10.1 ± 1	39.1 ± 3	38 ± 4	0.55 ± 0.06	0.52 ± 0.05	5.9 ± 0.5	5.3 ± 1	2.3 ± 0.2	3.5 ± 0.3*
7	9.8 ± 1	9.4 ± 0.8	38.5 ± 4	40.1 ± 3	0.58 ± 0.06	0.56 ± 0.05	5.7 ± 0.4	5.1 ± 1	2.6 ± 0.2	3.6 ± 0.2*
9	7.8 ± 0.9	9.5 ± 0.9	49.3 ± 6	39.8 ± 4	0.59 ± 0.06	0.59 ± 0.06	4.6 ± 0.5	4.7 ± 0.6	2.5 ± 0.1	3.2 ± 0.1*
11	9.2 ± 1	8.3 ± 0.9	42.4 ± 5	45.6 ± 5	0.60 ± 0.06	0.61 ± 0.07	5.5 ± 0.5	5.5 ± 0.7	2.2 ± 0.1	3.1 ± 0.08
13	9.5 ± 0.6	11.5 ± 0.2	38.5 ± 2	31 ± 0.5	0.49 ± 0.03	0.57 ± 0.12	5 ± 0.2	6.5 ± 1	2.7 ± 0.08	3.1 ± 0.08
p	0.07	0.20	0.72	0.71	0.16	0.13	0.34	0.80	0.6	0.9

Los valores representan el promedio ± error estándar. * y ** indican diferencias significativas en comparación con los animales SH DV en el mismo día de registro. ANOVA de dos vías para mediciones repetidas, p<0.05 y p<0.01, respectivamente.

Tabla 3. Parámetros urinarios de ratas hembras con DV (n=8) o SH DV (n=5) registrados durante 6 h de la fase de luz

Días	Frecuencia de expulsiones (número/6 h)		Intervalo entre expulsiones (min)		Volumen por expulsión (ml)		Volumen total de expulsión (ml)		Duración de la expulsión (s)	
	SH DV	DV	SH DV	DV	SH DV	SH DV	DV	SH DV	DV	SH DV
Pre	4.8 ± 0.4	4.2 ± 0.3	83 ± 12	87.4 ± 7	0.7 ± 0.06	0.71 ± 0.04	3.3 ± 0.3	3.5 ± 0.4	3.7 ± 0.1	3.5 ± 0.2
3	6 ± 0.3	4.1 ± 0.3**	61.2 ± 3	89.1 ± 6**	0.86 ± 0.06	0.71 ± 0.06	5.2 ± 0.4	3.1 ± 0.2	3 ± 0.1	3.5 ± 0.2
5	5.8 ± 0.5	5.5 ± 0.2	65.1 ± 7	66.7 ± 3	0.69 ± 0.07	0.69 ± 0.05	4 ± 0.4	3.8 ± 0.3	2.4 ± 0.3	3.8 ± 0.3*
7	5.1 ± 0.4	3.8 ± 0.4	72.5 ± 6	100.3 ± 9	0.78 ± 0.04	0.76 ± 0.10	4.1 ± 0.3	3.1 ± 0.2	3.1 ± 0.3	4 ± 0.3*
9	5.3 ± 0.3	4.4 ± 0.3	69 ± 4	84.8 ± 7	0.65 ± 0.07	0.74 ± 0.11	3.4 ± 0.3	3.2 ± 0.4	2.2 ± 0.1	3.5 ± 0.2*
11	4.5 ± 0.4	4.8 ± 0.2	84.8 ± 10	75.4 ± 4	0.75 ± 0.07	0.64 ± 0.05	3.3 ± 0.4	3.1 ± 0.3	2.3 ± 0.1	3.5 ± 0.08*
13	4.8 ± 0.3	5 ± 0.1	76 ± 4	72 ± 1	0.77 ± 0.04	0.70 ± 0.08	3.6 ± 0.2	3.5 ± 0.4	3.6 ± 0.2	3.5 ± 0.08
p	0.15	0.19	0.17	0.57	0.67	0.64	0.08	0.9	0.10	0.15

Los valores representan el promedio ± error estándar. * y ** indican diferencias significativas en comparación con los animales SH DV en el mismo día de registro. ANOVA de dos vías para mediciones repetidas, p<0.05 y p<0.01, respectivamente.

Recuperación de la actividad eléctrica del NDC posterior a la DV

En el día 3 post-DV, la frecuencia de la actividad del NDC durante la estimulación del clítoris continuó siendo significativamente menor que la registrada en los animales SH DV (ANOVA de una vía, $p < 0.05$). Sin embargo, en el mismo día, la amplitud del ENG se había recuperado en alrededor del 90% (ANOVA de una vía, $p > 0.05$) (Figura 28).

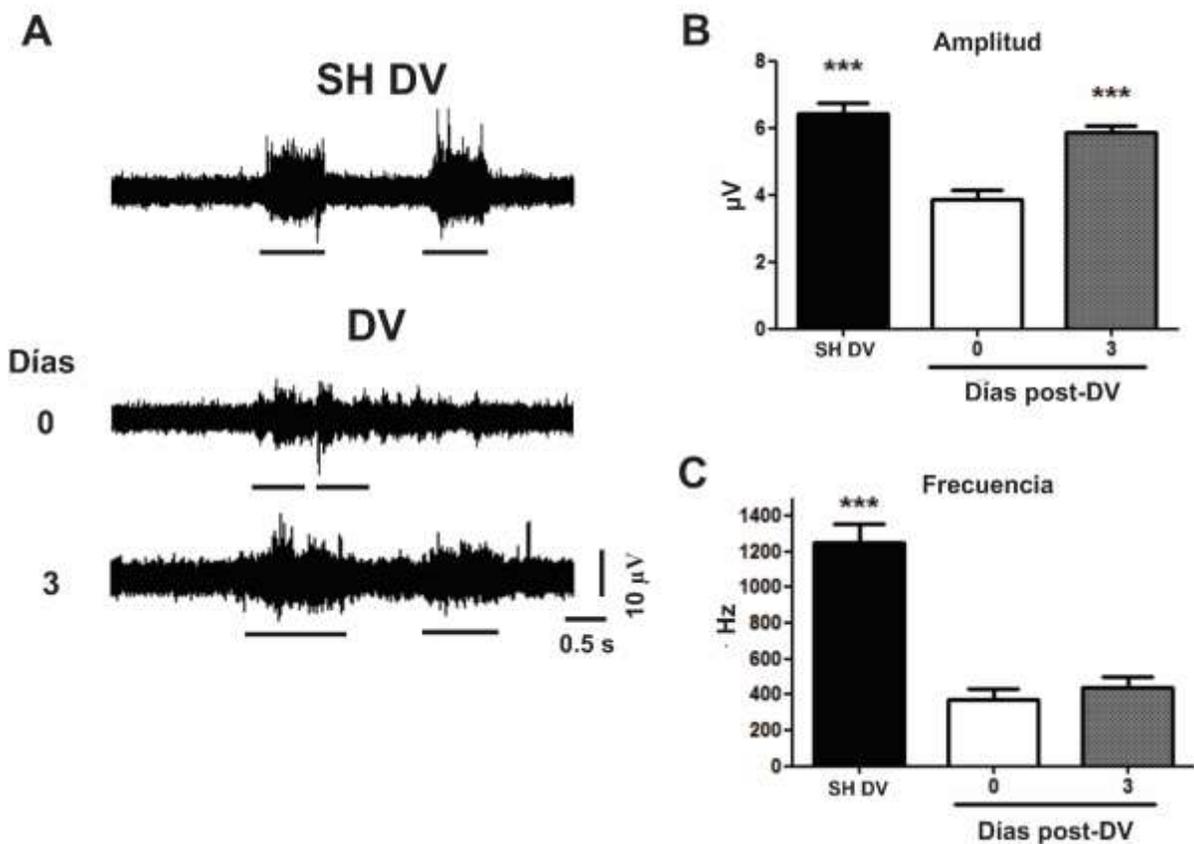


Figura 28. Electroneurogramas representativos del NDC. A. Actividad eléctrica del NDC en los animales SH DV o con DV y gráficas de la amplitud (B) y frecuencia (C) de la actividad del NDC en ambas condiciones. *** indican diferencias significativas en comparación con los animales con DV. ANOVA de una vía, $p < 0.001$.

Actividad eléctrica del esfínter externo de la uretra después de la DV

En los animales SH DV, el EEU respondió a la estimulación de la vaina clitoral y de la vejiga urinaria en todos los días de registro, pre y postcirugía (Figura 29). En general, la actividad del EEU en respuesta a la estimulación vesical (amplitud, $87.4 \pm 11 \mu\text{V}$; frecuencia, $344 \pm 50 \text{ Hz}$) fue significativamente mayor que la respuesta a la estimulación de la vaina clitoral (amplitud, $54.2 \pm 6 \mu\text{V}$; frecuencia, $255 \pm 25 \text{ Hz}$) (*t* pareada, $p < 0.05$).

La respuesta del EEU no varió significativamente post-SH DV (inmediato, 3 - 15 días, ANOVA de una vía, $p > 0.05$), por lo que los animales fueron agrupados ($n=8$) y el promedio de su amplitud en ambas estimulaciones se consideró como el 100% de actividad. En contraste, la DV abolió la respuesta refleja del EEU inmediatamente y al día 3 después de la DV (Figura 29), el músculo no respondió a la estimulación mecánica de la vaina clitoral ni de la vejiga urinaria. Sin embargo, la amplitud y la frecuencia del tono basal del EEU se incrementaron en comparación con los animales SH DV (amplitud, $11.6 \pm 0.6 \mu\text{V}$ vs $3.1 \pm 0.2 \mu\text{V}$; frecuencia, $61.5 \pm 5 \text{ Hz}$ vs $39.8 \pm 3 \text{ Hz}$; respectivamente. ANOVA de una vía, $p < 0.01$; Figura 30).

La actividad refleja del EEU retornó en el día 6 postDV en un 26% de amplitud ($14.5 \pm 5 \mu\text{V}$) durante la estimulación de la vaina clitoral, y en un 16% de amplitud ($14.3 \pm 7 \mu\text{V}$) durante la estimulación vesical, comparado con el 100% de amplitud de respuesta del EEU en los animales SH DV (Figura 29).

Posterior al día 6 post-DV, entre los días 7 a 11, la amplitud de la actividad refleja del EEU fue incrementándose gradualmente hasta alcanzar el 100% de su actividad en el día 12 ($60 \pm 13 \mu\text{V}$) y 15 ($58 \pm 15 \mu\text{V}$) post-DV durante la estimulación de la vaina clitoral y en el día 15 ($82 \pm 10 \mu\text{V}$) durante la estimulación vesical. La recuperación de la frecuencia de la actividad del EEU siguió el mismo patrón que la amplitud (Figura 30).

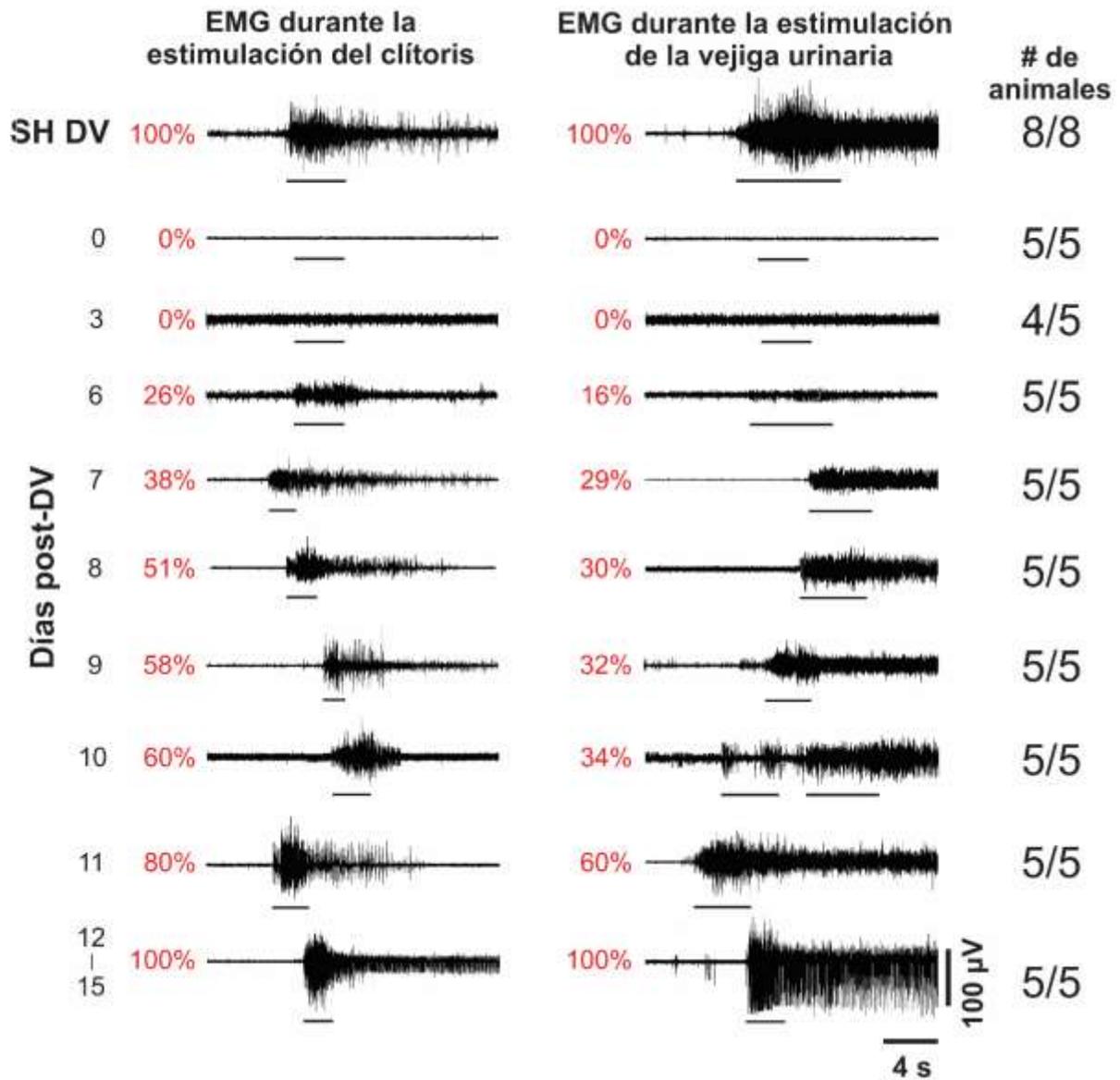


Figura 29. Actividad electromiográfica (EMG) del EEU en respuesta a la estimulación de la vaina clitoral y la vejiga urinaria. Note que la actividad fue abolida inmediatamente y al día 3 posterior a la DV. La actividad retornó gradualmente del día 6 a los días 12 y 15 post-DV.

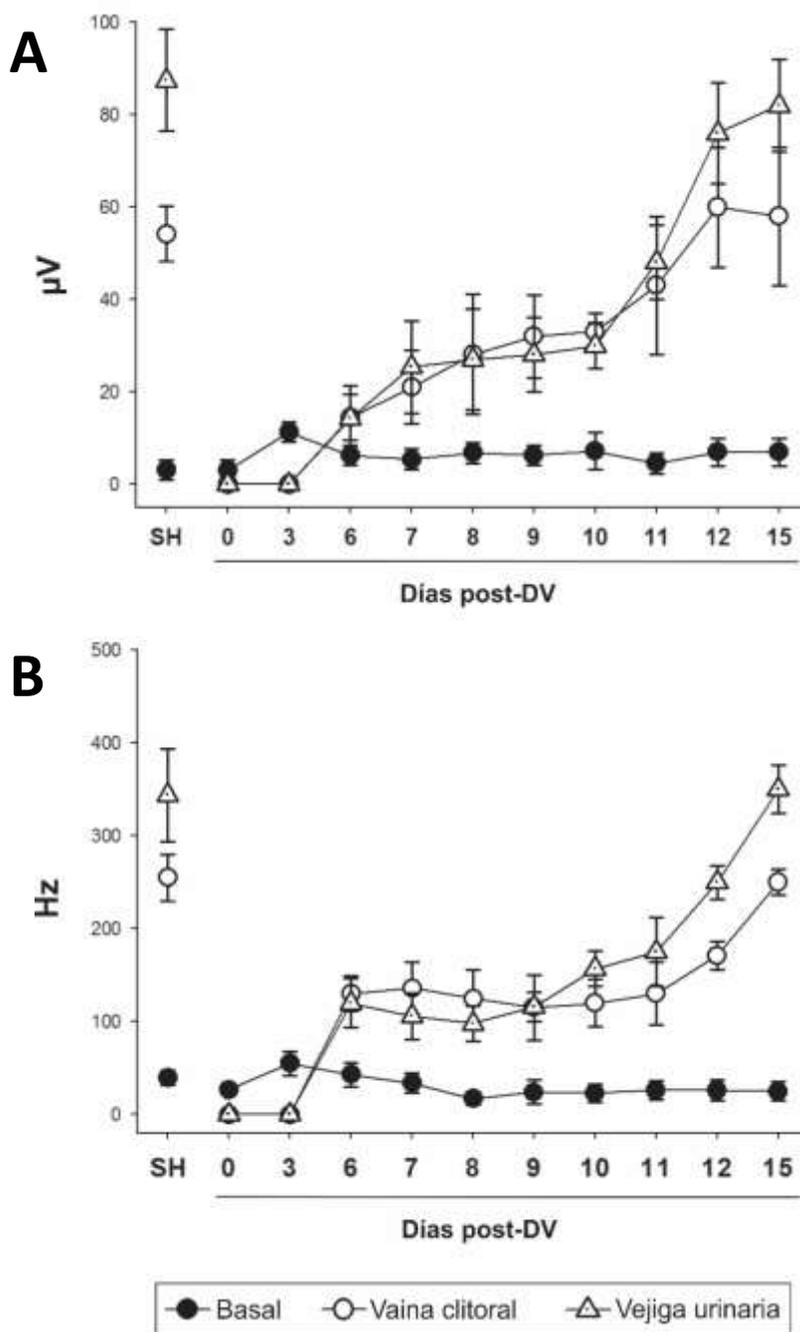


Figura 30. Gráficas de Amplitud (A) y Frecuencia (B) de la actividad eléctrica del EEU en los animales con DV y SH DV. Note que los valores de ambos parámetros de los animales DV regresaron parcialmente a los niveles de los animales SH DV a partir del día 6 post-DV y completamente a partir del día 12 post-DV.

Actividad eléctrica del EEU de ratas DV durante cistometrogramas

En los animales SH DV se encontró que el EEU mostró dos tipos de actividad EMG durante los cistometrogramas, tónica y fásica. La actividad tónica se presentó durante el llenado vesical, y previo y posterior a la expulsión de orina, y la fásica estuvo relacionada al periodo de expulsión de orina (Figura 31). La actividad tónica y fásica del EEU fue abolida inmediatamente después de la DV (Figura 31).

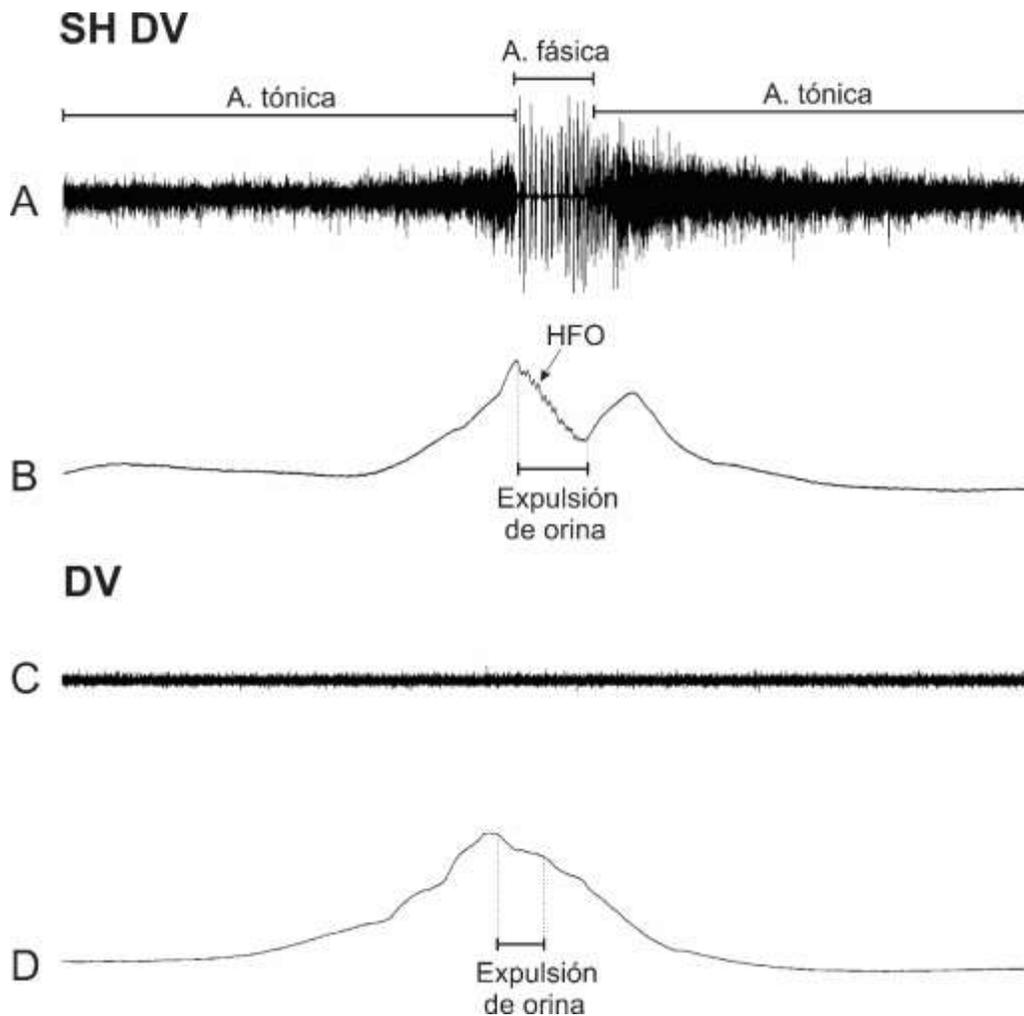


Figura 31. Ejemplos representativos de EMGs del EEU (A y C) y CMGs (B y D) de animales SH DV e inmediato a la DV. Los dos patrones de actividad del EEU de los animales SH DV fueron abolidos inmediato a la DV. Note que durante la expulsión de orina de los animales SH DV se muestra oscilaciones de alta frecuencia (HFO) y que en los animales DV se pierden las HFO y la forma del CMG cambia de dos picos a un solo pico.

Durante los CMGs, la actividad fásica y tónica del EEU aparecieron al día 7 pos-DV (Figura 32 y 33). La amplitud de la actividad tónica del EEU se incrementó gradualmente a partir del día 7 post-DV y ya no fue diferente de lo obtenido en la actividad tónica del EEU de los animales SH DV hasta el día 11 post-DV (Figura 33). En contraste a la amplitud, la frecuencia de la actividad tónica del EEU alcanzó el valor de los animales SH DV desde el día 7 post-DV (Figura 33).

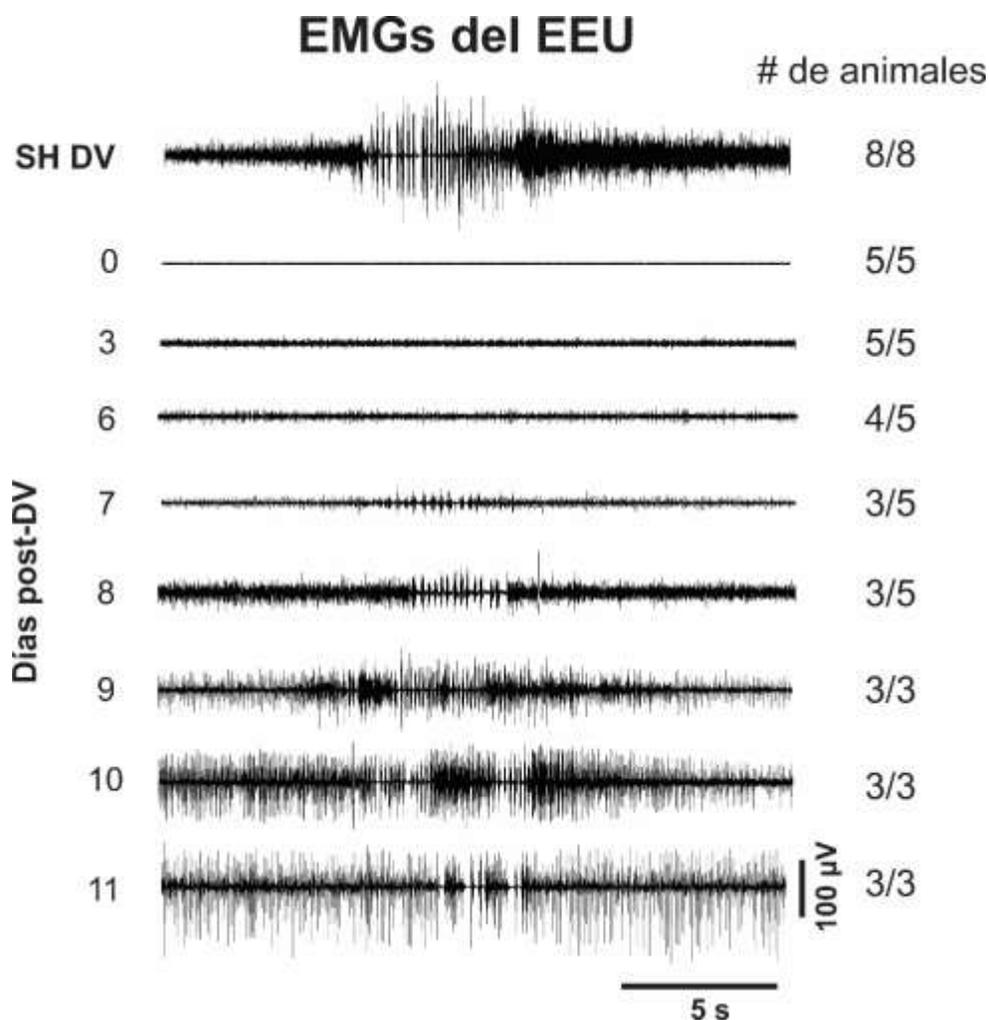


Figura 32. Ejemplos representativos de EMGs del EEU durante los cistometrogrmas de animales SH DV y post-DV. Note que la actividad EMG del EEU apareció al día 7 post-DV y fue incrementando su amplitud gradualmente hasta el día 11 post-DV.

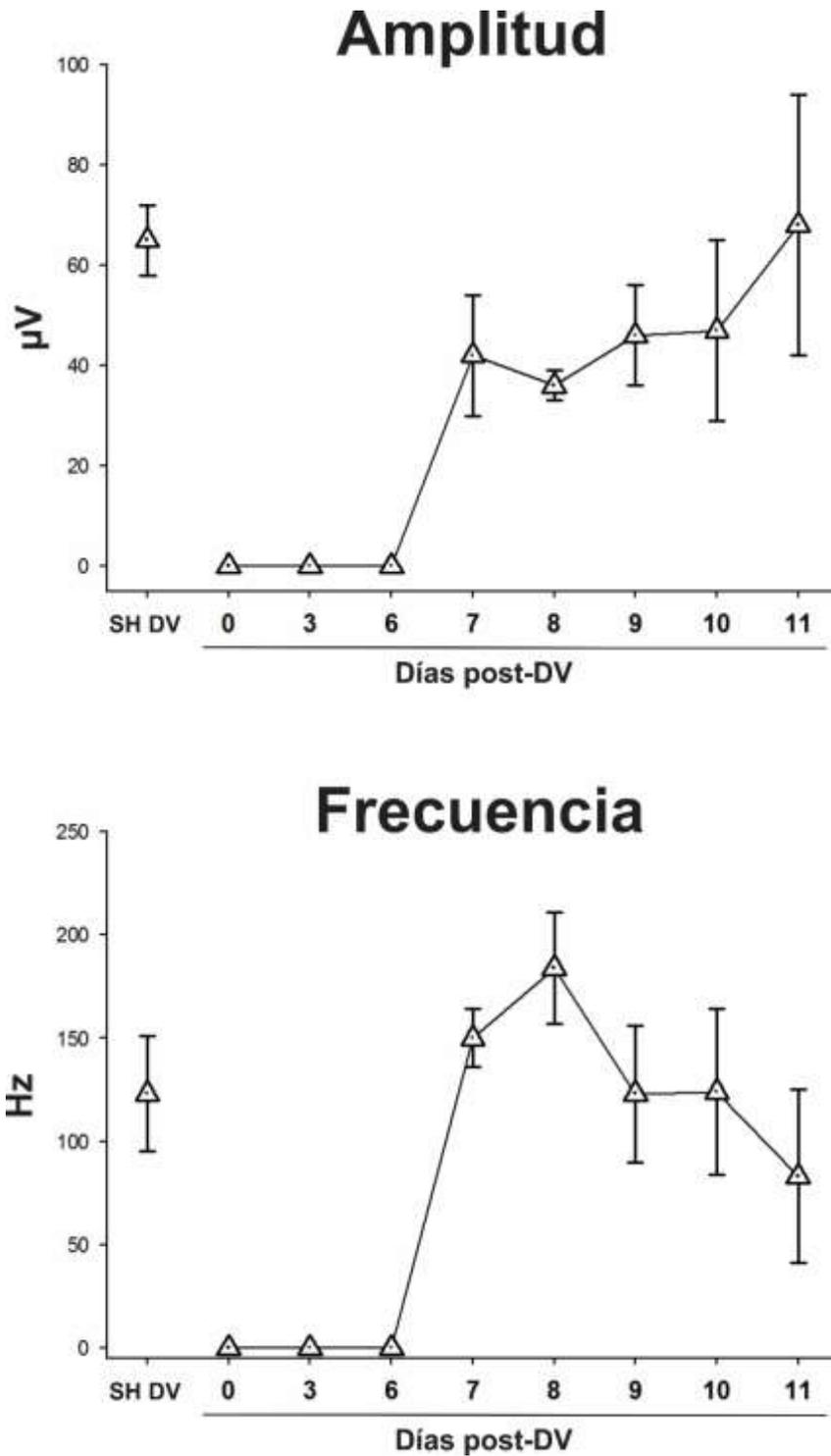


Figura 33. Gráficas de Amplitud y Frecuencia de la actividad tónica del EEU de los animales SH DV y DV. Note que la amplitud incrementó gradualmente a partir del día 7 post-DV y alcanzó el valor de los animales SH DV al día 11 post-DV.

La actividad fásica que aparece durante la expulsión de orina fue también analizada. Se analizaron tres trenes de actividad (el primero, el último y uno intermedio). Los valores de la amplitud, la frecuencia y la duración de los trenes de actividad de los animales SH DV fueron considerados como el 100% de actividad y fueron comparados con los valores de los animales con DV. Durante la expulsión de orina, la amplitud, frecuencia y duración incrementaron gradualmente a partir del día 7 post-DV y alcanzaron los valores de los animales SH DV hasta el día 11 post-DV (Figura 34 y 35).

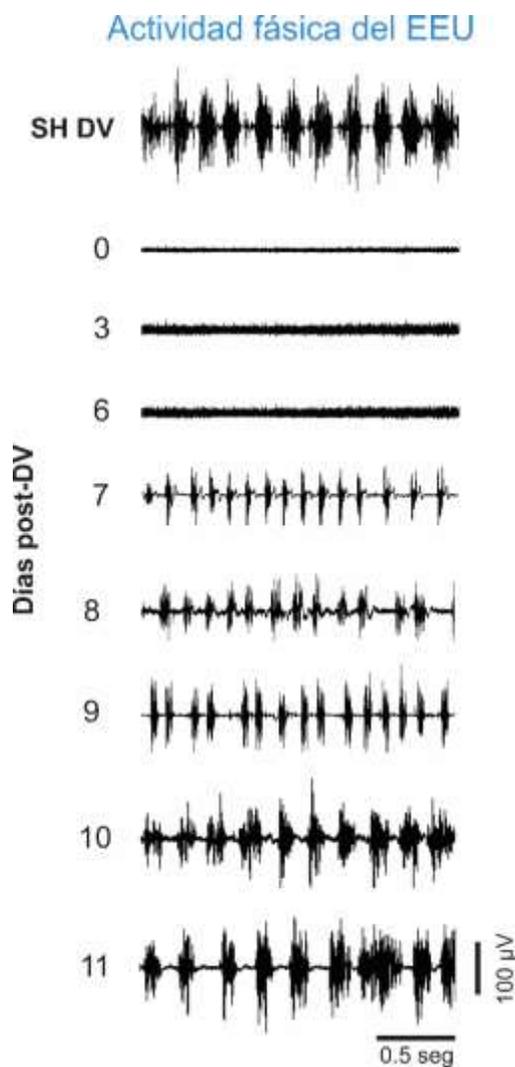


Figura 34. Ejemplos representativos de la actividad fásica del EEU durante la expulsión de orina de animales SH DV y post-DV. Note que la actividad fásica del EEU apareció al día 7 post-DV y fue incrementando su amplitud gradualmente hasta el día 11 post-DV.

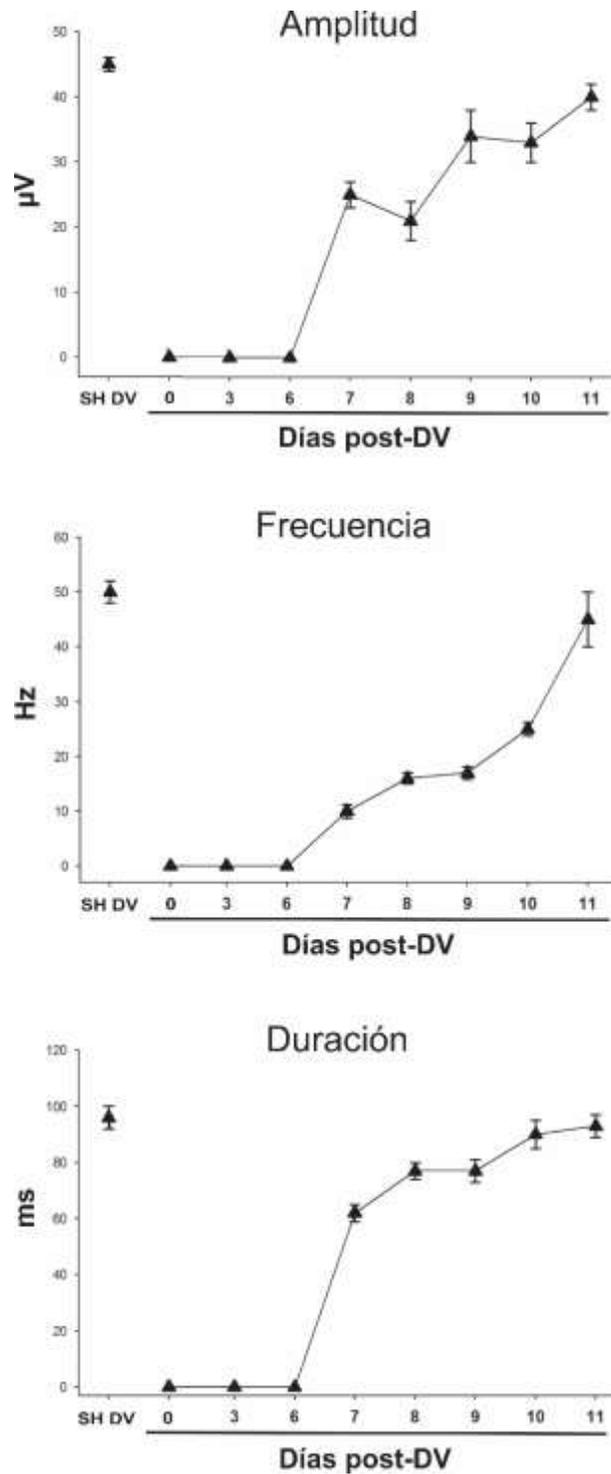


Figura 35. Gráficas de Amplitud, Frecuencia y Duración de tres trenes de actividad fásica del EEU durante la expulsión de orina de los animales SH DV y DV. Note que los tres parámetros incrementaron gradualmente a partir del día 7 post-DV y alcanzaron los valores de los animales SH DV al día 11 post-DV.

Parámetros cistométricos

En los CMGs de los animales SH DV, se observó un trazo continuo de presión intravesical, la cual, fue incrementando gradualmente conforme aumentaba el llenado vesical. Cuando la presión alcanzó un umbral de presión, esta incrementó súbitamente hasta alcanzar un pico máximo de contracción (ACV). Inmediatamente la presión disminuyó y aparecieron las HFO, las cuales estuvieron relacionadas con la expulsión de orina. Finalmente, la presión aumentó nuevamente para luego disminuir bruscamente hasta alcanzar su valor previo a la presión umbral (Figura 31 y 36). En los primeros 6 días post-DV, tanto las HFO como el segundo pico de presión fueron abolidos, y estos reaparecieron a partir del día 7 post-DV (Figura 36).

Inmediato a la DV, disminuyó significativamente la amplitud y duración de la contracción vesical, el tiempo y volumen de expulsión de orina, y la eficiencia vesical, en comparación con los animales SH DV (ANOVA de una vía, $p < 0.05$) (Tabla 4). El volumen por expulsión de orina y la eficiencia vesical se mantuvieron disminuidos significativamente hasta el día 6 post-DV. No se observaron diferencias significativas en el umbral de presión ni en el intervalo intercontráctil entre los animales DV y los animales SH DV (ANOVA de una vía, $p > 0.05$, Tabla 4).

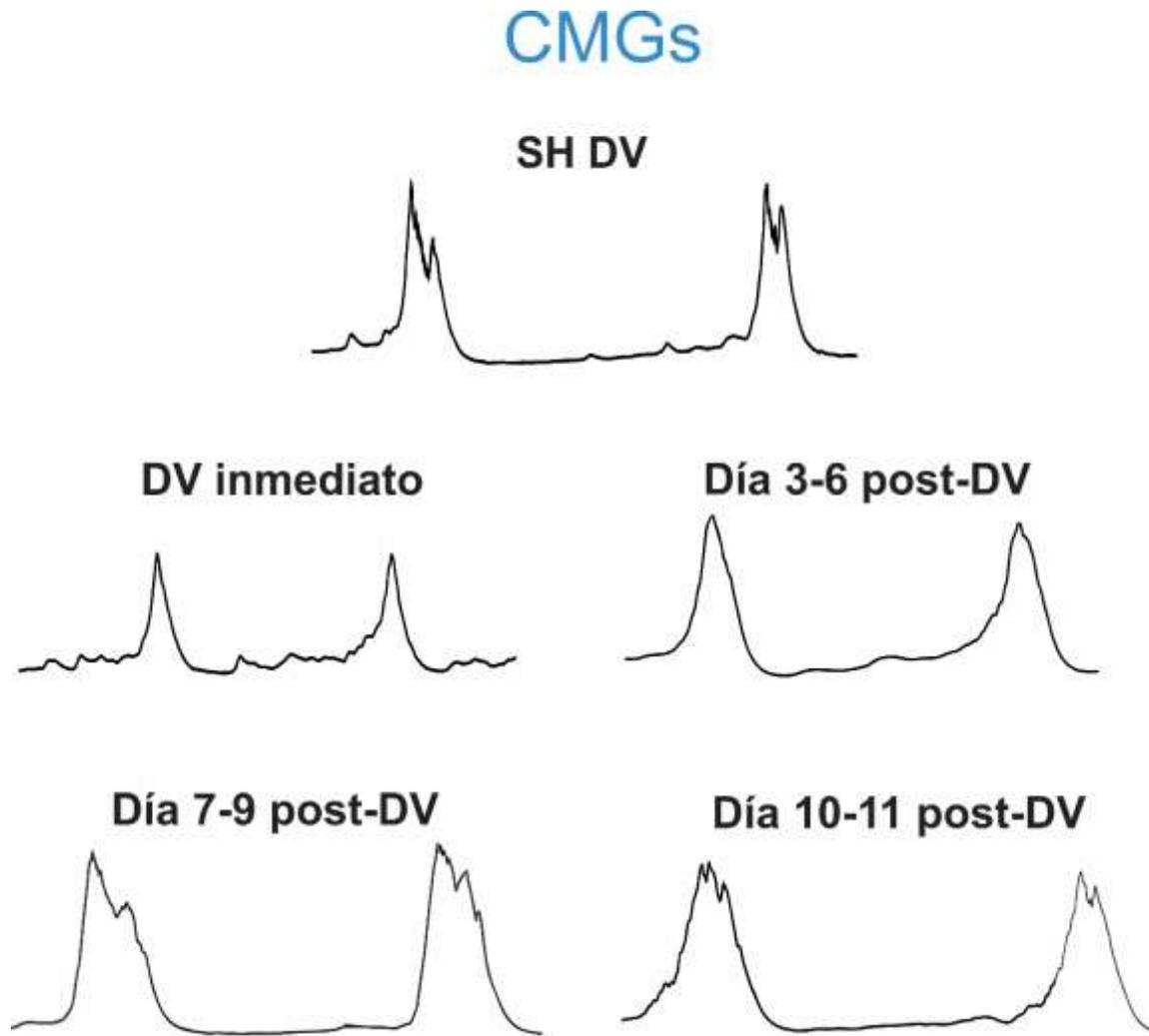


Figura 36. Cistometrogramas representativos de los animales SH DV y DV. Note que la fase de expulsión de orina caracterizada por el descenso súbito de la presión vesical y las HFO fueron abolidos en los primero 6 días post-DV.

Tabla 4. Parámetros cistométricos de ratas hembras con DV (n=34) o SH DV (n=8)

	PU (cmH ₂ O)	IIC (s)	ACV (cmH ₂ O)	DCV (cmH ₂ O)	TE (s)	VE (ml)	CV (ml)	EV (%)
SH DV	4.3 ± 0.3	130 ± 24	20.5 ± 1	20.7 ± 0.6	4.2 ± 0.3	0.40 ± 0.04	0.62 ± 0.02	72 ± 1
DV 0	6.5 ± 0.8	82 ± 1	14.7 ± 1*	12.6 ± 0.8*	1.5 ± 0.05**	0.12 ± 0.01***	0.6 ± 0.05	17 ± 0.5***
DV 3-6	4.5 ± 0.2	118 ± 21	19.2 ± 1	19.5 ± 1.6	3.3 ± 0.4	0.12 ± 0.02***	0.65 ± 0.08	25 ± 4***
DV 7-9	5.0 ± 0.6	161 ± 20	20.7 ± 1	19.7 ± 0.6	4.5 ± 0.4	0.29 ± 0.03	0.51 ± 0.05	64 ± 4
DV 10-11	4.8 ± 0.6	94 ± 4	23.6 ± 1	22 ± 1.5	2.4 ± 0.1	-----	-----	-----
p	0.29	0.08	0.02	0.04	0.001	<0.001	0.38	<0.001

Los valores representan el promedio ± error estándar. * (p<0.05), ** (p<0.01) y *** (p<0.001) indican diferencias significativas en comparación con los valores de los animales SH DV y con DV al día 10-11. ANOVA de una vía. Parámetros cistométricos: PU, presión umbral; IIC, intervalo intercontráctil; ACV, amplitud de la contracción vesical; DCV, duración de la contracción vesical; TE, tiempo de expulsión de orina; VE, volumen por expulsión de orina; CV, capacidad vesical; EV, eficiencia vesical. --- ----- indica que no se obtuvieron los valores.

8.3 Discusión del experimento 2

El parto es considerado un factor importante para la aparición de disfunciones urinarias en la mujer, principalmente de incontinencia urinaria de esfuerzo (Snooks y cols. 1986, Viktrup y cols. 1992). Estudios epidemiológicos han mostrado que la incontinencia urinaria disminuye meses después del parto (Fritel y cols. 2012), sin embargo, el periodo de observación generalmente ha sido corto y estudios longitudinales por más de 12 meses son escasos, por lo que existe controversia si la función urinaria se recupera o empeora con el tiempo (Quiboeuf y cols. 2016).

La DV en ratas da la oportunidad de evaluar la función urinaria a lo largo del tiempo, ya que se ha estimado que alrededor de 15 días de vida en la rata equivale a un año en el ser humano (Sengupta 2013).

Confirmamos que la rata hembra presenta una conducta estereotipada de la micción, similar a lo reportado en machos (Juárez y cols. 2012). Esta conducta sugiere que la rata percibe el llenado vesical y expulsa la orina hasta haber encontrado un lugar adecuado para ello, similar a lo que sucede en humanos. El hallazgo de esta conducta es de gran utilidad ya que cualquier expulsión de orina en el centro de la caja, durante el trayecto o posterior a la expulsión de orina en la orilla de la caja pudo ser considerado como signo de disfunción urinaria. Así, los parámetros urinarios de la rata hembra variaron con respecto al ciclo luz-oscuridad. La frecuencia de expulsiones de orina con la conducta estereotipada es mayor en la fase de oscuridad que la de luz, induciendo que el intervalo entre cada una de ellas sea mayor en esta última fase, similar a lo reportado previamente en ratas y en humanos (Noh y cols. 2011, Juárez y cols. 2012). Estos resultados sugieren que hay una mayor capacidad vesical de almacenamiento de orina cuando las ratas duermen en la fase de luz.

En el presente experimento demostramos que la DV induce signos conductuales de incontinencia urinaria de esfuerzo, tales como goteo de orina cuando el animal se paraba en dos patas. Sin embargo, no hubo cambios significativos en el número de micciones. El goteo de orina estuvo relacionado con la abolición y decremento de la actividad EMG del EEU ya que la recuperación de la continencia urinaria post-DV se relacionó con la recuperación de la actividad refleja del EEU.

Con el sistema de registro conductual utilizado en esta tesis doctoral logramos diferenciar entre las expulsiones de orina con la conducta estereotipada o normal de la micción de las ratas hembra intactas, de las expulsiones de orina sin esta conducta, y que fueron en forma de gotas. Esta conducta de goteo de orina fue considerado como signo conductual de incontinencia urinaria en las ratas con DV.

Estudios previos en animales no anestesiados, encontraron un incremento en la frecuencia de expulsiones de orina en lugares no frecuentes observados en los animales control, una semana posterior a la lesión bilateral de la inervación uretral (Heidkamp y cols. 1998, Kerns y cols. 2000), y este patrón anormal de expulsión de orina fue considerado signo de disfunción urinaria. Sin embargo, los autores de dichos estudios no cuantificaron el número total de marcas ni diferenciaron a las expulsiones normales de la rata de las anormales, para así diferenciar el efecto de la lesión, además sólo registraron un periodo de dos horas en la fase de oscuridad.

En múltiples estudios que emplean una caja metabólica, no se ha observado la expulsión involuntaria de gotas posterior a la DV. Esta diferencia puede deberse a que las gotas observadas en nuestro estudio tienen un volumen de alrededor de 20 μ l y éstas pueden ser indetectables por la caja metabólica o bien pueden adherirse en la pared de su tubo colector (Chun y cols. 1990, Pan y cols. 2009). La expulsión de las gotas estuvo relacionada principalmente a conductas que implicaron esfuerzo como el pararse en dos patas para alcanzar el alimento, el agua o para husmear, y durante el acicalamiento y el estornudo, lo que indica que las ratas con DV presentan signos de incontinencia urinaria de esfuerzo. Por lo que se sugiere que este goteo puede ocasionarse dado que la DV disminuye la resistencia uretral (Cannon y cols. 2002, Pan y cols. 2007) y por lo tanto no es capaz de soportar el aumento de la presión intravesical inducida por la presión externa abdominal, teniendo como resultado el escape de orina por la uretra.

En condiciones normales, el EEU contribuye significativamente a la resistencia uretral (Jiang y cols. 2011) y se contrae cuando hay aumento en la presión intravesical (reflejo guardián) para evitar el escape de orina (Cannon y cols. 2002). Es interesante el hecho de que la actividad de este músculo se encuentre abolida inmediatamente y al día 3 después de la DV durante la estimulación de la vaina clitoral y de la vejiga urinaria, dos estructuras que inducen su actividad (Jiang y cols. 2009, Pastelín y cols. 2012). Estos resultados sugieren que la inactivación de este músculo es el mecanismo que induce el goteo de orina en las ratas con DV.

Por otra parte, el mecanismo que induce la inactivación de este músculo durante la DV es incierto. La DV puede lesionar las vías aferentes que inducen la actividad refleja, la vía eferente, las uniones neuromusculares o al EEU *per se*. En relación a los mecanismos de lesión durante la DV, un estudio previo sugiere que el mecanismo de la disfunción del EEU es por la lesión del EEU y daño de sus uniones neuromusculares, más que por la lesión del nervio pudendo ya que la actividad de este nervio presentó actividad 4 días posteriores a la DV (Jiang y cols. 2009). Sin embargo, se registró el nervio pudendo a nivel del canal del Alcock, región en donde el nervio es más grueso y aún no se ha ramificado. Para descartar una lesión de la RMPLS será necesario registrar el nervio más cercano al EEU, es decir, registrar la rama que va directamente al EEU.

Debido a que en los CMGs no encontramos diferencias significativas en la presión de contracción máxima del detrusor ni su duración, y tampoco en la frecuencia de expulsión de orina en los días de registro posteriores a la DV, se sugiere que los nervios sensoriales y motores vesicales no fueron lesionados por la DV, o su recuperación fue muy rápida. Esto puede deberse a la localización de los nervios sensoriales vesicales en la capa subepitelial (submucosa) de la vejiga urinaria (Andersson 2002) ya que se observó que esta capa no se adelgaza con la DV, situación contraria a la mucosa (epitelio) y al detrusor (resultados del experimento 1).

La recuperación diferencial de la actividad del EEU en respuesta a la estimulación clitoral y vesical a los 6 días, puede indicar que las vías aferentes del reflejo clítoro-EEU (RSNP) se recuperan antes que las aferentes del reflejo vesico-EEU (nervios vesicales). Esto puede deberse a la naturaleza de los nervios aferentes de estos reflejos. El nervio dorsal del clítoris contiene fibras más gruesas (mielínicas A β , ~10 μ m² de grosor) que las aferentes vesicales (mielínicas A δ , ~2 μ m² de grosor), por lo que estas últimas son más susceptibles al daño inducido por DV (Moore y White 1996, Ishii y cols. 2012).

Un hallazgo importante fue la correlación del reestablecimiento de la continencia urinaria en un 50% de los animales en el día 8 postDV con la recuperación del 50% de la actividad refleja del EEU. El restablecimiento al 100% tanto de la función urinaria y del EEU ocurrió en el día 12 post-DV. Esto nos sugiere que en ratas la continencia urinaria depende de la actividad del EEU. La recuperación de la función urinaria fue consistente con los estudios de Pauwels y cols. (2008), ya que ellos encontraron, empleando una prueba de estornudo, que el

goteo desaparece en las ratas con DV a los 14 días. En contraste, nuestros resultados de la recuperación de la actividad refleja del EEU difieren de lo que previamente se había reportado ya que la actividad se recuperó a los 12 días y no a la tercera semana (Jiang y cols. 2009).

La recuperación funcional del EEU y de la conducta urinaria posterior a la DV sugiere que el circuito neuromuscular que controla este músculo requiere un periodo de alrededor de 12 días, es decir, que las posibles lesiones de su control motor, la RMPLS, sus uniones neuromusculares y el músculo *per se* se recuperan en ese periodo de tiempo. Es probable que los factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro participe en la recuperación de dichos procesos (Gill y cols. 2013).

Con respecto a la actividad tónica y fásica del EEU durante los cistometrogramas continuos, éstos han sido reportados previamente (Cruz y Downie 2005, Jiang y cols. 2009). La actividad fásica ha sido correlacionada con una eficiencia vesical de alrededor del 70% en ratas anestesiadas (Cruz y Downie 2005). En nuestro estudio con los animales DV observamos una correlación entre la ausencia de la actividad fásica durante las expulsiones de orina con una disminución de la eficiencia vesical mayor al 60%. Por lo que la ausencia de este patrón de actividad indujo un decremento considerable de la eficiencia vesical en los animales con DV, inmediato al día 6 post-DV.

La abolición y recuperación simultánea tanto de la actividad tónica como la fásica del EEU durante los cistometrogramas post-DV, sugiere que las vías aferentes y eferentes que inducen estos patrones de actividad están anatómicamente y funcionalmente relacionados. A pesar de que aún se desconoce si la información motora de ambos patrones de actividad viaja en los mismos o diferentes fascículos de la RMPLS, sabemos que ambos controles neurales se lesionan durante la DV.

La recuperación del NDC sugiere que este nervio que inerva al clítoris tiene la capacidad intrínseca de regeneración posterior a su lesión. En tal proceso regenerativo se pueden presentar varios cambios moleculares y celulares en el soma de la neurona, en el sitio de lesión y en el órgano blanco. Por ejemplo, se ha mostrado que inmediato a la lesión de un nervio se presentan potenciales de acción antidrómicos los cuales activan factores de transcripción en el soma de la neurona para la síntesis de proteínas estructurales como la tubulina, actina y miosina (Faroni y cols. 2015). Además, a 24 horas de la lesión se presenta una migración de macrófagos, los cuales

contribuyen a la degeneración de la región distal del nervio lesionado, así como una alta proliferación de las células de Schwann, las cuales secretan varias moléculas que asisten en los procesos regenerativos como las moléculas de adhesión celular (CAM, siglas en inglés) y factores neurotróficos como el factor de crecimiento nervioso (NGF, siglas en inglés), BDNF, neurotrofina 3 (NT-3, siglas en inglés), entre otros. Ésto forma un ambiente rico en factores neurotróficos que hacen viable el crecimiento de los axones lesionados (Faroni y cols. 2015).

El conocimiento de los mecanismos de lesión y recuperación funcional de los tejidos lesionados por la DV pueden ser blanco a tratamientos no invasivos como la neuromodulación.

8.4 Conclusiones del experimento 2

- La rata hembra no anestesiada presenta una conducta estereotipada de expulsión de orina, la cual es una herramienta para evaluar la función urinaria y el circuito nervioso que controla la micción.
- La DV induce signos conductuales de incontinencia urinaria de esfuerzo, los cuales están relacionados con la abolición y decremento de la actividad electromiográfica del EEU.
- La recuperación de la continencia urinaria está relacionada con la recuperación de la actividad EMG del EEU.
- La DV no afecta importantemente a los parámetros urinarios y cistométricos, a excepción de la frecuencia urinaria que disminuye en el día 3 postDV, y de la eficiencia vesical que disminuye temporalmente en los primeros 6 días post-DV.
- La actividad fásica del EEU es necesaria para una correcta eficiencia vesical, por lo que su ausencia, disminuye la eficiencia de expulsión de orina en animales anestesiados.

9. Experimento 3. Estimulación eléctrica transcutánea del nervio dorsal del clítoris

9.1 Métodos del experimento 3

Estimulación eléctrica

Inmediato a la DV por 4 horas, se prolongó la anestesia de los animales por una hora con una combinación de Ketamina (60 mg/kg) y Xilazina (7.5 mg/kg) (día 0, 2 y 4 post-DV). Durante la anestesia, se colocaron sobre la vaina clitoral dos electrodos de acero inoxidable (Figura 37). Los electrodos fueron conectados a una unidad de aislamiento de estímulo (Grass SIU5, EUA) y éste a un estimulador de corriente alterna (Grass S44, EUA) (Figura 37).

Se administraron pulsos eléctricos a la vaina clitoral corriente eléctrica pulsada durante una hora con una corriente de 0.88 mA, una frecuencia de 20 Hz y una duración del pulso de 1 ms. Después de la hora de estimulación, los animales fueron trasladados al sistema de registro conductual. En los animales SH EET sólo se colocaron los electrodos sobre la vaina clitoral pero no se administró corriente eléctrica.



Figura 37. Componentes del sistema de estimulación eléctrica de la rata hembra. Note que los electrodos de estimulación se colocaron en la vaina clitoral, adyacente al meato urinario. VC, vaina clitoral; PI, pezón inguinal; OR, orificio rectal.

Análisis estadístico

Todos los resultados son presentados con el valor de la media \pm el error estándar. Los análisis estadísticos y las gráficas se realizaron con los programas Sigma Plot y Graphpad Prism 5. En el experimento 3 con una ANOVA de dos vías se compararon los parámetros urinarios entre el grupo DV, EET y SH EET. La prueba post-hoc de Tukey fue usada para comparar grupos individuales. El valor de significancia para los análisis estadísticos fue de $p < 0.05$.

9.2 Resultados del experimento 3

Efecto de la estimulación eléctrica transcutánea del NDC sobre la conducta de micción

Se encontró que al día 5 post-DV el número de gotas disminuyó significativamente en el grupo con DV + EET (11 ± 4 gotas), en comparación con los animales DV (41 ± 8 gotas) y DV con SH EET (39 ± 5 gotas) (ANOVA de dos vías para mediciones repetidas, $p < 0.05$) (Figura 38).

No se presentaron diferencias significativas en el número de gotas entre el grupo DV con EET y el grupo SH DV en ningún día de registro (ANOVA de dos vías para mediciones repetidas, $p > 0.05$).

El número de gotas de los grupos DV y DV con EET aumentó significativamente en comparación con el grupo SH DV del día 5 al 9 post DV (ANOVA de dos vías para mediciones repetidas, $p < 0.05$) (Figura 38).

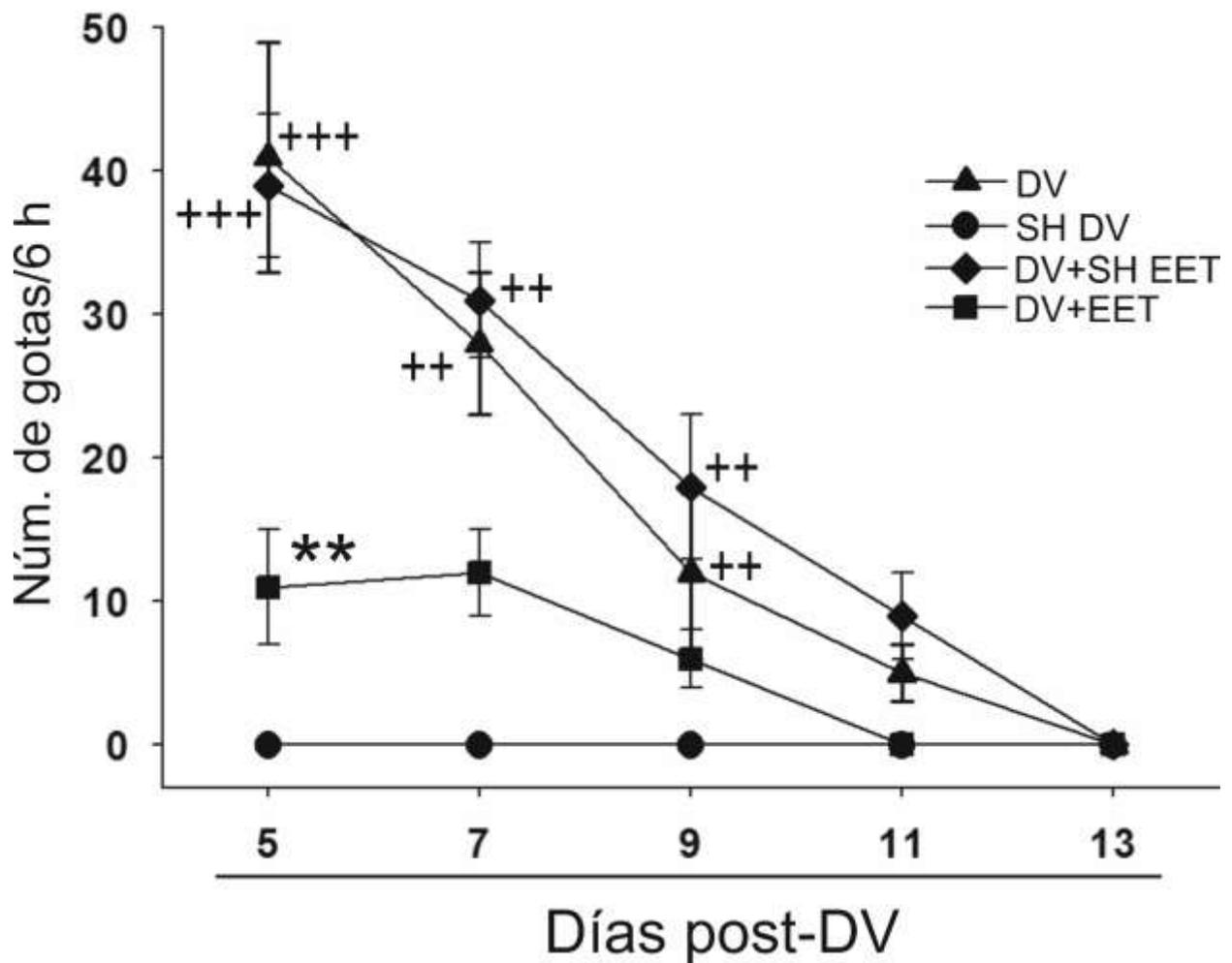


Figura 38. Gráfica de la frecuencia del goteo de orina (6 h en la fase de oscuridad) en animales DV o SH DV con estimulación eléctrica transcutánea del NDC (EET) o estimulación testigo (SH EET). ** indica diferencias significativas con las ratas DV y DV SH EET. +++ indica diferencias significativas con las ratas SH DV. ANOVA de dos vías para mediciones repetidas. $p < 0.0001$.

Efecto de la estimulación eléctrica transcutánea del NDC sobre los parámetros urinarios

No se presentaron diferencias significativas en el número de expulsiones de orina (Figura 39), el intervalo entre expulsiones de orina, ni en el volumen total y por expulsión de orina entre los cuatro grupos experimentales (ANOVA de dos vías para mediciones repetidas, $p > 0.05$) (Tabla 5).

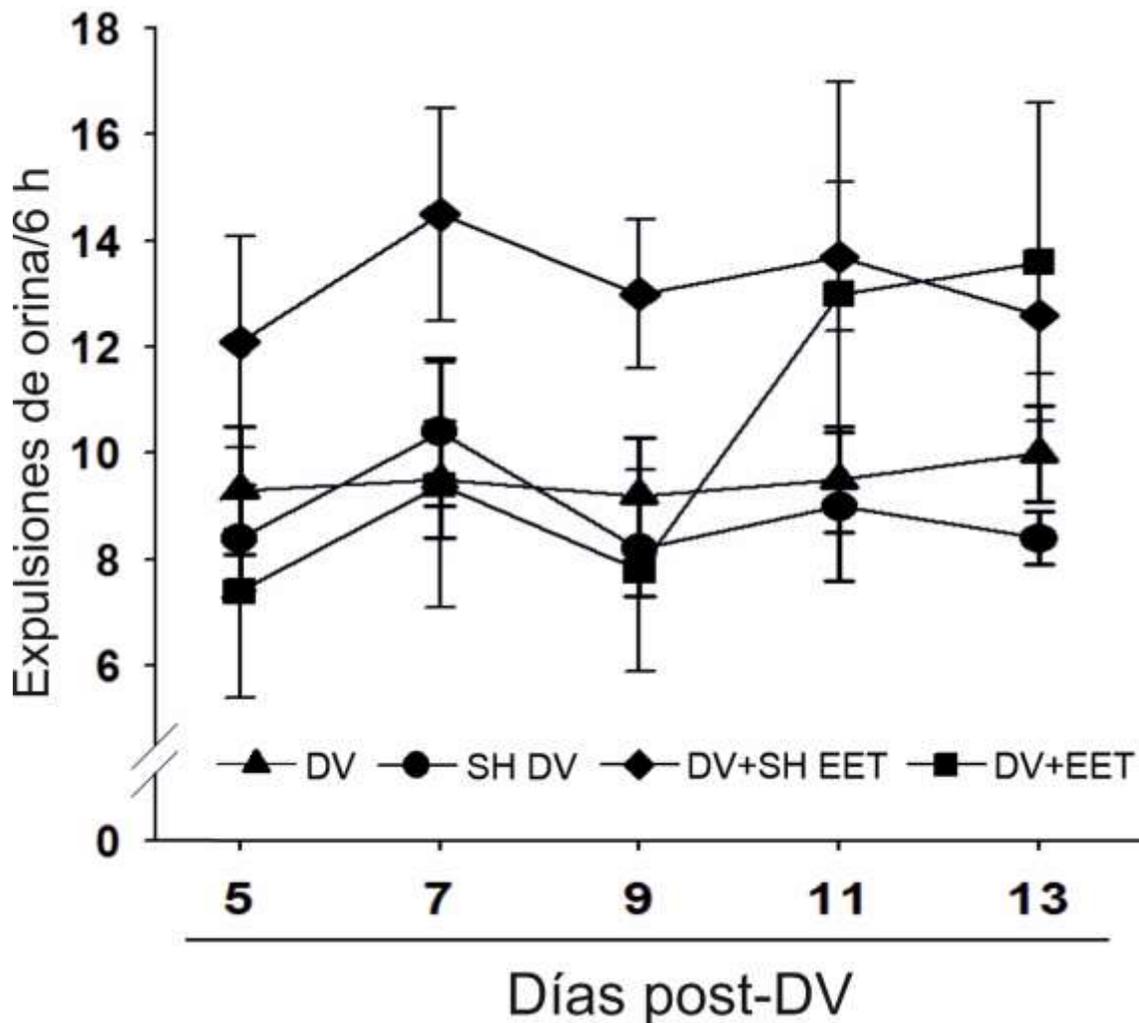


Figura 39. Gráfica de la frecuencia del número de expulsiones de orina con la conducta estereotipada (6 h en la fase de oscuridad) en los animales DV o SH DV con EET o SH EET, en los días 5 al 13 post-DV. ANOVA de dos vías para mediciones repetidas, $p > 0.05$.

Tabla 5. Parámetros urinarios de ratas hembras con DV con SH EET (n = 8) o EET (n=5) registrados durante 6 h de la fase de oscuridad

Días	Intervalo entre expulsiones (min)		Volumen por expulsión (ml)		Volumen total de expulsión (ml)	
	SH EET	EET	SH EET	EET	SH EET	EET
5	50 ± 8	60 ± 7	0.71 ± 0.1	0.75 ± 0.09	5.5 ± 0.5	5.4 ± 1
7	43 ± 3	51 ± 7	0.77 ± 0.1	0.80 ± 0.08	6.4 ± 0.8	5 ± 0.9
9	38 ± 4	43 ± 8	0.69 ± 0.1	0.62 ± 0.04	6.1 ± 0.7	5.9 ± 0.7
11	32 ± 2	39 ± 2	0.63 ± 0.09	0.74 ± 0.06	6.4 ± 0.7	6.7 ± 0.5
13	35 ± 3	39 ± 2	0.57 ± 0.07	0.68 ± 0.1	5.8 ± 0.8	5.5 ± 0.3

Los valores representan el promedio ± error estándar. ANOVA de dos vías para mediciones repetidas, $p > 0.05$.

9.3 Discusión del experimento 3

Estudios clínicos han mostrado que la neuromodulación, a través de activar eléctricamente a vías neurales específicas, ofrece un tratamiento eficaz a las patologías urogenitales como vejiga hiperactiva, disfunciones sexuales e incontinencia urinaria, así como una mejora en la calidad de vida de las mujeres (Bartley y cols. 2013, Banakhar y cols. 2014). Así mismo, en estudios preclínicos se ha mostrado que la estimulación eléctrica directa de nervios lesionados favorece la recuperación tanto del nervio como la de su órgano blanco (Nix y Hopf 1983, Jiang y cols. 2012). Sin embargo, la estimulación eléctrica directa de nervios lesionados no es común en la clínica debido a su escasa practicidad.

Por ello, en este estudio se eligió estimular eléctricamente de manera transcutánea al NDC debido a que se ha reportado que su estimulación activa por vía refleja a las motoneuronas del esfínter externo de la uretra (McKenna y Nadelhaft 1989) y aumenta la irrigación sanguínea al área pélvica (Vachon y cols. 2000). La activación de las motoneuronas del EEU podría incrementar la expresión de factores neurotróficos tal como el BDNF, lo que asistiría en la regeneración de la RMPLS, y cuya expresión, se ha reportado, decrementada posterior a la DV (Jiang y cols. 2012). El decremento en la expresión del BDNF, asociado a la DV, podría retrasar la recuperación del circuito neuromuscular del EEU. En este sentido en esta tesis se evaluó si la EET del NDC favorece la recuperación del circuito neuromuscular del EEU, evidenciado por la reaparición de la continencia urinaria en las ratas con DV. A favor de nuestra hipótesis encontramos que la estimulación transcutánea del NDC facilita la recuperación conductual de la continencia urinaria, debido a que encontramos un menor número de expulsiones de gotas en los días de registro post-DV comparado con los animales sin estimulación o con estimulación testigo. De hecho, en los animales estimulados eléctricamente el goteo fue abolido en el día 11 post-DV, en contraste a los animales sin estimulación en donde el goteo de orina desapareció al día 13 post-DV.

La recuperación conductual de la continencia urinaria en las ratas con EET sugiere que la estimulación favorece la recuperación del circuito neuromuscular del EEU, es decir, favorecería tanto la regeneración de las fibras musculares del EEU, de la RMPLS y de sus uniones neuromusculares. Hacen falta más estudios histológicos y de inmuno para corroborar esta hipótesis. Incluso, será necesario estudios de biología molecular para dilucidar si se

incrementan los factores neurotróficos en las motoneuronas del EEU posterior a la EET del NDC, tal como ocurre con la estimulación eléctrica del nervio pudendo posterior a la DV, o con aplastamiento del nervio pudendo (Jiang y cols. 2012).

La estimulación mecánica de la vaina clitoral en los animales con DV y SH EET no favoreció la recuperación de la continencia urinaria a pesar de que se ha mostrado que esta estimulación activa reflejamente al EEU (Pastelín y cols. 2012), quizás por la adaptación de los receptores sensoriales al estímulo ya que los electrodos permanecen en la piel clitoral sin pasar corriente eléctrica.

La EET del NDC no afectó los parámetros urinarios, tales como la frecuencia urinaria. Esto sugiere que la estimulación no afecta la función vesical de almacenamiento ni expulsión de orina. Contrario a nuestro estudio se ha reportado que durante la estimulación de la rama motora hay un decremento significativo en la frecuencia de la contracción vesical (Jiang y cols. 2012). Sin embargo, no hay estudios a mediano y largo plazo que evalúen la función vesical posterior a la estimulación eléctrica de nervios del AUG.

9.4 Conclusiones del experimento 3

- La EET del NDC disminuye los signos conductuales de incontinencia urinaria en ratas con DV.
- La EET del NDC abole los signos conductuales de incontinencia urinaria al día 11 post-DV.
- La EET del NDC no afecta los parámetros urinarios a mediano plazo.

10. Conclusión general

La DV lesiona la estructura e inervación del AUG a corto plazo, induce signos conductuales de incontinencia urinaria de esfuerzo y abole temporalmente la actividad EMG del EEU. El sistema neuromuscular del EEU y la continencia urinaria se recuperan gradualmente a partir de la primera semana post-DV. La estimulación transcutánea del nervio dorsal del clítoris facilita la recuperación de la continencia urinaria en ratas con DV.

11. Perspectivas

- Se planea registrar la actividad de la RMPLS durante cistometrogramas en su región distal, cercana al EEU en animales SH DV y DV.
- Se recomienda realizar un estudio histológico de los nervios que se estiran durante la DV para conocer la región de lesión y los cambios tisulares que sufren los nervios a lo largo del tiempo.
- Se requiere realizar un estudio histológico más preciso del EEU para conocer cuáles fibras se lesionan durante la DV y si estas se degeneran o regeneran a lo largo del tiempo.
- Se pretende evaluar la conducta de micción de ratas con DV durante mayor tiempo, debido a que hay una tendencia de aumento de la frecuencia de expulsiones de orina en los últimos días de registro.
- Se plantea realizar estudios de Biología Molecular para conocer si la estimulación eléctrica del NDC incrementa la expresión de factores neurotróficos como el BDNF en la motoneuronas del EEU.

12. Referencias

- Abrams, P., Cardozo, L., Fall, M., Griffiths, D., Rosier, P., Ulmsten, U., van Kerrebroeck, P., Victor, A., Wein, A., Society, S.S.-c.o.t.I.C., 2002. The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn.* 21, 167-78.
- Andersson, K.E., 2002. Bladder activation: afferent mechanisms. *Urology* 59, 43-50.
- Al-Majed, A.A., Neumann, C.M., Brushart, T.M., Gordon, T., 2000. Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. *J Neurosci.* 20, 2602-8.
- Banakhar, M., Hassouna, M., 2015. Sacral Neuromodulation for Genitourinary Problems. *Prog Neurol Surg* 29, 192-199.
- Bartley, J., Gilleran, J., Peters, K., 2013. Neuromodulation for overactive bladder. *Nat Rev Urol* 10, 513-521.
- Bekker, M.D., Hogewoning, C.R., Wallner, C., Elzevier, H.W., DeRuiter, M.C., 2012. The somatic and autonomic innervation of the clitoris; preliminary evidence of sexual dysfunction after minimally invasive slings. *J Sex Med.* 9, 1566-78.
- Birder, L., Andersson, K.E., 2013. Urothelial signaling. *Physiol Rev.* 93, 653-80.
- Brushart, T.M., Jari, R., Verge, V., Rohde, C., Gordon, T., 2005. Electrical stimulation restores the specificity of sensory axon regeneration. *Exp Neurol.* 194, 221-9.
- Cannon, T.W., Wojcik, E.M., Ferguson, C.L., Saraga, S., Thomas, C., Damaser, M.S., 2002. Effects of vaginal distension on urethral anatomy and function. *BJU Int.* 90, 403-7.
- Cohn, J.A., Ni, S., Kaufman, M.R., Graves, A.J., Penson, D.F., Dmochowski, R.R., Reynolds, W.S., 2017. Urinary retention and catheter use among U.S. female Medicare beneficiaries: Prevalence and risk factors. *Neurourol Urodyn* 36, 2101-2108.
- Coyne, K.S., Wein, A., Nicholson, S., Kvasz, M., Chen, C.I., Milsom, I., 2014. Economic burden of urgency urinary incontinence in the United States: a systematic review. *J Manag Care Pharm.* 20, 130-40.
- 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, R1307-1318.
- Cruz, Y., Juarez, R., Medel, A., Corona-Quintanilla, D.L., Pacheco, P., Juarez, M., 2016. Coital Urinary Incontinence Induced by Impairment of the Dorsal Nerve of the Clitoris in Rats. *J Urol* 195, 507-514.
- Chun, A.L., Wein, A.J., Harkaway, R., Levin, R.M., 1990. Comparison of urinary bladder function in sexually mature and immature male and female rats. *J Urol* 143, 1267-1271.
- Damaser, M.S., Broxton-King, C., Ferguson, C., Kim, F.J., Kerns, J.M., 2003. Functional and neuroanatomical effects of vaginal distention and pudendal nerve crush in the female rat. *J Urol.* 170, 1027-31.
- Damaser, M.S., Whitbeck, C., Chichester, P., Levin, R.M., 2005. Effect of vaginal distension on blood flow and hypoxia of urogenital organs of the female rat. *J Appl Physiol.* 98, 1884-90.
- Daneshgari, F., Kong, W., Swartz, M., 2008. Complications of mid urethral slings: important outcomes for future clinical trials. *J Urol.* 180, 1890-7.

- DeLancey, J.O., Kearney, R., Chou, Q., Speights, S., Binno, S., 2003. The appearance of levator ani muscle abnormalities in magnetic resonance images after vaginal delivery. *Obstet Gynecol.* 101, 46-53.
- Dietz, H.P., Schierlitz, L., 2005. Pelvic floor trauma in childbirth - myth or reality? *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 45, 3-11.
- Faroni, A., Mobasseri, S.A., Kingham, P.J., Reid, A.J., 2015. Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev* 82-83, 160-167.
- Fowler, C.J., Griffiths, D., de Groat, W.C., 2008. The neural control of micturition. *Nat Rev Neurosci.* 9, 453-66.
- Fritel, X., Ringa, V., Quiboeuf, E., Fauconnier, A., 2012. Female urinary incontinence, from pregnancy to menopause: a review of epidemiological and pathophysiological findings. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 91, 901–910. doi:10.1111/j.1600-0412.2012.01419.x
- Gabella, G., Davis, C., 1998. Distribution of afferent axons in the bladder of rats. *J Neurocytol.* 27, 141-55.
- Gartland, D., Donath, S., MacArthur, C., Brown, S.J., 2012. The onset, recurrence and associated obstetric risk factors for urinary incontinence in the first 18 months after a first birth: an Australian nulliparous cohort study. *BJOG.* 119, 1361-9.
- Geremia, N.M., Gordon, T., Brushart, T.M., Al-Majed, A.A., Verge, V.M., 2007. Electrical stimulation promotes sensory neuron regeneration and growth-associated gene expression. *Exp Neurol.* 205, 347-59.
- Gill, B.C., Balog, B.M., Dissaranan, C., Jiang, H.-H., Steward, J.B., Lin, D.L., Damaser, M.S., 2013. Neurotrophin therapy improves recovery of the neuromuscular continence mechanism following simulated birth injury in rats. *Neurourol. Urodyn.* 32, 82–87. doi:10.1002/nau.22264
- Greenwood, D., Coggeshall, R.E., Hulsebosch, C.E., 1985. Sexual dimorphism in the numbers of neurons in the pelvic ganglia of adult rats. *Brain Res* 340, 160-162.
- Haylen, B.T., de Ridder, D., Freeman, R.M., Swift, S.E., Berghmans, B., Lee, J., Monga, A., Petri, E., Rizk, D.E., Sand, P.K., Schaer, G.N., Association, I.U., Society, I.C., 2010. An International Urogynecological Association (IUGA)/International Continence Society (ICS) joint report on the terminology for female pelvic floor dysfunction. *Neurourol Urodyn.* 29, 4-20.
- Hebel R, Stromberg MW. 1986. The urinary system. In: *Anatomy and embryology of the laboratory rat.* BioMed Verlag.
- Heidkamp, M.C., Leong, F.C., Brubaker, L., Russell, B., 1998. Pudendal denervation affects the structure and function of the striated, urethral sphincter in female rats. *Int. Urogynecol. J. Pelvic Floor Dysfunct.* 9, 88–93.
- Ishii N, Toda K, Kawakami S, Morozumi M, Yamada T. Receptive field characteristics of stretch-insensitive mechanosensitive units in the rat urinary bladder. *Auton Neurosci.* 2012 Nov 2;171(1-2):8-13. doi: 10.1016/j.autneu.2012.08.004. Epub 2012 Sep 14.
- Jiang HH, Gill BC, Dissaranan C, Zutshi M, Balog BM, Lin D, Damaser MS. Effects of acute selective pudendal nerve electrical stimulation after simulated childbirth injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 Feb 1;304(3):F239-47.
- Jiang, H.H., Gustilo-Ashby, A.M., Salcedo, L.B., Pan, H.Q., Sybert, D.F., Butler, R.S., Damaser, M.S., 2009. Electrophysiological function during voiding after simulated childbirth injuries. *Exp Neurol.* 215, 342-8.

- Jiang, H.-H., Salcedo, L.B., Damaser, M.S., 2011. Quantification of neurological and other contributors to continence in female rats. *Brain Res.* 1382, 198–205. doi:10.1016/j.brainres.2011.01.094
- Jones, M., Larson, E., 2003. Length of normal labor in women of Hispanic origin. *J Midwifery Womens Health.* 48, 2-9.
- Juárez, M., Hernández, I., Cruz, Y., 2012. Genitourinary dysfunction in male rats after bilateral neurectomy of the motor branch of the sacral plexus. *Neurourol. Urodyn.* 31, 1288–1293. doi:10.1002/nau.22242
- Kamo, I., Kaiho, Y., Canon, T.W., Chancellor, M.B., de Groat, W.C., Prantil, R.L., Vorp, D.A., Yoshimura, N., 2006. Functional analysis of active urethral closure mechanisms under sneeze induced stress condition in a rat model of birth trauma. *J Urol* 176, 2711-2715.
- Kanai, A.J., 2011. Afferent mechanism in the urinary tract. *Handb Exp Pharmacol*, 171-205.
- Kekre, A.N., Vijayanand, S., Dasgupta, R., Kekre, N., 2011. Postpartum urinary retention after vaginal delivery. *Int J Gynaecol Obstet.* 112, 112-5. Kekre, A.N., Vijayanand, S., Dasgupta, R., Kekre, N., 2011. Postpartum urinary retention after vaginal delivery. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 112, 112–115. doi:10.1016/j.ijgo.2010.08.014
- Kerns, J.M., Damaser, M.S., Kane, J.M., Sakamoto, K., Benson, J.T., Shott, S., Brubaker, L., 2000. Effects of pudendal nerve injury in the female rat. *Neurourol. Urodyn.* 19, 53–69.
- Kikukawa, K., Fukunaga, K., Kato, T., Yamaga, M., Miyamoto, E., Takagi, K., 2003. Acute changes in the axonal cytoskeleton after mild stretching of the rat brachial plexus. *J Orthop Res* 21, 359-364.
- Kjaergaard, H., Olsen, J., Ottesen, B., Dykes, A.K., 2009. Incidence and outcomes of dystocia in the active phase of labor in term nulliparous women with spontaneous labor onset. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 88, 402-7.
- Lasanen, L.T., Tammela, T.L., Kallioinen, M., Waris, T., 1992. Effect of acute distension on cholinergic innervation of the rat urinary bladder. *Urol Res* 20, 59-62.
- Laumann, E.O., Paik, A., Rosen, R.C., 1999. Sexual dysfunction in the United States: prevalence and predictors. *JAMA.* 281, 537-44.
- Lien, K.C., Mooney, B., DeLancey, J.O., Ashton-Miller, J.A., 2004. Levator ani muscle stretch induced by simulated vaginal birth. *Obstet Gynecol.* 103, 31-40.
- Lien, K.C., Morgan, D.M., Delancey, J.O., Ashton-Miller, J.A., 2005. Pudendal nerve stretch during vaginal birth: a 3D computer simulation. *Am J Obstet Gynecol.* 192, 1669-76.
- Lin, A.S., Carrier, S., Morgan, D.M., Lue, T.F., 1998. Effect of simulated birth trauma on the urinary continence mechanism in the rat. *Urology.* 52, 143-51.
- MacLennan, A.H., Taylor, A.W., Wilson, D.H., Wilson, D., 2000. The prevalence of pelvic floor disorders and their relationship to gender, age, parity and mode of delivery. *Bjog* 107, 1460-1470.
- Malallah, M.A., Al-Shaiji, T.F., 2015. Pharmacological treatment of pure stress urinary incontinence: a narrative review. *Int Urogynecol J.* 26, 477-85.
- McKenna, K.E., Nadelhaft, I., 1989. The pudendo-pudendal reflex in male and female rats. *J Auton Nerv Syst* 27, 67-77.
- Merrill, L., Gonzalez, E.J., Girard, B.M., Vizzard, M.A., 2016. Receptors, channels, and signalling in the urothelial sensory system in the bladder. *Nat Rev Urol* 13, 193-204.

- Minassian, V.A., Drutz, H.P., Al-Badr, A., 2003. Urinary incontinence as a worldwide problem. *Int J Gynaecol Obstet.* 82, 327-38.
- Mirto-Aguilar, N., Palacios, J.L., Munoz, A., Juarez, M., Cruz, Y., 2019. Urethral regions with differential tissular composition may underlie urinary continence and voiding function in female rats. *Neurourol Urodyn.*
- Moore CL, White RH. Sex differences in sensory and motor branches of the pudendal nerve of the rat. *Horm Behav.* 1996 Dec;30(4):590-9.
- Mostwin, J.L., Genadry, R., Saunders, R., Yang, A., 2001. Stress incontinence observed with real time sonography and dynamic fastscan magnetic resonance imaging--insights into pathophysiology. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 94-9; discussion 106-25.
- Mulder, F.E., Hakvoort, R.A., Schoffemeer, M.A., Limpens, J., Van der Post, J.A., Roovers, J.P., 2014. Postpartum urinary retention: a systematic review of adverse effects and management. *Int Urogynecol J* 25, 1605-1612.
- Mulder, F.E., Oude Rengerink, K., van der Post, J.A., Hakvoort, R.A., Roovers, J.P., 2016. Delivery-related risk factors for covert postpartum urinary retention after vaginal delivery. *Int Urogynecol J* 27, 55-60.
- Nagatomi, J., Toosi, K.K., Grashow, J.S., Chancellor, M.B., Sacks, M.S., 2005. Quantification of bladder smooth muscle orientation in normal and spinal cord injured rats. *Ann Biomed Eng.* 33, 1078-89.
- Nix, W.A., Hopf, H.C., 1983. Electrical stimulation of regenerating nerve and its effect on motor recovery. *Brain Res.* 272, 21-5.
- Noh, J.-Y., Han, D.-H., Yoon, J.-A., Kim, M.-H., Kim, S.-E., Ko, I.-G., Kim, K.-H., Kim, C.-J., Cho, S., 2011. Circadian Rhythms in Urinary Functions: Possible Roles of Circadian Clocks? *Int Neurourol J Int. Neurourol. J.* 15, 64–73. doi:10.5213/inj.2011.15.2.64
- Nygaard, I., Barber, M.D., Burgio, K.L., Kenton, K., Meikle, S., Schaffer, J., Spino, C., Whitehead, W.E., Wu, J., Brody, D.J., Network, P.F.D., 2008. Prevalence of symptomatic pelvic floor disorders in US women. *JAMA.* 300, 1311-6.
- Olivetti L, Marchetti G. 2009. Urinary System: Normal Gross and Microscopic Anatomy. In: eds. Grazioli L, Olivetti L. *Imaging of Urogenital Diseases.* Springer Milan.
- Pan, H.Q., Kerns, J.M., Lin, D.L., Liu, S., Esparza, N., Damaser, M.S., 2007. Increased duration of simulated childbirth injuries results in increased time to recovery. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 292, R1738-44.
- Pan, H.Q., Kerns, J.M., Lin, D.L., Sybert, D., Steward, J., Hoover, C.R. V, Zaszczurynski, P., Butler, R.S., Damaser, M.S., 2009. Dual simulated childbirth injury delays anatomic recovery. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 296, F277–83. doi:10.1152/ajprenal.90602.2008
- Pastelín, C.F., Juárez, R., Damaser, M.S., Cruz, Y., 2012. Neural pathways of somatic and visceral reflexes of the external urethral sphincter in female rats. *J. Comp. Neurol.* 520, 3120–34. doi:10.1002/cne.23079
- Pauwels, E., De Wachter, S., Wyndaele, J.J., 2009. Evaluation of different techniques to create chronic urinary incontinence in the rat. *BJU Int* 103, 782-785; discussion 785-786.
- Peeters K, Sahai A, De Ridder D, Van Der Aa F. Long-term follow-up of sacral neuromodulation for lower urinary tract dysfunction. *BJU Int.* 2014 May;113(5):789-94.

- Peyrat, L., Haillot, O., Bruyere, F., Boutin, J.M., Bertrand, P., Lanson, Y., 2002. Prevalence and risk factors of urinary incontinence in young and middle-aged women. *BJU Int.* 89, 61-6.
- Quiboeuf, E., Saurel-Cubizolles, M.-J., Fritel, X., EDEN Mother-Child Cohort Study Group, 2016. Trends in urinary incontinence in women between 4 and 24 months postpartum in the EDEN cohort. *BJOG* 123, 1222–8. doi:10.1111/1471-0528.13545
- Raizada, V., Mittal, R.K., 2008. Pelvic floor anatomy and applied physiology. *Gastroenterol Clin North Am.* 37, 493-509, vii.
- Rortveit, G., Daltveit, A.K., Hannestad, Y.S., Hunskaar, S., 2003. Vaginal delivery parameters and urinary incontinence: the Norwegian EPINCONT study. *Am J Obstet Gynecol* 189, 1268-1274.
- Sato, T., Konishi, F., Minakami, H., Nakatsubo, N., Kanazawa, K., Sato, I., Itoh, K., Nagai, H., 2001. Pelvic floor disturbance after childbirth: vaginal delivery damages the upper levels of sphincter innervation. *Dis Colon Rectum.* 44, 1155-61.
- Sajadi, K.P., Lin, D.L., Steward, J.E., Balog, B., Dissaranan, C., Zaszczurynski, P., Gill, B.C., Jiang, H.-H., Kerns, J.M., Damaser, M.S., 2012. Pudendal Nerve Stretch Reduces External Urethral Sphincter Activity in Rats. *J. Urol.* 188, 1389–1395. doi:10.1016/j.juro.2012.06.006
- Schüssler, B. 1994. Childbirth and Pelvic Floor Damage. En: *Pelvic Floor Re-education*. Schüssler, Bernhard, Laycock, Jo, Stanton, Stuart L. (eds.) Editorial Springer-Verlag London.
- Sengupta, P., 2013. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int. J. Prev. Med.* 4, 624–30.
- Snooks, S.J., Swash, M., Henry, M.M., Setchell, M., 1986. Risk factors in childbirth causing damage to the pelvic floor innervation. *Int. J. Colorectal Dis.* 1, 20–4.
- Shields, S.G., Ratcliffe, S.D., Fontaine, P., Leeman, L., 2007. Dystocia in nulliparous women. *Am Fam Physician.* 75, 1671-8.
- Sievert, K.D., Emre Bakircioglu, M., Tsai, T., Dahms, S.E., Nunes, L., Lue, T.F., 2001. The effect of simulated birth trauma and/or ovariectomy on rodent continence mechanism. Part I: functional and structural change. *J Urol.* 166, 311-7.
- Snegovskikh, V., Park, J.S., Norwitz, E.R., 2006. Endocrinology of parturition. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 35, 173-91, viii.
- Snooks, S.J., Swash, M., Henry, M.M., Setchell, M., 1986. Risk factors in childbirth causing damage to the pelvic floor innervation. *Int J Colorectal Dis.* 1, 20-4.
- Stoker, J., Halligan, S., Bartram, C.I., 2001. Pelvic floor imaging. *Radiology.* 218, 621-41.
- Sugaya, K., Nishijima, S., Miyazato, M., Ogawa, Y., 2005. Central nervous control of micturition and urine storage. *J Smooth Muscle Res.* 41, 117-32.
- Tai, C., Smerin, S.E., de Groat, W.C., Roppolo, J.R., 2006. Pudendal-to-bladder reflex in chronic spinal-cord-injured cats. *Exp Neurol.* 197, 225-34.
- Tammela, T., Lasanen, L., Waris, T., 1990. Effect of distension on adrenergic innervation of the rat urinary bladder. *Urol Res* 18, 345-348.
- Thom, D.H., Brown, J.S., Schembri, M., Ragins, A.I., Creasman, J.M., Van Den Eeden, S.K., 2011. Parturition events and risk of urinary incontinence in later life. *NeuroUrol Urodyn.* 30, 1456-61.

- Tsunoda, A., Shibusawa, M., Kamiyama, G., Kusano, M., Shimizu, Y., Yanaihara, T., 1999. The effect of vaginal delivery on the pelvic floor. *Surg Today*. 29, 1243-7.
- Valente, S., DuBeau, C., Chancellor, D., Okonski, J., Vereecke, A., Doo, F., Lajiness, M., Diokno, A., Chancellor, M., 2014. Epidemiology and demographics of the underactive bladder: a cross-sectional survey. *Int Urol Nephrol* 46 Suppl 1, S7-10.
- Van der Pal F, van Balken MR, Heesakkers JP, Debruyne FM, Bemelmans BL. Implant-Driven Tibial Nerve Stimulation in the Treatment of Refractory Overactive Bladder Syndrome: 12-Month Follow-up. *Neuromodulation*. 2006 Apr;9(2):163-71.
- Viktrup L, Lose G, Rolff M, y cols. The symptom of stress incontinence caused by pregnancy or delivery in primiparas. *Obstet Gynecol* 1992;79:945.
- Weil, A., Reyes, H., Rottenberg, R.D., Beguin, F., Herrmann, W.L., 1983. Effect of lumbar epidural analgesia on lower urinary tract function in the immediate postpartum period. *Br J Obstet Gynaecol* 90, 428-432.
- Yang, B., 2011. Bladder rupture associated with uterine rupture at delivery. *Int Urogynecol J* 22, 625-627.
- Yip, S.K., Hin, L.Y., Chung, T.K., 1998. Effect of the duration of labor on postpartum postvoid residual bladder volume. *Gynecol Obstet Invest* 45, 177-180.
- Zhang, X., Xin, N., Tong, L., Tong, X.J., 2013. Electrical stimulation enhances peripheral nerve regeneration after crush injury in rats. *Mol Med Rep*. May;7(5):1523-7.

Conclusions: Absence of the MIF gene is associated with altered bladder filling and diminished volume sensitivity, however oophorectomy eliminated this difference. Oophorectomy in intact animals was not associated with changes in bladder filling. Oophorectomy and MIF were not associated with changes in voiding function or detrusor tension generation characteristics. We conclude that MIF has a role in bladder filling control that negates any effect of oophorectomy.

Funding: NIH 5R01AG028657-02 (Kuchel PI)

Clinical Relevance: LUTS/Voiding Dysfunction

Poster # BS11

MOLECULAR CHANGES IN THE VAGINAL EXTRACELLULAR MATRIX OF LOX11 KO MICE –AN ANIMAL MODEL OF PELVIC ORGAN PROLAPSE

Bruna Couri, MD¹, Ganesh Swaminathan B. Tech², Mei Kuang, PhD³, Anand Ramamurthi, PhD⁴ and Margot Damaser, PhD⁵

¹Depts. of Obstetrics & Gynecology and Biomedical Engineering, Cleveland Clinic, Cleveland, OH; ²Dept. of Biomedical Engineering, Cleveland Clinic, Cleveland, OH & Dept. of Biology, University of Akron, Akron, OH; ³Dept. of Biomedical Engineering, Cleveland Clinic, Cleveland, OH; ⁴Depts. of Biomedical Engineering, and Obstetrics & Gynecology, and Glickman Urological & Kidney Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, OH & Louis Stokes Veterans Affairs Medical Center, Cleveland, OH

(Presented by: Brunna Couri, MD)

Introduction and Objectives: A deficient remodeling of the extracellular matrix (ECM) during pregnancy and post-partum could be related to pelvic organ prolapse (POP). In lysyl oxidase like-1 (*Lox11*) knockout (KO) mouse model of POP, the condition develops after vaginal delivery and has been shown to correlate with disorganized elastin clusters. To establish a pathophysiologic basis for POP development, we sought to compare changes to the vaginal ECM homeostasis between nulliparous (N), multiparous non-prolapsed (MNP) and multiparous prolapsed (MP) *Lox11* KO mice, and nulliparous wild type (WT).

Methods: Primary cells were isolated from vaginal explants from age-matched N (n = 3), MNP (n = 3), MP (n = 3) and WT (n = 2) animals. Passage 2 cultured cells from each group, with 6 replicates each, were cultured for 21 days in DMEM/F12 medium with 10% fetal bovine serum, and then assayed for increase in DNA content and total elastic matrix level using Fastin assay. mRNA was isolated from cell cultures, then RT-PCR was performed to assess the expression of tropoelastin (Eln), collagen 1a (Col1a) and metalloproteinase (MMP) 2 and MMP 9.

Results: The ratio of total elastin to DNA (ng/ng) was significantly different and increased in the MP group when compared to all other groups, in the N group it was significantly reduced when compared to MNP and WT mice. RT-PCR showed that the Col1a expression was significantly increased in MP mice compared to MNP mice. MMP9 expression was significantly increased in the N group when compared to the WT animals.

Conclusions: MP mice developed POP despite relatively higher collagen gene expression, suggesting impaired ECM structure. The results of this ongoing work suggest that pathophysiologic changes in *Lox11* KO mice, including elastin and collagen disorganization, may lead to, or be triggered by, prolapse, inducing a compensatory regenerative response, which is

aberrant and intrinsically limited its ability to reinstate healthy ECM and thus prevent or reverse POP.

Funding: NIH RO1 HD059859 and the Cleveland Clinic

Clinical Relevance: Pelvic Organ Prolapse

Poster # BS12

ACUTE URINARY RETENTION AND SOMATIC AND AUTONOMIC PELVIC NERVES INJURY INDUCED BY SIMULATED CHILDBIRTH TRAUMA IN RATS

José Palacios¹, Nicté Xelhuantzi, PhD¹, Margot Damaser, PhD² and Yolanda Cruz, PhD¹

¹Universidad Autónoma de Tlaxcala; ²Cleveland Clinic

(Presented by: José Palacios)

Introduction and Objectives: Postpartum urinary retention has been observed after long labor duration. The rat model of vaginal distention (VD) induces bladder hypoxia and urethra and pudendal nerve injury, which is associated with the development of stress urinary incontinence (SUI). The present study investigates whether vaginal distention using a balloon constricts the urethra inducing acute urinary retention, as well as damage to pelvic somatic and autonomic nerves.

Methods: Twenty Wistar virgin female rats were divided into 2 groups; vaginal distention (VD, n = 10), and sham (SH, n = 10). Anesthetized rats underwent 4 hours of VD (VD group), or the Foley catheter was introduced in the vagina but not distended (SH group). Immediately after the four hours, a laparotomy was performed and the pelvic bone removed to observe the lower urinary tract features and measure the length of relevant nerves (n = 8 per group). In 6 rats, (3 VD and 3 SH) the activity of the dorsal nerve of the clitoris (DNC) and cavernous nerve (CN) were recorded, and the pelvic nerve was electrically (10 Hz, 4V, 0.4 ms duration) stimulated to induce bladder contraction. In the other four rats (2 VD, 2 SH) the bladder was collected for histology. A student's t-test was used to analyze the results with P < 0.05 indicating a significant difference between groups.

Results: In addition to stretching the motor branch of the sacral plexus, also known as the motor branch of the pudendal nerve, VD significantly increased the length of DNC, CN, and nerves of the bladder (p < 0.01). The balloon compressed the urethra to the pelvic bone avoiding urine expulsion, which significantly increased bladder length and urine volume (p < 0.01). Hematomas were observed, mainly in the bladder dome and neck. CN and DCN activity in response to perigenital skin stimulation was depleted in VD rats. Electrical stimulation threshold to induce bladder contraction increased significantly in VD rats (p < 0.01). Bladder histology demonstrated blood and leukocyte extravasation.

Conclusion: The results suggest that simulated childbirth trauma in rat damages somatic and autonomic nerves, and induces bladder overdistention as a collateral effect of bladder outlet obstruction during VD. Increased pelvic nerve threshold to induce bladder contraction may be result of damage to efferent nerves or detrusor impairment. We conclude that VD may be also used as a model for acute urinary retention.

Funding: CONACyT: YCG 183446, ILPG 4882

Clinical relevance: Female Urology—including Incontinence

Poster # BS13

VALIDATION OF EXTERNAL URETHRAL SPHINCTER (EUS) ELECTROMYOGRAPHY (EMG) IN MICE

Neuroanatomic and behavioral correlates of urinary dysfunction induced by vaginal distension in rats

J. L. Palacios,¹ M. Juárez,² C. Morán,³ N. Xelhuantzi,² M. S. Damaser,^{4,5} and Y. 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 Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México; ⁴Department of Biomedical Engineering, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio; and ⁵Advanced Platform Technology Center, Louis Stokes Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center, Cleveland, Ohio

Submitted 14 September 2015; accepted in final form 26 February 2016

Palacios JL, Juárez M, Morán C, Xelhuantzi N, Damaser MS, Cruz Y. Neuroanatomic and behavioral correlates of urinary dysfunction induced by vaginal distension in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 310: F1065–F1073, 2016. First published March 2, 2016; doi:10.1152/ajprenal.00417.2015.—The aim of the present study was to use a model of simulated human childbirth in rats to determine the damage to genitourinary structures and behavioral signs of urinary dysfunction induced by vaginal distension (VD) in female rats. In *experiment 1*, the length of the genitourinary tract and the nerves associated with it were measured immediately after simulated human delivery induced by VD or sham (SH) procedures. Electroneurograms of the dorsal nerve of the clitoris (DNC) were also recorded. In *experiment 2*, histological characteristics of the bladder and major pelvic ganglion of VD and SH rats were evaluated. In *experiment 3*, urinary parameters were determined in conscious animals during 6 h of dark and 6 h of light before and 3 days after VD or SH procedures. VD significantly increased distal vagina width ($P < 0.001$) and the length of the motor branch of the sacral plexus ($P < 0.05$), DNC ($P < 0.05$), and vesical nerves ($P < 0.01$) and decreased DNC frequency and amplitude of firing. VD occluded the pelvic urethra, inducing urinary retention, hematomas in the bladder, and thinness of the epithelial ($P < 0.05$) and detrusor ($P < 0.01$) layers of the bladder. Major pelvic ganglion parameters were not modified after VD. Rats dripped urine in unusual places to void, without the stereotyped behavior of micturition after VD. The neuroanatomic injuries after VD occur alongside behavioral signs of urinary incontinence as determined by a new behavioral tool for assessing micturition in conscious animals.

external urethral sphincter; dorsal nerve of the clitoris; major pelvic ganglion; micturition

MICTURITION consists of two phases: storage and urine expulsion. During storage, the detrusor is relaxed while the bladder neck and urethra are activated, preventing involuntary bladder emptying (11). Extrinsic elements such as the levator ani muscle also contribute to the maintenance of continence (3). When the bladder reaches its threshold volume, spinal and supraspinal reflexes are triggered to induce bladder contraction and urethral relaxation, and urine flows through the urethra (11). Damage to the lower urinary tract and/or its innervation can induce urinary dysfunction (3, 29, 41).

Urinary dysfunction affects the health of many women (60). Stress urinary incontinence has been described as involuntary

loss of urine during effort and is the most prevalent urinary disorder related to vaginal childbirth, which is known to injure the pudendal nerve and denervate the external urethral sphincter (EUS) (3, 15, 57).

Maternal pelvic viscera and nerve damage results from the difficulty of human childbirth due the large fetal head and brain relative to the maternal pelvis size. Neonates at birth have heads that are close to the size of the maternal birth canal through which they must pass during the second stage of parturition (48). Births of fetuses over 4 kg or fetal malposition often prolong parturition (30), retaining the fetus in the pelvic cavity, the main anatomic resistance to fetal expulsion. Prolonged second stage of parturition is not uncommon in primigravid women, with an incidence of 37% (30, 55).

Simulated delivery injury models, including vaginal distension (VD) with a balloon in rats, have been created to better understand the injury process during parturition of women (20, 33). The diameter of the balloon and the duration of the distension can be adjusted to mimic the difficulty of parturition in women. A prolonged parturition can be modeled with VD of greater duration than the duration of parturition in intact rats (19, 34). Using the VD model, investigators have demonstrated bladder, urethral, and vaginal hypoxia (9), anatomic and functional damage to the EUS and its innervation (4, 21), and decreases in urethral resistance (26). Whether these VD-induced structural and functional changes are sufficient to cause signs of voiding dysfunction in awake animals is unknown.

Most of the studies using simulated delivery injury models have focused on urethral neuromuscular injury (4, 21, 58). However, in addition to the pudendal nerve, there are other somatic and autonomic nerves running over or adjacent to the vaginal wall that could also be stretched during childbirth (40). Nonetheless, injury to pelvic, perineal, or bladder nerves has not been investigated in the rat VD model of simulated delivery. Moreover, no behavioral correlates of urinary dysfunction have been investigated after VD in conscious rats.

The aim of the present study was to determine, in anesthetized rats, the VD-induced damage to genitourinary structures and nerves and, in conscious animals, the behavioral signs of urinary dysfunction.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design. Thirty-four adult nulliparous Wistar female rats (250–300 g body wt) were housed with water and food ad libitum and maintained on a 12:12-h light-dark cycle. The experimental protocol was approved by Tlaxcala University Committee on Labo-

Address for reprint requests and other correspondence: Y. Cruz, Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Carretera Tlaxcala-Puebla km 1.5, Tlaxcala Tlax 90000, México (e-mail: cruzgomezy@yahoo.com.mx).

Neural and Endocrine Factors Contribute to the Comorbidity of Urinary and Sexual Dysfunctions

Yolanda Cruz¹ · R. A. Lucio¹ · J. L. Palacios²

Published online: 17 October 2017
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

Abstract

Purpose of Review The purpose of this study is to determine whether neural and/or endocrine factors are related to urinary and sexual disease comorbidity.

Recent Findings Common neural circuitries at cerebral, spinal, and peripheral levels participate in the control of urogenital organs. The convergence and crosstalk of pelvic organ information in the central nervous system may underlie comorbidity of urinary–sexual dysfunctions, and also subserve the success of genital and tibial nerve stimulation therapies to treat overactive bladder. Nonetheless, the relevance of gonadal hormones to the pathophysiology of urinary–sexual functions is still controversial.

Summary The etiology of urinary dysfunctions is usually considered to be at the periphery. However, spinal and supraspinal sites controlling urogenital organs deteriorate with age and can be another factor for urogenital dysfunctions. In addition, although it is well recognized that urinary incontinence has a negative impact on sexual functions, there is no research investigating the impact of sexual function/dysfunction on the urinary organs.

Keywords Pudendal nerve · Neural circuitry crosstalk · Sexual desire · Micturition disease · Testosterone therapy

Introduction

The urogenital tract performs reproductive, sexual, and urinary functions. Its organs are embryologically related and remain anatomically linked in adulthood. They are also in close anatomical and physiological relationships with intricate networks of pelvic blood vessels and nerves, as well as with striated musculature. Due to its complexity, the urogenital organs are usually compartmentalized for its study and clinical treatment (urology, gynecology, sexology). However, urinary and sexual dysfunctions (SD) are common in adult people.

The incidence of urinary and sexual comorbidity is especially high in people with neurodegenerative disorders such as diabetes and Parkinson disease and at advanced age when the concentration of gonadal hormones has decreased and processes of neural degeneration are occurring [1]. This suggests that alterations in endocrine and/or peripheral and central neural pathways controlling the urogenital functions may be related to sexual–urinary comorbidities. For example, clinical and preclinical studies suggest that increased activity of the pelvic autonomic innervation is related to prostate cancer, polycystic ovarian syndrome, and loss of ovarian function at senescence [2–4]. In addition, autonomic innervation of the urogenital organs is vulnerable during surgical procedures in the pelvic region, leading to urinary and sexual postoperative problems.

On the other hand, it calls the attention that patients with overactive bladder (OAB) are treated with electrical stimulation of the clitoris or tibial nerve [5]. The effectiveness of this neuromodulation clearly indicates a crosstalk between genital

This article is part of the Topical Collection on *Preclinical and Psychophysiology*

✉ Yolanda Cruz
cruzgomezy@yahoo.com.mx

¹ Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Carretera Tlaxcala-Puebla km 1.5 s/n, 90000 Tlaxcala, Tlax, Mexico

² Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico



Retención urinaria posparto: conducta clínica y modelos experimentales para su estudio

Palacios-Galicia JL,¹ Muñoz-Toscano A,² Pérez-Martínez C,^{1,3} Cruz-Gómez Y^{1,4}

Resumen

ANTECEDENTES: puesto que la retención urinaria posparto no es un suceso que se considere grave, la información de su tratamiento en las unidades obstétricas es muy limitada, sobre todo en América Latina.

MÉTODO: búsqueda de información publicada, en español e inglés, entre los años 2000 y 2016 relacionada con las medidas preventivas y tratamientos de la retención urinaria posparto en dos bases de datos de bibliografía biomédica: Pubmed y Scopus.

RESULTADOS: se encontraron 31 artículos científicos en inglés relacionados con el tratamiento de la retención urinaria posparto y pocos estudios en modelos animales de retención urinaria aguda, ninguno en español. El diagnóstico de la retención urinaria posparto se establece con el auxilio de métodos invasivos y no invasivos: catéteres y ultrasonido. El tratamiento incluye acciones preventivas (reducción de problemas del parto mediante adiestramiento adecuado del personal de las unidades obstétricas o la aplicación de masaje en la región sacra) y posteriores al parto (uso de catéteres uretrales o suprapúbicos).

CONCLUSIONES: la retención urinaria posparto es una complicación clínica que requiere entender que el diagnóstico y tratamiento tempranos contribuyen sustancialmente a disminuir la alta prevalencia de disfunciones vesicales femeninas. En esta revisión se evidenció la necesidad de estudios preclínicos que permitan conocer la repercusión a largo plazo de la retención urinaria y probar nuevos tratamientos.

PALABRAS CLAVE: retención urinaria posparto, estudios preclínicos, prevalencia, diagnóstico, prevención, tratamiento, disfunción vesical.

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

² Houston Methodist Research Institute, Houston, Texas, EUA.

³ Centro de Urología Avanzada CURA, Delicias, Chihuahua, México.

⁴ Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México.

Recibido: diciembre 2017

Aceptado: febrero 2017

Correspondencia

Yolanda Cruz Gómez
cruzgomez@yahoo.com.mx

Este artículo debe citarse como

Palacios-Galicia JL, Muñoz-Toscano A, Pérez-Martínez C, Cruz-Gómez Y. Retención urinaria posparto: conducta clínica y modelos experimentales para su estudio. Ginecol Obstet Mex. 2017 julio;85(7):457-465.

Ginecol Obstet Mex. 2017 Jul;85(7):457-465.

Postpartum urinary retention: clinical behavior and experimental models for study

Palacios-Galicia JL,¹ Muñoz-Toscano A,² Pérez-Martínez C,^{1,3} Cruz-Gómez Y^{1,4}

Abstract

BACKGROUND: since postpartum urinary retention is not a condition that is considered severe, information of its treatment in obstetrical units is very limited, especially in Latin America.

487 | www.ics.org/2018/abstract/887

TIME COURSE OF BEHAVIOR AND PHYSIOLOGY OF URINARY CONTINENCE RECOVERY AFTER VAGINAL DISTENSION IN RATS

Palacios J1¹, Damaser M S², Munoz A³, Perez C⁴, Juarez M⁵, Cruz Y⁶

1. Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, México, 2. Department of Biomedical Engineering, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio and Advanced Platform Technology Center, Louis Stokes Department of Veterans Affairs Medical Center, Cleveland Ohio USA, 3. Instituto de Neurociencias Transaccionales, Universidad de Guadalajara, Mexico, 4. Centro de Urología Avanzada (CIRA), Delficias, Chihuahua, México, 5. Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, México

HYPOTHESIS / AIMS OF STUDY

Prolonged childbirth is a risk factor for urinary incontinence whose mechanisms are not well established. In rats, the vaginal distension (VD) model, which mimics prolonged childbirth, stretches the pelvic nerves, abolishes external urethral sphincter (EUS) [1] activity and induces urine leakage, a behavioral sign of stress urinary incontinence [2]. The present study aimed to determine in rats after VD if the electromyographic (EMG) activity of the EUS and behavioral urinary continence recover simultaneously.

STUDY DESIGN, MATERIALS AND METHODS

The experimental protocol was approved by the university committee on Laboratory Animals and performed in accordance with the guidelines of the Mexican Council on Laboratory Animals Care (NOM-062-Z00-1999), and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council of the National Academies, USA). We employed adult nulliparous Wistar female rats (250–300 g). The animals were randomized to undergo 4 h of VD or sham VD (SH). In VD animals, to simulate the difficulty of the fetus passing through the pelvic cavity and the injury induced by a prolonged second stage of human childbirth, a modified 10 Fr. Foley balloon catheter was inserted into the vagina and filled with 4 ml water for a period of 4 h. In SH animals the catheter was placed into the vagina for 4 h but was not inflated. Rats were divided into two experiments. In experiment 1, micturition behavior was recorded for 6 h, before and 3 to 13 days after VD (SH, n=5; VD, n=8) employing a closed-circuit video system that includes infrared cameras and digital video recording. Animals were placed in a wire floor cage and voided volume was collected in a plastic container. The ventral abdominal area of the animals was videotaped to determine urine loss during spontaneous rat behaviors. Stereotyped female micturition behavior occurred when rats walked to the edges of the cage, placed the rump toward the wall, and expelled urine, flowing in a stream [2]. In this case urine was found in the four edges but mainly in the corners. Leakage was considered as any small volume of urine expelled (<0.02 ml) without the stereotyped female behavior of micturition, and the number of drops were analyzed.

In experiment 2, EUS EMGs were recorded immediately and 3–12 days after VD (VD, n=5 per day; SH, n=8) employing an electrophysiological recording system. EUS EMG responses were induced by mechanical stimulation of the clitoral sheath (pudendo-pudendal reflex) or the bladder (bladder-EUS reflex). During both stimulations, amplitude (μV) and frequency (Hz) of a 1-second sample at the middle of the EUS EMGs was analyzed.

RESULTS

SH rats showed the stereotyped female behavior of micturition and did not drip urine in any body posture throughout the study. In contrast, 100% of VD rats dripped urine in the absence of the stereotyped voiding behavior at day 3 (38 ± 7 drops) and 5 (39 ± 8 drops) after VD. The leakage was associated with behaviors implicating stress, such as standing to reach food, sneezing, scratching and vertical exploration. At day 7 (28 ± 5 drops) and 9 (13 ± 2 drops) after VD, the dripping disappeared in 70% of animals and at day 13 in 100%. In SH animals, EUS EMG activity during the pudendo-pudendal reflex was $87.4 \pm 11 \mu\text{V}$ and 344 ± 50 Hz, and during bladder-EUS reflex was $52.2 \pm 6 \mu\text{V}$ and 255 ± 25 Hz. In the VD group, EUS EMG activity was abolished immediately until day 5 after VD. At day 6, EMG activity during the pudendo-pudendal reflex was recovered in 26% ($14.5 \pm 5 \mu\text{V}$) and 16% during the bladder-EUS reflex ($14.3 \pm 7 \mu\text{V}$) with respect to EUS EMG amplitude of SH animals. At day 7 and 9 after VD the amplitude of EUS EMG activity was recovered to 40–60% and 30–35% during the pudendo-pudendal and bladder-EUS reflexes, respectively. At day 10–12 both reflexes were recovered to 100%.

INTERPRETATION OF RESULTS

The stereotyped behavior of micturition of female rats suggests that they feel bladder fullness and volition to expel urine, then move to the edges of the cage. Therefore, any urine expelled without the stereotyped behavior of micturition was considered as a sign of urinary incontinence. The fact that VD completely abolished the EUS EMG activity at the first 5 days after VD, which correlates with the maximum expression of stress urinary incontinence (leakage associated with stress behaviors), corroborate that EUS tonic contraction contributes to maintain urinary continence [3]. EUS inactivity can be induced during VD by injury of the EUS muscle, its nerve or neuromuscular junctions. Given that urine leakage did not occur all the time, we assume that rats can maintain certain degree of urinary continence after VD, suggesting that the other components of urinary continence are not severely affected by VD, particularly urethral smooth muscle and epithelial cells and their innervation from the major pelvic ganglia [2]. EUS activity gradually recovered after VD and required about 10–12 days to restore to the values of SH animals suggesting that this time period is the window for regenerative processes of the injured structures after VD. Given that EUS activity recovery precedes recovery of behavioral expression of urinary continence, suggests that EUS activity is necessary to correct urinary continence in rats after VD.

MP38-20
TRANSCUTANEOUS ELECTRICAL STIMULATION OF DORSAL NERVE OF CLITORIS FACILITATES URINARY CONTINENCE RECOVERY AFTER VAGINAL DISTENSION IN RATS

Jose L. Palacios*, Tlaxcala, Mexico; Carlos Pérez, Chihuahua, Mexico; Margot S. Damaser, Cleveland, OH; Margarita Juárez, Yolanda Cruz Gomez, Tlaxcala, Mexico

INTRODUCTION AND OBJECTIVES: Vaginal distension (VD) injures the external urethral sphincter, stretches pelvic nerves and induces urine leakage, a behavioral sign of stress urinary incontinence. Electrical pudendal nerve stimulation accelerates recovery from urinary incontinence. The aim of the present study was to determine whether in conscious rats transcutaneous electrical stimulation (TES) of the DNC facilitates urinary continence recovery after VD.

METHODS: Twenty adult nulliparous Wistar female rats (250–300 g) were anesthetized (ketamine, 60 mg/kg and xylazine, 7.5 mg/kg, ip) to undergo 4 h of VD (n=8), sham VD (n=5) or VD+TES (n=7). In VD animals, a 10-F Foley balloon catheter was inserted into the vagina and filled with 4 ml of water for 4 h. In SH animals, the catheter was placed into the vagina but not inflated. In the VD+TES animals, 3 stimulations (immediately, and 2 and 5 days after VD) were applied to the clitoral sheath for one hour with a pair of electrodes (0.9 mA, 20 Hz and 0.2 ms of duration). Micturition behavior and urinary parameters were evaluated during 6 h of dark, before and at 1, 3, 6 and 8 days after VD or SH VD.

RESULTS: Before VD, rats show a stereotyped behavior of micturition. No rat leaked urine. Voiding frequency and voiding volume were, 10±0.7 voids and 0.59±0.2 ml, respectively. After VD, stereotyped voiding behavior decreased at 1 day. From 1 to 3 days post VD, 100% of VD rats, with and without TES, leakage urine during behaviors implicating stress such as standing to reach food, sneezing, scratching, or standing on their hind legs for vertical exploration. Six and 8 days after VD, the percent of animals dripping urine decreased with TES (day 6, 70%; day 8, 28%) compared to those without TES (day 6, 87%; day 8, 75%). A similar effect of TES was observed on the number of leaks per animal at day 8 (TES 6±3 vs without TES 29±7; p<0.001).

CONCLUSIONS: VD-induced behavioral signs of urinary incontinence decrease gradually after the first 5 days post VD and TES accelerates functional recovery of continence. Further studies are required to compare effectivity of TES vs direct electrical pudendal nerve stimulation (invasive technique) on nerve regeneration after VD.

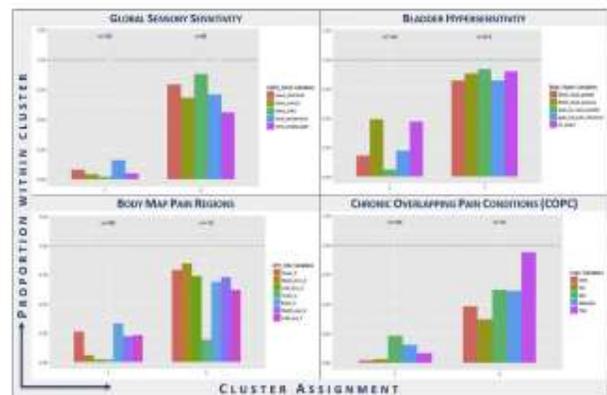
Source of Funding: CONACyT: 183446 YCG, JLPG-488223; Doctorado en Ciencias Biológicas, UATx.

for advancement of precision medicine approaches to UCPPS treatment. We performed consensus clustering within multiple subdomains of baseline data collected in the MAPP Research Network Epidemiology and Phenotyping (EP) Study. Resulting clusters were evaluated in terms of differential risk of improvement in longitudinal symptoms.

METHODS: Baseline symptom data from 424 participants (233 women; 191 men) with UCPPS (i.e., interstitial cystitis/ bladder pain syndrome or chronic prostatitis/ chronic pelvic pain syndrome) in the MAPP Research Network EP Study were analyzed. Consensus clustering was implemented to produce subgroups with maximal separation of baseline symptom profiles. A "mean consensus" score, using the empirical likelihood of pairs of patients being classified into the same cluster, was computed for each cluster. The resulting subgroups were evaluated in longitudinal models to investigate 48-week symptom improvement.

RESULTS: Subgroups resulting from 1,000 replications of consensus clustering were generated separately for each of four subdomains: 1) global sensory sensitivity, with maximal separation on "sensitivity to odors" (prevalence 2% vs. 88%); 2) bladder hypersensitivity with maximal separation on "pain increases as bladder fills" (prevalence 6% vs. 92%); 3) body map pain regions with maximal separation on "arm pain" (prevalence 4% vs 80%); 4) chronic overlapping pain conditions with maximal separation on "TMJ" (prevalence 8% vs 94%) (Figure). The mean consensus scores ranged from 81% to 97%, suggesting that these patient subtypes are highly reproducible. Furthermore, over 48-weeks of follow-up, the subgroup with high prevalences of bladder hypersensitivity features (cluster 1) was less likely to improve (p<0.01) in urological pain severity, and the subgroup with high prevalences of COPC features (cluster 2) was less likely to improve (p<0.01) in urinary severity.

CONCLUSIONS: These results hold great promise for scaling consensus clustering methods to expanded symptom domains to produce stable clusters that shed new insights into clinically relevant patient subtypes with differential longitudinal profiles.



Infections/Inflammation/Cystic Disease of the Genitourinary Tract: Interstitial Cystitis

Moderated Poster 39

Saturday, May 19, 2018

1:00 PM-3:00 PM



Efecto de la electroestimulación percutánea del nervio tibial en pacientes con enuresis monosintomática. Experiencia inicial en México

Pérez-Martínez C,^{1,2} Palacios-Galicia JL,^{1,3} Vargas-Díaz IB,² Cruz-Gómez Y^{1,3}

Resumen

OBJETIVO: Analizar el efecto de seis sesiones de neuromodulación por electroestimulación del nervio tibial posterior en pacientes con enuresis monosintomática resistente al tratamiento y describir los factores de riesgo de la técnica.

MATERIALES Y MÉTODOS: Ensayo clínico, aleatorizado, controlado y prospectivo, efectuado en pacientes de 6 a 15 años de edad, con antecedente de enuresis monosintomática de seis meses de evolución, sin reacción al tratamiento de primera y segunda línea. Los pacientes se asignaron al azar a dos grupos: 1) grupo activo (con electroestimulación) y 2) grupo placebo (sin electroestimulación), a quienes se aplicaron seis sesiones de neuromodulación por electroestimulación del nervio tibial posterior (grupo activo) o seis sesiones simuladas (grupo placebo). Se analizaron las variables de edad, nivel socioeconómico, sexo, evolución de la enuresis, diario vesical (antes y después del tratamiento) y uroflujometría. Para determinar la normalidad de los datos se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk. La comparación entre grupos por sexo y tipo de tratamiento se realizó con la prueba paramétrica t de Student.

RESULTADOS: Se estudiaron 8 pacientes: 4 niñas y 4 niños, con promedio de edad de 10.6 ± 1.6 años. La edad y el sexo no mostraron diferencias estadísticamente significativas. La mejoría de los pacientes (noches secas) fue de $80 \pm 7.5\%$ en el grupo activo vs $3.7 \pm 1.2\%$ en el grupo placebo ($p < 0.001$). Los efectos adversos fueron escasos.

CONCLUSIONES: La neuromodulación por electroestimulación del nervio tibial posterior durante seis sesiones es efectiva en el tratamiento de pacientes con enuresis monosintomática resistente al tratamiento; es una técnica de bajo costo, fácilmente reproducible y con efectos adversos casi nulos.

PALABRAS CLAVE: Enuresis; nervio tibial; vejiga.

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

² Centro de Urología Avanzada CURA, Delicias, Chihuahua.

³ Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala.

Recibido: agosto 2017

Aceptado: noviembre 2017

Correspondencia

Carlos Pérez Martínez
carlosperetz@prodigy.net.mx

Este artículo debe citarse como

Pérez-Martínez C, Palacios-Galicia JL, Vargas-Díaz IB, Cruz-Gómez Y. Efecto de la electroestimulación percutánea del nervio tibial en pacientes con enuresis monosintomática. Experiencia inicial en México. Rev Mex Urol. 2018 ene-feb;78(1):19-27. DOI: <https://doi.org/10.24245/revmexurol.v78i1.1719>

Urethral regions with differential tissular composition may underlie urinary continence and voiding function in female rats

Nancy Mirto-Aguilar¹ | José L. Palacios² | Alvaro Munoz³  |
Margarita Juárez⁴ | Yolanda Cruz⁴ 

¹Doctorado en Investigaciones Cerebrales, Centro de Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México

²Doctorado en Ciencias Biológicas, Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Tlaxcala, México

³Centro Universitario del Norte, Universidad de Guadalajara, Colotlán, Jalisco, México

⁴Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México

Correspondence

Yolanda Cruz, PhD, Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Carretera Tlaxcala-Puebla km 1.5, Tlaxcala, Tlax. C.P. 90000. Email: cruzgomezy@yahoo.com.mx

Funding information

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Grant number: 183446

Aims: To analyze, in female rats, the anatomical and histological features of the urethra and its relationship with the vagina and clitoris, and its innervation.

Methods: Seventeen adult female Wistar rats were used. Gross anatomy and acetylcholinesterase (AChE) histochemistry were performed to describe the urethral features, adjacent structures, and innervation. The histomorphometric characteristics of the urethra were determined in transversal, longitudinal, or coronal sections stained with Masson's Trichrome.

Results: The female rat urethra is not a homogeneous tubular organ. The pre-pelvic and pelvic regions are firmly attached to the vagina with belt-like striated fibers forming a urethra-vaginal complex. The bulbar regions have curved segments and a narrow lumen. The clitoral region is characterized by a urethra-clitoral complex surrounded by a vascular plexus. The lumen area and thickness of the urethral layers significantly varied between regions ($P < 0.05$). Innervation of the urethra arrives from the major pelvic ganglion, the dorsal nerve of the clitoris (DNC), and the motor branch of the sacral plexus (MBSP).

Conclusions: Differential tissular composition of the urethra may underlie urinary continence and voiding dysfunction through different physiological mechanisms. The urethra-vagina complex seems to be the main site controlling urinary continence through active muscular mechanisms, while the bulbar urethra provides passive mechanisms and the urethra-clitoris complex seems to be crucial for distal urethral closure by means of a periurethral vascular network.

KEYWORDS

clitoris, female urethra, urethral gland, urinary incontinence

1 | INTRODUCTION

The urethra plays an important role in urinary continence and voiding. During urine storage, a tonic activity of the external urethral sphincter (EUS) contributes to urinary continence. During voiding, the urethra opens when bladder contraction occurs, so that a voiding event is efficient. In females, the urethra is anatomically related

with genital organs.¹ While in some species such as rabbits, the urethra opens into the vaginal lumen,² in rats, similar to women, the urethra opens into an external urinary meatus.

Despite of a separated urethral opening, the woman urethra is still related to genital organs. In fact, it is a matter of debate whether distal urethra, clitoris, and vagina are truly separated structures.¹

14. Congresos y reconocimientos



***Society for Neuroscience
Neuroscience 2012
October 13–17, 2012
New Orleans, LA***

Please let this serve to certify that

Jose Palacios Galicia, n/a

has attended Neuroscience 2012, the 42nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience at Ernest N. Morial Convention Center in New Orleans, LA.

The Society for Neuroscience (SfN) is a nonprofit membership organization of basic scientists and physicians who study the brain and nervous system. The Society's primary goal is to promote the exchange of information among researchers. For this purpose, SfN holds a prestigious annual meeting, attended by scientists and researchers from around the globe. It is considered the most important annual forum for the neuroscience research community, offering attendees the opportunity to learn about the latest advances in brain research and to meet and network with their colleagues at top destinations throughout the United States.

Staff Signature:

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Elizabeth Rumsey', is written over a light-colored background.

Elizabeth Rumsey
Assistant Director of Annual Meeting Program
Society for Neuroscience

Date: Tuesday, October 16, 2012



Certificate of Attendance

This certifies that

Jose Luis Palacios, MS

has participated in the 2015 Annual Meeting of the
American Urological Association
in New Orleans, LA May 15-19, 2015



American
Urological
Association

Education & Research, Inc.

The American Urological Association (AUA) designates this live activity for a maximum of 6.50 AMA PRA Category 1 Credit™.

Physicians should claim only the credit commensurate with the extent of their participation in the activity.

Accreditation: The American Urological Association (AUA) is accredited by the Accreditation Council for Continuing Medical Education (ACCME) to provide continuing medical education for physicians. It is the policy of the AUA to ensure that the content contained in this CME activity is valid, fair, balanced, scientifically rigorous, and free of commercial bias.



CURSO
Internacional
Bases Biológicas
de la Conducta

Otorga la presente
CONSTANCIA

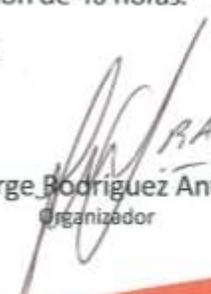
A José Luis Palacios Galicia, Margarita Juárez Romero,
Alfonso Medel Rojas y Yolanda Cruz Gómez

Por su participación con el cartel *Correlatos neuroanatómicos y conductuales de disfunción urinaria inducidos por la distensión vaginal en ratas*

XX Curso Internacional Bases Biológicas de la Conducta
Impartido del 9 al 13 de octubre, con una duración de 40 horas.

Tlaxcala, Tax., a 13 de octubre de 2015


Dra. Margarita Martínez Gómez
Organizadora


Dr. Jorge Rodríguez Antolín
Organizador



Certificate of Attendance

This certifies that

Jose Luis Palacios, MSc

has participated in the 2016 Annual Meeting of the
American Urological Association
in San Diego, CA on May 6-10, 2016



American
Urological
Association

Education & Research, Inc.

Michael Sheppard

The American Urological Association (AUA) designates this live activity for a maximum of 6.5 AMA PRA Category 1 Credits™.

Physicians should claim only the credit commensurate with the extent of their participation in the activity.

Accreditation: The American Urological Association (AUA) is accredited by the Accreditation Council for Continuing Medical Education (ACCME) to provide continuing medical education for physicians.
It is the policy of the AUA to ensure that the content contained in this CME activity is valid, fair, balanced, scientifically rigorous, and free of commercial bias.



Universidad Autónoma
de Tlaxcala

Universidad Autónoma de Tlaxcala

Otorga la presente



Constancia



A: José Luis Palacios Galicia, Margarita Juárez
Romero and Yolanda Cruz Gómez



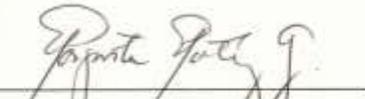
Por participar con el poster

“Time course of urinary continence and recovery of LUT reflexes
after vaginal distension in rats”



Celebrado en el marco de las actividades del 4th Workshop
“Urogenital Apparatus: Physiology and Pathophysiology”
Tlaxcala, Tlax., del 26 al 28 septiembre de 2016




Dra. Margarita Martínez Gómez
Coordinadora CTBC




Dra. Yolanda Cruz Gómez
Organizadora





Universidad Autónoma de Tlaxcala



Otorga la presente
Constancia



A: José Luis Palacios Galicia , Alvaro Muñoz , Margot S Damaser, Yolanda Cruz Gómez



Por participar con el poster:
“Transcutaneous electrical stimulation of the dorsal nerve of the clitoris facilitates functional recovery from stress urinary incontinence after vaginal distension in rats”



Celebrado en el marco de las actividades del 5th Workshop “Urogenital Apparatus: Neurogenic and degenerative pathologies Tlaxcala, Tlax; del 27 al 29 septiembre de 2017



Dra. Yolanda Cruz Gómez
Organizadora

Dra. Dora luz Corona-Quintanilla
Organizadora

Certificate of Attendance

This certifies that

Jose Luis Palacios, MSc

has participated in the 2018 Annual Meeting of the
American Urological Association
in San Francisco, CA, May 18-21, 2018



American
Urological
Association

Education & Research, Inc.

Michael Sheppard

The American Urological Association (AUA) designates this live activity for a maximum of 46.0 AMA PRA Category 1 Credit™. Physicians should claim only the credit commensurate with the extent of their participation in the activity. The American Urological Association (AUA) is accredited by the Accreditation Council for Continuing Medical Education (ACCME) to provide continuing medical education for physicians.



Universidad Autónoma de Tlaxcala



Otorga el presente

Reconocimiento

A: José Luis Palacios Galicia, Margarita Juárez Romero and Yolanda Cruz Gómez



Por haber obtenido el primer lugar con la presentación del poster

“Time course of urinary continence and recovery of LUT reflexes after vaginal distension in rats”



Celebrado en el marco de las actividades del 4th Workshop
“Urogenital Apparatus: Physiology and Pathophysiology”
Tlaxcala, Tlax., del 26 al 28 septiembre de 2016




Dra. Margarita Martínez Gómez
Coordinadora CTBC


Dra. Yolanda Cruz Gómez
Organizadora



Universidad Autónoma de Tlaxcala



Otorga la presente
Reconocimiento



A: José Luis Palacios Galicia



Por haber obtenido el primer lugar con la presentación del
poster



**“Transcutaneous electrical stimulation of the dorsal nerve of
the clitoris facilitates functional recovery from stress urinary
incontinence after vaginal distension in rats”**



Celebrado en el marco de las actividades del 5Th Workshop “Urogenital
Apparatus: Neurogenic and degenerative pathologies” Tlaxcala, Tlax; del 27 al 29
septiembre de 2017



Dra. Yolanda Cruz Gómez
Organizadora

Dra. Dora Luz Corona Quintanilla
Organizadora