



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Influencia de la Multiparidad en la Respuesta a la Electroestimulación de los Músculos del Piso Pélvico de la Coneja Doméstica

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Cecilia Hernández Bonilla

Codirectores

Dra. Margarita Martínez Gómez

Dr. Mario Romero Ortega

Tlaxcala, Tlax.

Agosto, 2022



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Influencia de la Multiparidad en la Respuesta a la Electroestimulación de los Músculos del Piso Pélvico de la Coneja Doméstica

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Cecilia Hernández Bonilla

Comité Tutorial

Dra. Margarita Martínez Gómez

Dr. Mario Romero Ortega

Dr. Ismael Jiménez Estrada

Dra. Dora Luz Corona Quintanilla

Tlaxcala, Tlax.

Agosto, 2022

Financiamiento

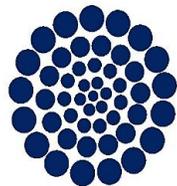
El proyecto de investigación de la presente tesis se efectuó en las instalaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx), Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Este trabajo fue financiado por el US National Institutes of Health (NIH 1 R01 DK120307-01), el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación de la UNAM (PAPIIT-UNAM IN212916 a MMG) y una beca de Doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 628536 a CHB). El Doctorado en Ciencias Biológicas de la UATx está registrado en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).



National Institutes
of Health



Programa de Apoyo a
Proyectos de Investigación e
Innovación Tecnológica
(PAPIIT)



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Universidad
Autónoma de
Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado



COORDINACIÓN DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
PRESENTE

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Cecilia Hernández Bonilla** realiza para la obtención del grado de **Doctora 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 **“Influencia de la multiparidad en la respuesta a la electroestimulación de los músculos del piso pélvico de la coneja doméstica”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., AGOSTO 22 DE 2022

DR. FRANCISCO CASTELAN

DR. RENÉ ZEMPOALTECA RAMÍREZ

DRA. DORA LUZ CORONA QUINTANILLA

DR. OCTAVIO SANCHEZ GARCÍA

DRA. MARÍA DE LOURDES ARTEAGA
CASTAÑEDA

Agradecimientos

Al Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Al apoyo recibido por el US National Institutes of Health (NIH 1 R01 DK120307-01), el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación de la UNAM (PAPIIT-UNAM IN212916 a MMG) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar el doctorado (CONACYT 628536 a CHB).

A mis Codirectores de tesis, la Dra. Margarita Martínez Gómez y el Dr. Mario Romero Ortega por su apoyo, motivación y conocimientos brindados para mi formación académica. Al comité tutorial por sus comentarios y sugerencias para la realización de la presente tesis. Gracias a los Dres. Ismael Jiménez Estrada, Dora Luz Corona Quintanilla, René Zempoalteca Ramírez y Francisco Castelán y al apoyo técnico de la QFB Laura García Rivera para el desarrollo de los experimentos.

A mis compañeros de laboratorio; gracias por su amistad y apoyo durante la realización de los experimentos.

Resumen

La gestación y el parto son considerados algunos de los factores de riesgo asociados con un aumento en la incidencia de desórdenes del piso pélvico (DPP) como la incontinencia urinaria (IU). La terapia de electroestimulación es un tratamiento tradicional para la IU de urgencia; sin embargo, hace falta establecer protocolos de estimulación para la IU de esfuerzo. En conejas multíparas (cuatro partos), la estimulación inalámbrica aguda de nervios perineales incrementa la presión intrauretral máxima y el volumen vesical incrementa la capacidad vesical probablemente al favorecer el cierre uretral. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar la presión intrauretral (PIU) y la presión intravaginal (PIV) generada por la EE de nervios perineales a diferentes frecuencias de estimulación y determinar la frecuencia óptima de estimulación para cada nervio. Conejas adultas nulíparas de la raza Chinchilla (n=18) fueron aleatoriamente distribuidas en tres grupos para estimular el nervio bulboesponjoso (nBe, n=6), el nervio isquiocavernoso (nIs, n=6) y el nervio clítoral (nCl, n=6; control no específico). Se aplicaron pulsos eléctricos cuadrados simples y trenes de estimulación de frecuencia ascendente (1-80 Hz) con una duración de 4 segundos cada una. Para determinar diferencias significativas se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía con una $P \leq 0.05$, y una prueba post-hoc de Tukey. La EE del nCl incrementó significativamente la PIU ($P=0.0004$) y la PIV ($P < 0.0001$) en comparación con la estimulación del nBe y el nIs probablemente por la actividad refleja de diferentes músculos estriados relacionados con el aparato urogenital. A partir de 5 Hz, la EE del nBe y el nCl incrementaron la PIU y está se mantuvo constante hasta 80 Hz. Mientras la EE del nIs incrementó la PIU a partir de 20 Hz y se mantuvo constante de 40-80 Hz. La PIV incrementó a medida que se aumentó la frecuencia de estimulación independientemente del nervio estimulado. Los resultados sugieren que la EE de nervios perineales pueden ser un potencial terapéutico para la neuromodulación del piso pélvico facilitando el cierre uretral para mantener la continencia urinaria.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aparato urogenital inferior y musculatura estriada del piso pélvico femenino.....	3
1.2 Inervación del aparato urogenital inferior y de la musculatura estriada del piso pélvico.....	9
2. ANTECEDENTES	13
2.1 Efecto de la multiparidad sobre la musculatura estriada del piso pélvico y su inervación	13
2.2 Tratamientos de electroestimulación.....	16
2.2.1 Electroestimulación de la raíz nerviosa sacra.....	17
2.2.2 Electroestimulación del nervio tibial.....	21
2.2.3 Electroestimulación del nervio pudendo.....	24
2.3. Modelo de estudio: La coneja doméstica (<i>Oryctolagus cuniculus</i>).....	28
2.3.1 Anatomía e inervación de los músculos estriados perineales.....	30
2.3.2 Participación funcional de los músculos estriados perineales durante la micción.....	33
2.3.3 Efecto de la multiparidad sobre los músculos estriados perineales.....	36
3. JUSTIFICACIÓN	41
4. HIPÓTESIS	43
5. OBJETIVOS	43
5.1 Objetivo general.....	43
5.2. Objetivos específicos.....	43
6. METODOLOGÍA	44
6.1 Experimento I. Caracterización de los parámetros de estimulación eléctrica del nIsc, el nBe y el nCli en conejas nulíparas.....	45
6.1.1 Umbral de estimulación.....	45
6.1.2 Fuerza mecánica contráctil del mIsc y el mBe en respuesta a la estimulación eléctrica del nIsc y el nBe.....	46
6.1.3 PIU y PIV en respuesta a la estimulación eléctrica de los nervios perineales.....	47
6.2. Experimento II. Efecto de la multiparidad sobre los parámetros de estimulación eléctrica del nBe en conejas adultas.....	48
	49

6.3 Análisis estadístico.....	50
7. RESULTADOS.....	50
7.1 Edad y peso corporal de conejas nulíparas.....	50
7.2 Características morfofisiológicas de los nervios perineales de conejas nulíparas.....	52
7.2.2 Umbral de estimulación.....	54
7.3 Fuerza mecánica contráctil del mIsc y el mBe en respuesta a la estimulación eléctrica del nIsc y el nBe en conejas nulíparas.....	57
7.4 Presión intrauretral en respuesta a la estimulación eléctrica de los nervios perineales en conejas nulíparas.....	59
7.5 Presión intravaginal en respuesta a la estimulación eléctrica de los nervios perineales en conejas nulíparas.....	62
7.6 Edad y peso corporal de conejas múltiparas vs nulíparas.....	63
7.7 Características morfofisiológicas del nBe en conejas múltiparas vs nulíparas.....	63
7.7.1 Diámetro de los nervios perineales.....	63
7.7.2 Umbral de estimulación.....	64
7.8 Fuerza mecánica contráctil del mBe en respuesta a la estimulación eléctrica del nBe en múltiparas vs nulíparas.....	67
7.9 Presión intrauretral en respuesta a la estimulación eléctrica del nBe en conejas múltiparas vs nulíparas.....	69
7.10 Presión intravaginal en respuesta a la estimulación eléctrica del nBe en conejas múltiparas vs nulíparas.....	72
8. DISCUSIÓN.....	84
9. CONCLUSIONES.....	84
11. PERSPECTIVAS.....	85
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
13. PUBLICACIONES.....	103

1. INTRODUCCIÓN

La multiparidad se considera como una serie de procesos reproductivos que incluyen más de dos episodios de cópulas, gestaciones, partos y lactancias. La reproducción en hembras de mamíferos implica un alto costo energético y riesgos para la salud. En mujeres, el costo de tal adecuación se encuentra asociado con disfunciones del piso pélvico (Pereira y cols. 2016). Debido a que durante los múltiples eventos de gestación, parto y lactancia hay cambios fisiológicos que pueden afectar a los órganos del aparato urogenital y los músculos estriados del piso pélvico (MPP) involucrados en procesos reproductivos y de almacenamiento y excreción de orina. Los MPP son determinantes para las funciones del aparato urogenital inferior; debido a que cambios mecánicos y hormonales que ocurren durante la gestación, así como la tensión mecánica durante el parto, ocasionan lesiones directas en el tejido muscular y nervioso del piso pélvico (Memon y Handa, 2014). Las estructuras del piso pélvico son inervadas principalmente por nervios autonómicos, como el nervio pélvico, y somáticos, como el pudendo. El nervio pudendo es un nervio mixto que inerva el periné, el complejo esfintérico (esfínter externo de la uretra o rabdoesfínter, compresor uretral y esfínter uretrovaginal), la piel perigenital y los músculos perineales. El nervio pudendo participa en la regulación de procesos como la continencia urinaria, permitiendo la contracción del complejo esfintérico durante el almacenamiento, su inhibición y activación de los músculos perineales durante la expulsión de orina. Sin embargo, debido a su disposición anatómica por el arco isquiático de la pelvis durante la gestación y el parto puede sufrir algún daño, principalmente si el bebé es grande y de mayor peso, su paso por el canal vaginal prolongaría la segunda fase del parto y podría comprimir y/o romper su inervación (Allen y cols. 1990). Durante la gestación y el parto, los componentes del piso pélvico, entre ellos los MPP son los que más daño sufren durante la vida reproductiva femenina. Los componentes del piso pélvico están constituidos por la pelvis, los músculos estriados y tejido conectivo. Estos tres componentes proveen una estructura base para el sostén de las vísceras pélvicas (útero, vagina, vejiga y recto). La interacción entre los MPP y perineales, aparte del sostén anatómico que proporcionan a las vísceras del aparato urogenital, también participan en funciones del aparato urogenital inferior. Debido a la disposición anatómica del aparato urogenital inferior y los MPP en las hembras de mamíferos, procesos reproductivos

como las múltiples gestaciones y los partos dañan a este conjunto de músculos estriados (Huser y cols. 2012).

En el embarazo ocurren cambios hormonales y biomecánicos, así como el aumento en peso y tamaño del feto durante las últimas semanas de gestación ejerce una mayor presión sobre los MPP. Mientras, durante la segunda fase de labor del parto, las fibras musculares y/o nervios del piso pélvico pueden padecer compresión o sobredistensión hasta romperse y permitir el descenso progresivo de la cabeza fetal a través de la dilatación completa del cérvix. De manera que, durante la prolongación de la segunda fase de parto se ocasionaría el daño a los MPP. Desde un punto de vista mecánico, la multiparidad (considerada como las múltiples gestaciones y partos) factor de riesgo que se asocia con la presencia de desórdenes del piso pélvico, debido a las alteraciones en el aparato urogenital inferior y en los MPP (Lien y cols. 2004). Durante los partos, la repetida exposición a lesiones traumáticas que padecen los nervios del piso pélvico promovería la aparición de patologías asociadas a la experiencia reproductiva, como el prolapso de vísceras pélvicas (descenso de vejiga y vagina), partos distócicos (retención del producto durante el parto), vaginismo, incontinencia urinaria y fecal (salida involuntaria de orina y excremento) (Pereira y cols. 2016). Patologías femeninas con altos porcentajes de prevalencia y con impacto negativo en su calidad de vida. Para reducir estas afectaciones, se utilizan diversos tratamientos, como la estimulación eléctrica o electroestimulación de los MPP y/o nervios (Aoki y cols. 2017).

La electroestimulación de la raíz nerviosa sacra (principalmente S3) o de nervios periféricos de la región lumbosacra son una opción de tratamientos alternativos para pacientes con vejiga hiperactiva (VH), incontinencia urinaria de urgencia (IUU) y retención urinaria no obstructiva. Esta terapia puede suprimir sensaciones viscerales anormales, reflejos involuntarios y restaurar el control voluntario, pero con reducidas probabilidades de éxito. Posiblemente, esto se debe a que el mecanismo de acción no está completamente comprendido, ni definido para algún desorden del piso pélvico, en específico (Ammi y cols. 2014).

1.1 Aparato urogenital inferior y musculatura estriada del piso pélvico femenino

El aparato urogenital inferior femenino está constituido por los riñones, la vejiga urinaria, la uretra, los ovarios, las trompas de Falopio, el útero, la vagina y la vulva. Los órganos pélvicos como la vagina, la vejiga urinaria y la uretra se encuentran en estrecha relación anatómica con musculatura estriada del piso pélvico. En conjunto estas estructuras actúan como un sistema complejo que requiere de un fino control nervioso para llevar a cabo funciones reproductivas (cópula, fertilización, gestación y parto) y no reproductivas (continencia y expulsión de orina) (Drakey cols. 2005).

La vagina es un conducto fibromuscular que se extiende desde el cuello uterino o cérvix hasta la vulva. Anatómicamente, la pared anterior de la vagina está relacionada con la base de la vejiga urinaria y con la uretra (Drake y cols. 2005). Histológicamente, la vagina está compuesta por tres capas: la capa superficial formada por epitelio escamoso estratificado y lámina propia. La capa media está constituida por musculatura lisa y la capa más externa, es la adventicia formada por tejido conectivo, vasos sanguíneos y nervios (De Landsheere y cols. 2013).

La vejiga urinaria y la uretra son un conjunto de estructuras interrelacionadas que permiten el almacenamiento y la expulsión de la orina. La vejiga urinaria es un órgano muscular donde se acumula la orina que llega por los uréteres y en ella permanece hasta su expulsión. Presenta dos regiones: el cuerpo y el cuello vesical. En el cuerpo se almacena la orina y en el cuello vesical se localiza el trígono, una estructura triangular donde desembocan los uréteres (Quiroz 2004). El cuello vesical se une a la uretra, una estructura tubular que termina en el meato urinario externo. Histológicamente, la pared vesical está constituida por tres capas: la serosa, la muscular (músculo detrusor) y la mucosa. En la mujer, la vejiga urinaria se ubica sobre el piso pélvico, dorsal al pubis y ventral al útero, el cérvix y la vagina (Dávila y cols. 2006).

La uretra es un conducto fibromuscular que permite la continencia y la evacuación de la orina desde la vejiga urinaria hasta el meato uretral externo. La uretra femenina mide de tres a cuatro centímetros de largo y es aproximadamente de cinco milímetros de diámetro, comienza en el meato uretral interno de la vejiga urinaria y termina en el meato uretral externo entre el clítoris y la apertura de la vagina (DeLancey 2000). La pared uretral está formada por tres capas: la mucosa, la submucosa y la muscular. La mucosa es una capa de epitelio escamoso

estratificado. La submucosa está constituida por tejido conectivo y un prominente plexo arteriovenoso. El plexo vascular presenta vasos sanguíneos orientados longitudinalmente con abundantes arterias, grandes arteriolas y venas de paredes delgadas. Se cree que la abundante red vascular contribuye en la formación de un sello hermético a través de la coaptación de las superficies de la mucosa para mantener el cierre uretral (DeLancey y Ashton-Miller 2004). Finalmente, la capa muscular rodea el plexo vascular y está constituida por musculatura lisa y estriada. El músculo liso está constituido por una capa interior gruesa de fibras musculares orientadas longitudinalmente que a su vez es rodeada por una capa delgada de fibras musculares con orientación circular. El músculo liso comienza en el cuello vesical y se extiende a lo largo de la uretra. Se sugiere que el músculo liso orientado de manera longitudinal acorta y aumenta el diámetro de la luz uretral durante la expulsión de orina; mientras que la contracción de la musculatura lisa circular cierra el lumen uretral. La capa de musculatura lisa circular es más prominente en la región de la uretra media; sus fibras se entremezclan con las fibras circulares de musculatura estriada interna del rabdoesfínter uretral (DeLancey y Ashton-Miller 2004, Ashton-Miller & DeLancey 2007, Pipitone y cols. 2021).

La musculatura estriada relacionada con la uretra y relevante para el proceso de continencia urinaria se denomina complejo esfintérico. Este complejo muscular está constituido por tres porciones, el rabdoesfínter uretral, el compresor uretral y el esfínter uretrovaginal. Estos músculos son continuos y se extienden desde la base de la vejiga urinaria que se encuentra dentro de la cavidad pélvica y continúan a través del hiato urogenital del diafragma pélvico para extenderse alrededor de la vagina en la membrana perineal (Oelrich 1983, Hinata y Murakami 2014).

El músculo rabdoesfínter uretral rodea el lumen uretral formando un anillo circular con apariencia de rafe en la línea dorsal media, encontrándose más engrosado en el tercio medio de la uretra. Sus fibras musculares estriadas están dispuestas en una configuración circular rodeando el músculo liso de la pared uretral. Las fibras estriadas circulares internas se entremezclan con una gran cantidad de tejido conectivo y fibras lisas circulares de la uretra (Oelrich 1983, Thor y De Groat 2010). Para los humanos, el músculo rabdoesfínter uretral está compuesto principalmente por fibras tipo I (contracción lenta) que son adecuadas para mantener el tono constante y en menor proporción fibras de tipo II (contracción rápida) (Rodríguez-Vega

y cols. 2005). Este arreglo es fundamental para la generación de la presión intrauretral (PIU) necesaria para mantener la continencia urinaria (Shefchyk 2002). Por lo tanto, la musculatura lisa y estriada, así como el tejido conectivo y vascular dentro del tejido uretral contribuyen a mantener el cierre uretral (Pipitone y cols. 2021).

El compresor uretral y el esfínter uretrovaginal consisten en dos bandas delgadas de músculo estriado que se arquean sobre la superficie anterior del tercio distal de la uretra, adyacente a la membrana perineal. El compresor uretral continua en el borde inferior del rabdoesfínter uretral. Se origina a cada lado en la rama isquiática y forma un arco en la pared ventral de la uretra y rodea la parte distal. El esfínter uretrovaginal surge de la pared lateral de la vagina y sus fibras se entremezclan ventralmente con el compresor uretral. Este músculo rodea la parte distal de la uretra y parte de la vagina pélvica, por lo tanto, actúa como un esfínter uretral y vaginal (Jung y cols. 2012) (Figura 1).

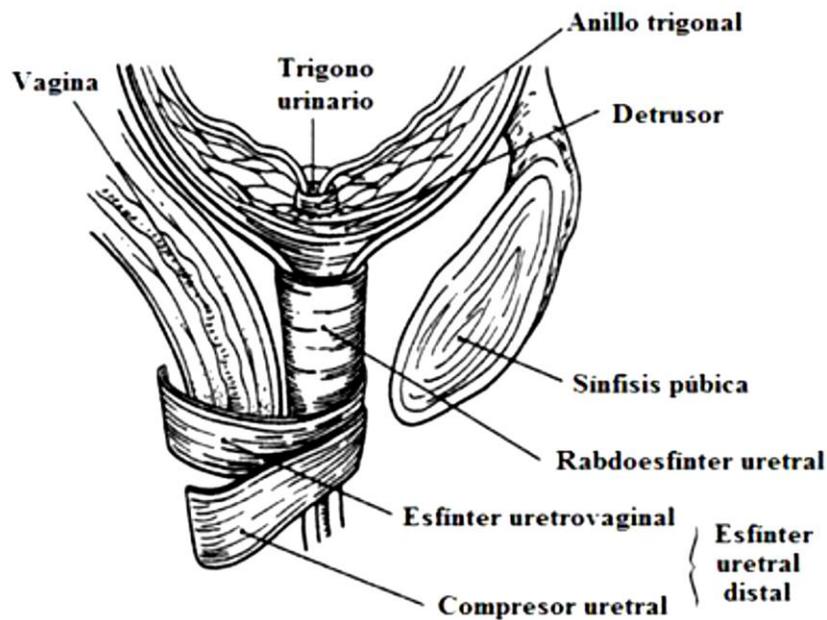


Figura 1. Organización anatómica del esfínter urogenital estriado. Localización anatómica de sus tres componentes: el rabdoesfínter uretral, el compresor uretral y el esfínter uretrovaginal. Este complejo muscular contribuye en la generación de la presión uretral y vaginal necesaria para mantener la continencia urinaria (tomado de Haab y cols. 2001).

La contracción del compresor uretral y esfínter uretrovaginal contribuyen al aumento de la PIU y la presión intravaginal (PIV) para prevenir la fuga de orina durante aumentos repentinos de presión intra-abdominal. El funcionamiento apropiado de la uretra depende de la integridad anatómica y fisiológica de sus componentes estructurales, incluida la musculatura estriada del esfínter urogenital estriado y los MPP. Ambos complejos musculares son necesarios para la generación de PIU y PIV (Oelrich 1983).

Los MPP están constituidos fundamentalmente por el elevador del ano o *levator ani* (LAN) que consta de tres músculos (pubococcígeo, iliococcígeo y puborectalis) y el coccígeo (Ashton-Millaer y DeLancey 2007). El músculo pubococcígeo (Pc) también llamado pubovisceral se origina en la parte posterior del hueso púbico y en la porción anterior del arco tendinoso (estructura densa de tejido conectivo que corre desde la rama púbica a la espina isquiática a lo largo de la superficie del músculo obturador interno) y se inserta en el ligamento anococcígeo y el cóccix. El músculo iliococcígeo se origina en la parte posterior del arco tendinoso y espina isquiática y se inserta a lo largo del rafe anococcígeo y el cóccix. El músculo puborectalis se origina en la sínfisis púbica, sus fibras pasan por detrás del recto y forman un anillo alrededor de la vagina, el recto y el cuerpo perineal. Este músculo promueve el cierre del hiato urogenital (espacio entre la musculatura estriada del LAN a través de la cual pasa la vagina, la uretra y el recto) y contribuye en la continencia (Drake y cols. 2005). Finalmente, el músculo coccígeo atraviesa la cavidad pélvica como una hamaca en posición dorsal respecto al LAN. Se inserta en la cara interna y bordes de la espina ciática y en el ligamento sacrociático por fuera y en el borde del cóccix por dentro (Barber 2004) (Figura 2). El tipo de fibras de estos músculos estriados son predominantemente de contracción lenta (tipo I) y en menor proporción de contracción rápida (tipo II) (Morrison 2001). La contracción voluntaria de los MPP mantiene cerrado el hiato urogenital comprimiendo la vagina, la uretra y el recto hacia el hueso púbico, elevando así los órganos pélvicos. Esto es importante para evitar pérdidas involuntarias de orina cuando un individuo realiza algún esfuerzo físico como el toser, reír o estornudar, debido a que se incrementa repentinamente la presión intra-abdominal, a este reflejo se le denomina guardián (Shefchyk 2002). Por lo tanto, la contracción de los MPP contribuye a incrementar la PIU y la PIV (Teleman y Mattiasson 2007). Además, los MPP participan en la respuesta sexual debido a que la distensión vaginal produce que los músculos se contraigan y faciliten el acto sexual

denominándose el reflejo vagino-levator. Por lo tanto, los MPP participan en funciones reproductivas (cópula y parto) y no reproductivas (continencia y expulsión de orina) (Shafik 1995).

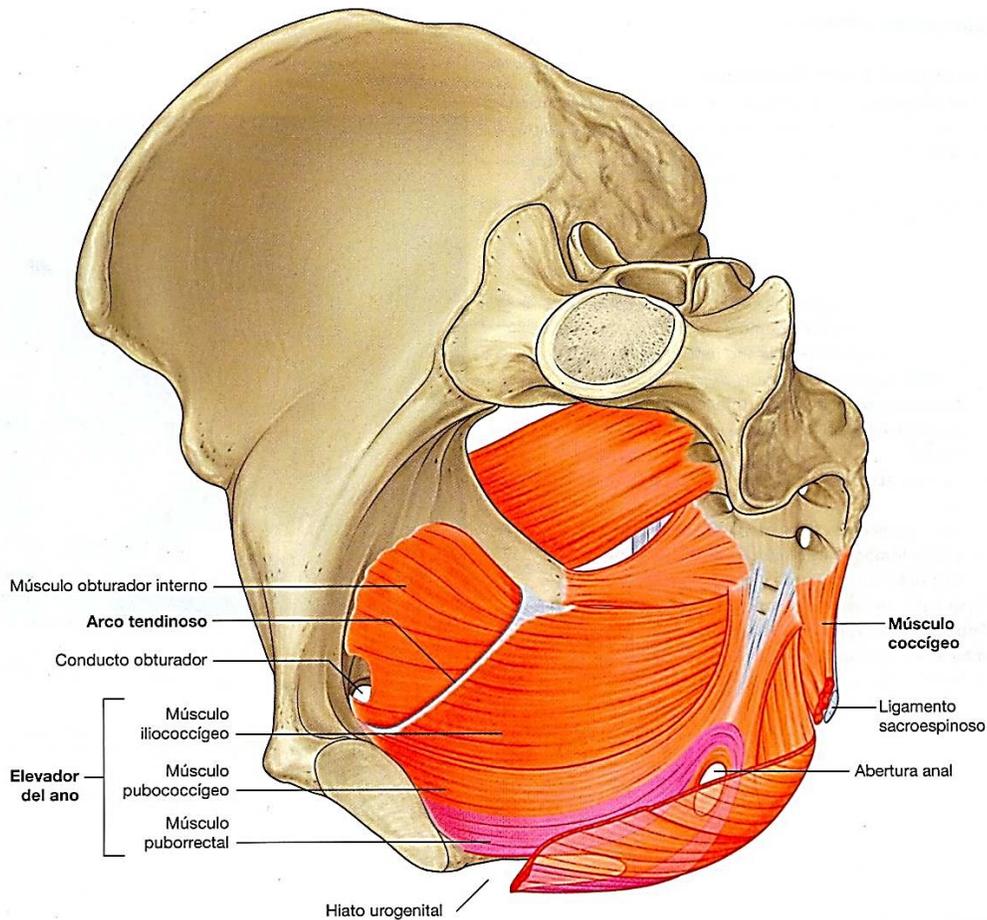


Figura 2. Diafragma pelviano. Vista lateral de los músculos del elevador del ano y el músculo coccígeo. Estos músculos estriados forman una especie de hamaca, entre el pubis en la parte anterior de la pelvis y el cóccix en la parte posterior (Drake y cols. 2005).

En la parte caudal de la cavidad pélvica y fuera de la pelvis se localiza la región perineal, donde desemboca la vagina, la uretra, el ano, los genitales externos y los músculos estriados perineales como el músculo bulboesponjoso (mBe) y el isquiocavernoso (Isc). Ambos músculos funcionan como sostén de la parte distal de la vagina y uretra (Drake y cols. 2005). El mIsc se origina en la tuberosidad y rama isquiática y se inserta en el clítoris. Este músculo cubre la

porción superior de los labios en la vulva femenina rodeando la crura del clítoris. El mBe se origina en el centro tendinoso del periné y se inserta en los cuerpos cavernosos del clítoris. La contracción de sus fibras ejerce presión sobre la región distal de la vagina y se mantiene constante durante un estornudo o durante un esfuerzo físico (Drake y cols. 2005) (Figura 3).

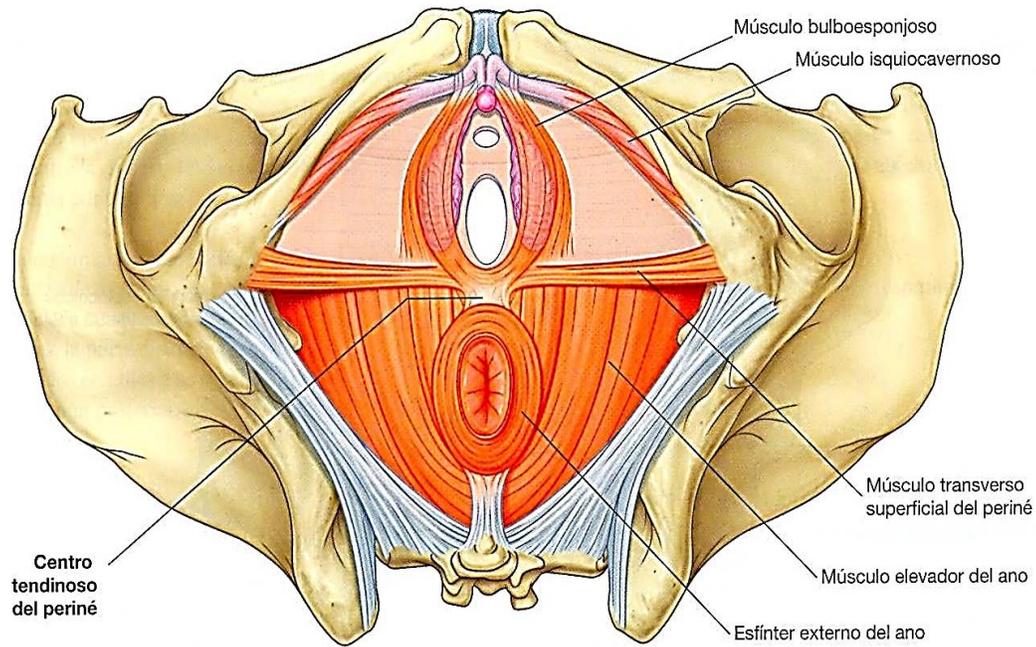


Figura 3. Músculos estriados perineales. Vista ventral de la región perineal femenina y los músculos estriados perineales. El mIsc rodea el clítoris y el mBe rodea la entrada de la vagina (Drake y cols. 2005).

Los músculos perineales se contraen reflejamente en respuesta a la estimulación mecánica de la vagina. Esta respuesta se ha denominado el reflejo vaginocavernoso y se ha propuesto que la contracción de los músculos participa en la erección del clítoris y reduce el diámetro vaginal durante el apareamiento facilitando la respuesta sexual. Durante el parto, pueden prevenir que la cabeza del feto se deslice rápidamente del cérvix hacia el exterior evitando así el desgarramiento de la entrada vaginal (Shafik 1993). También, se ha propuesto que los músculos perineales incrementan la PIV y reducen el diámetro vaginal para prevenir el prolapso uterino durante repentinos aumentos de presión intra-abdominal (Shafik y cols. 2002). Además, facilitan la expulsión de orina, posiblemente como parte del reflejo uretro-vesical

donde las aferentes uretrales activadas por el paso de orina a través de la uretra desencadenan la actividad sincronizada de los músculos perineales promoviendo la contracción vesical (Shafik y cols. 2007).

La región pélvica femenina es un sistema complejo constituido por vísceras del aparato urogenital y musculatura estriada pélvica y perineal con su respectiva inervación. La relación anatómica entre los órganos pélvicos y la musculatura estriada requiere de un fino control nervioso para llevar a cabo funciones reproductivas y urinarias. Los músculos pélvicos y perineales desempeñan un importante papel en el soporte y funcionamiento del aparato urogenital en hembras de varias especies de mamíferos, incluidas las mujeres. En funciones como la micción, la actividad de la musculatura estriada del piso pélvico se encuentra regulada por el sistema nervioso somático y autonómico (Baber 2005, Birder y cols. 2010).

1.2 Inervación del aparato urogenital inferior y de la musculatura estriada del piso pélvico

La inervación del aparato urogenital inferior y de la musculatura estriada del piso pélvico se origina en los segmentos torácicos y lumbosacros de la médula espinal. Las vías aferentes y eferentes viajan principalmente por tres nervios: el hipogástrico, el pélvico y el pudendo. Estos nervios representan importantes vías en el control nervioso de diversos procesos fisiológicos como la continencia y expulsión de orina (de Groat y cols. 2015).

La vagina rostral y el cérvix reciben control nervioso del plexo úterovaginal, mientras que la porción caudal se encuentra bajo control del plexo hipogástrico inferior o plexo vaginal, y del nervio pudendo. La uretra se encuentra inervada por el nervio hipogástrico y el nervio pudendo; mientras que la vejiga urinaria recibe inervación del nervio pélvico (de Groat y cols. 2015).

El nervio hipogástrico se origina en la décima torácica y segunda vértebra lumbar (T10-L2) de la médula espinal. Las neuronas preganglionares simpáticas hacen sinapsis en los ganglios paravertebrales, prevertebrales (ganglio mesentérico inferior y ganglio pélvico mayor) o paraviscerales con las neuronas postganglionares simpáticas. Estos axones inervan la base de la vejiga urinaria y la uretra. Durante el almacenamiento de la orina, las neuronas posganglionares simpáticas liberan noradrenalina que activa los receptores β_3 adrenérgicos para relajar el músculo detrusor de la vejiga urinaria y a su vez activa los receptores α_1 adrenérgicos

para contraer el músculo liso del cuello vesical y de la uretra con la finalidad de contribuir al cierre uretral. Asimismo, los elementos vasculares de la uretra como el plexo arteriovenoso localizado en el interior de la submucosa uretral contribuyen en la formación de un sello hermético para ocluir el lumen uretral (Ashton-Miller y DeLancey 2007).

El nervio pélvico se origina en los segmentos sacros (S2-S4) de la médula espinal. Sus neuronas preganglionares parasimpáticas hacen sinapsis en el ganglio pélvico mayor, en los ganglios vesicales e intramurales de la uretra con las neuronas postganglionares parasimpáticas. Sus axones inervan el músculo liso (detrusor) de la vejiga urinaria. Durante la expulsión de orina, las neuronas posganglionares parasimpáticas liberan acetilcolina (Ach) para estimular los receptores muscarínicos y que promueven la contracción del músculo detrusor. El inicio de la expulsión de la orina requiere de la contracción vesical en coordinación con la relajación de la musculatura lisa del cuello vesical y de la uretra, así como del rabdoesfínter uretral y de los MPP (Fowler y cols. 2008, de Groat y cols. 2015).

El nervio pudendo se origina principalmente de las raíces nerviosas sacra (S2-S4). El tronco principal del nervio pasa detrás del ligamento sacroespinoso en la parte ventral del músculo coccígeo y sobre la espina isquiática a través del foramen ciático menor para dirigirse a través del canal pudendo en la superficie lateral del músculo obturador interno. Antes de salir del canal pudendo se divide en tres ramas principales: el nervio rectal inferior (que inerva el esfínter externo del ano y la piel perineal), el nervio perineal (que inerva el rabdoesfínter uretral, el mBe, el mIsc, el músculo perineal transverso superficial y la piel de los labios vaginales) y el nervio dorsal del clítoris. Las ramas del nervio perineal son más superficiales que el nervio dorsal del clítoris y en la mayoría de los casos viaja sobre la superficie de la musculatura perineal (Barber y cols. 2002, Thor y de Groat 2010) (Figura 4).

Las motoneuronas del músculo rabdoesfínter uretral se localizan en la asta ventral de la sustancia gris de la médula espinal sacra específicamente en el núcleo Onuf. Sus axones liberan Ach que promueve la contracción de los músculos perineales al activar los receptores nicotínicos. La contracción del músculo rabdoesfínter es fundamental para el cierre uretral durante la continencia urinaria (Shefchyk 2002). Dado que el nervio pudendo se compone de algunas aferentes uretrales, genitales y cutáneas, se puede activar reflejamente el rabdoesfínter por estimulación eléctrica de sus aferentes para desencadenar el reflejo guardián. Por lo tanto,

la estimulación del nervio dorsal del clítoris inhibe la contracción vesical. Por otra parte, el paso de orina a través de la uretra estimula mecanorreceptores ubicados en la pared uretral que envían la información sensorial a través de sus aferentes a la médula espinal. La información eferente somática es enviada a través del nervio pudendo para contraer reflejamente el mIsc y el mBe favoreciendo un eficiente vaciamiento vesical (Peng y cols. 2008).

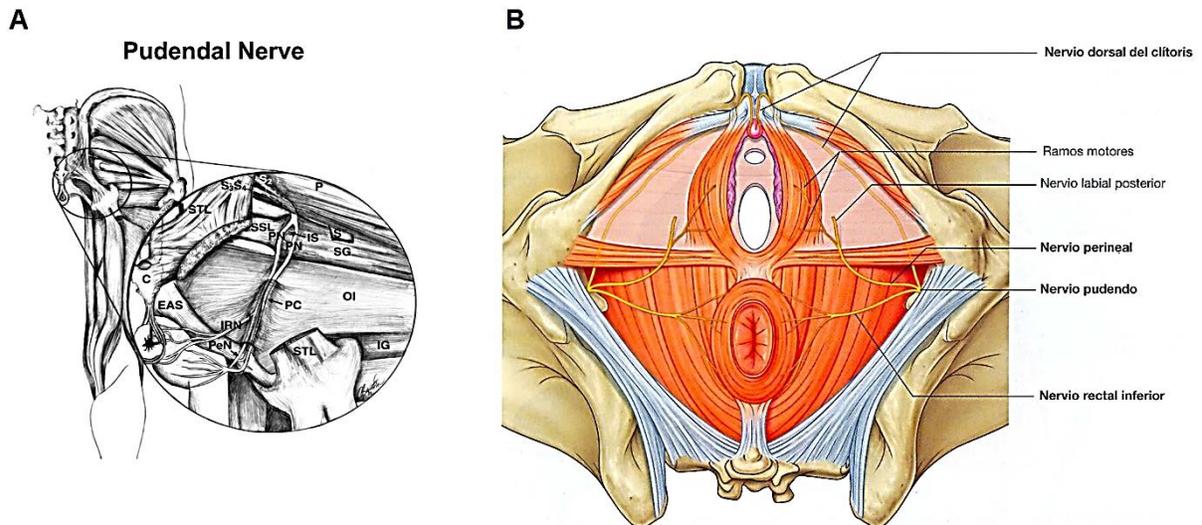


Figura 4. Anatomía del nervio pudendo en la mujer. A) Dibujo de una vista posterior de los músculos de la cadera que muestran el trayecto del nervio pudendo (PN) desde las raíces nerviosas sacra (S2-S4) a través de la superficie lateral del músculo gemelo superior (SG) y el músculo obturador interno (OI) a través del canal pudendo (PC) y su ramificación en el nervio rectal inferior (IRN) y el nervio perineal (PeN). P, músculo periforme; STL, ligamento sacrotuberoso; SSL, ligamento sacroespinoso; S, nervio ciático; EAS, esfínter anal externo; IG, músculo gemelo inferior. B) Vista ventral de la trayectoria de las tres principales ramas del nervio pudendo (Drake y cols. 2005, Thor y de Groat 2010).

Los músculos estriados del LAN están inervados por el nervio *levator ani*. Este nervio se origina principalmente de las raíces espinales sacras (S3-S5) y viaja a lo largo de la superficie intrapélvica de los músculos del LAN con un alto grado de variabilidad en los patrones de ramificación. Sus motoneuronas se encuentran ubicadas en la asta ventral de la sustancia gris de la médula espinal sacra. Durante el almacenamiento de la orina, el LAN se contrae para incrementar la PIU durante incrementos repentinos de presión intra-abdominal. La integridad de esta vía asegura la continencia urinaria (Barber y cols. 2002, Thor y DeGroat 2010) (Figura 5).

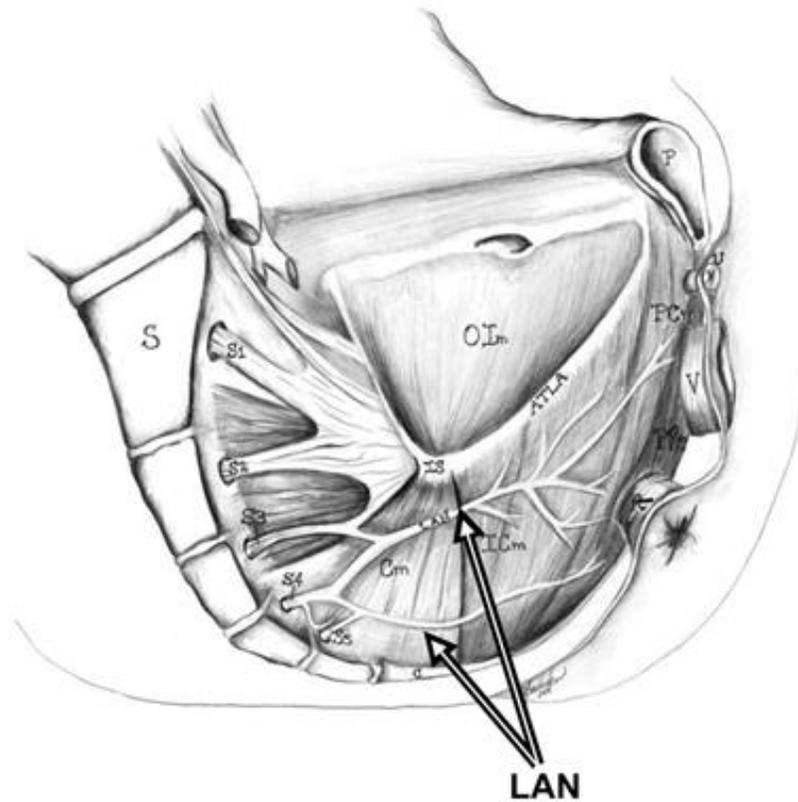


Figura 5. Anatomía del nervio *LAN* en la mujer. Dibujo sagital de la superficie medial del piso pélvico de la mujer que muestra el curso del nervio *LAN* desde las raíces sacras (S3-S5) a través de la superficie interna del músculo coccígeo (Cm), iliococcígeo (ICm), puborectalis (PRm) y el pubococcígeo (PCm). S, sacro; C, cóccix; IS, espina isquiática; OIm, músculo obturador interno; U, uretra; V, vagina; R, recto (Tomado de Thor y DeGroat 2010).

La información antes mencionada muestra que la inervación del aparato urogenital y de la musculatura estriada del piso pélvico involucra una compleja red de vías nerviosas que sustentan la activación de reflejos de diversos tipos que participan en el control de funciones urinarias. Sin embargo, la relación anatómica del aparato urogenital y la musculatura estriada asociada, procesos reproductivos como las múltiples gestaciones y partos pueden dañar dichas estructuras, así como su inervación (Memon y Handa 2014). Diversos estudios epidemiológicos en mujeres han asociado el parto como uno de los principales factores que causa daño a la musculatura estriada del piso pélvico y su inervación (Pereira y cols. 2016).

2. ANTECEDENTES

2.1 Efecto de la multiparidad sobre la musculatura estriada del piso pélvico y su inervación

La multiparidad se considera como la experiencia reproductiva que incluye, al menos, dos cópulas, gestaciones, partos y lactancias. Los períodos de gestación, número de partos y fluctuación hormonal en el ciclo de vida femenino pueden dañar el complejo de músculos estriados del piso pélvico (MPP) relevantes para la generación de la PIU y la PIV (Memon y Handa 2014, Pereira y cols. 2016).

Durante la gestación ocurren cambios hormonales y biomecánicos, como el incremento de peso y tamaño del feto, en las últimas semanas de gestación puede causar daño a los componentes del piso pélvico, como la musculatura y su inervación. Mecánicamente, los MPP están sometidos a presión continua y prolongada debido al agrandamiento del útero, especialmente, en el tercer trimestre de gestación. El incremento en la presión intraabdominal resulta en la compresión y tensión de los MPP, lo que afecta su integridad conlleva a la ruptura de algunas fibras musculares y nerviosas (Ashton-Miller y DeLancey 2009). Asimismo, el aumento o disminución de las concentraciones hormonales afecta la composición bioquímica de la matriz extracelular de cada uno de los componentes del piso pélvico. Los mecanismos de remodelación conducen a cambios en la organización, orientación y diámetro de las fibras de colágeno, tales modificaciones pueden afectar las propiedades viscoelásticas de la pared vaginal y de los MPP. Si se debilitan los MPP, la vagina y los ligamentos de soporte que mantienen a la vejiga urinaria se modifica la posición anatómica de este órgano lo que provoca una mayor presión sobre ella (Rahn y cols. 2008).

Durante la segunda fase de parto, las fibras musculares y/o nervios del piso pélvico se distienden longitudinalmente para permitir el descenso progresivo de la cabeza del feto, a través del canal vaginal. De manera que, sí la segunda fase de trabajo de parto se prolonga causa daño a los MPP y a su inervación (Yan y cols. 2015). Para identificar la relación entre el período de distensión o estiramiento máximo de los MPP; Lien y cols. (2004) desarrollaron un modelo geométrico en 3D de los MPP, esto con el fin de predecir su estiramiento máximo durante la segunda fase del parto. Se determinó que el estiramiento de los MPP es proporcional al tamaño de la cabeza del feto y se encontró que el músculo pubovisceral se somete a un gran estiramiento

durante el parto. Por lo tanto, parece estar en mayor riesgo de sufrir lesión muscular y nerviosa. También se utilizó un modelo geométrico para predecir el estiramiento de los nervios que inervan los MPP, la uretra y el esfínter anal durante la segunda etapa del parto. Los resultados mostraron que la rama rectal inferior exhibe una tensión máxima del 35%, la tensión de la rama del nervio perineal, que inerva el esfínter anal, alcanzó el 33% mientras que las ramas que inervan los labios posteriores y el esfínter uretral alcanzaron valores del 15% y 13% respectivamente. Concluyéndose que el nervio que inervan el esfínter anal se estira más allá de su umbral de tensión (15%) que se sabe causa daño permanente en el nervio. Tal distensión excede el límite fisiológico que los tejidos pueden sostener predisponiéndolos a lesión muscular y nerviosa (Lien y cols. 2005).

Diversos estudios en mujeres han asociado el parto como uno de los principales factores que causa denervación de los MPP. El parto vaginal se asocia con daño al nervio pudiendo de forma parcial o por ruptura total. Estudios electromiográficos han demostrado que el parto provoca un incremento en la duración de la latencia terminal motora (LTM) del nervio pudiendo en el 42% de las mujeres después de 48-72 horas postparto (Snooks y cols. 1985, Snooks y cols. 1990). Sin embargo, a los 2 meses postparto la duración de la LTM regresó a sus valores normales en sólo el 60% de las mujeres (Snooks y cols. 1990). En otro estudio se encontró evidencia de denervación parcial de los MPP con consiguiente reinervación en el 80% de las mujeres después 6 meses postparto. Para algunas mujeres, el grado de denervación puede ser leve, pero en otras hay daño severo que puede estar asociado con la pérdida de control del esfínter uretral. El daño al nervio pudiendo puede dar lugar a la desmielinización las fibras nerviosas hasta su ruptura axonal. Dado su ubicación anatómica superficial en la pelvis femenina, el nervio pudiendo está en riesgo de sufrir daño durante el parto (Allen y cols. 1990). La lesión por aplastamiento y estiramiento del nervio pudiendo se ha reportado del 38-42% de los partos vaginales (Fitzpatrick y cols. 2003). De hecho, se ha propuesto que el nervio pudiendo se alcanza a lesionar durante todo el curso del parto ya sea por sección en la unión neuromuscular, estiramiento excesivo del plexo lumbosacro o por su aplastamiento en el interior del canal de Alcock (Jóźwik y Jóźwik 2001).

Varios estudios informan que entre el 20-26% de las mujeres muestran lesiones importantes en los MPP después del parto vaginal. Mediante resonancias magnéticas se ha

demostrado que los MPP puede dañarse unilateral o bilateralmente. El daño puede incluir desprendimiento de los componentes musculares individuales en su inserción o a lo largo de las paredes laterales de la pelvis. Este tipo de daño es asociado con el debilitamiento de los MPP que comprende daño nervioso, isquemia local, distensión muscular o desgarro de las fibras musculares (DeLancey y cols. 2003, Dietz y Wilson 2005, DeLancey y cols. 2008). La lesión por avulsión de los MPPse ha reportado entre el 13-36% de los partos vaginales (Cyr y cols. 2017).

De acuerdo con la literatura, la fuerza muscular de los MPP disminuye proporcionalmente con el número de partos. Hwang y cols. (2019) evaluaron la fuerza muscular del piso pélvico a través de perineometría. Sus resultados mostraron que mujeres multíparas (tres partos) desarrollaron menor fuerza muscular comparado con mujeres primíparas (22.31 vs 43.82 cmH₂O, respectivamente). En otro estudio, también se demostró que mujeres nulíparas desarrollan mayor fuerza muscular (31.58 cmH₂O) que mujeres multíparas (26.28 cmH₂O). Incluso se reportó que el riesgo de presentar IU en el tercer mes postparto es 1.41 veces mayor en mujeres que tuvieron un bebe con un peso $\geq 3,800$ Kg (Gümüşsoy y cols. 2021). La fuerza muscular del piso pélvico puede disminuir tras cambios hormonales y anatómicos que facilitan alteraciones músculo esqueléticas que podrían conducir a padecer IU (Soave y cols. 2019). Con base en estos hallazgos, se investigó la asociación entre la fuerza muscular del piso pélvico y la incidencia de DPP después del parto. Mujeres con al menos un parto vaginal y con una fuerza muscular máxima <20 cmH₂O presentan mayor incidencia de desordenes del piso pélvico (DPP) incluyendo prolapso de órganos pélvicos (POP), VH e incontinencia urinaria de esfuerzo (IUE) (Blomquist y cols. 2020). La lesión mecánica del sistema de soporte del piso pélvico, la denervación, la lesión por isquemia y la remodelación del tejido conectivo son algunos de los mecanismos que subyacen a la disfunción del piso pélvico. Estudios transversales también han encontrado una asociación entre la IU y cambios en la fuerza muscular del piso pélvico (Thompson y cols. 2006).

La multiparidad conduce a lesiones musculares y nerviosas repetidas que afectan la fuerza muscular del piso pélvico predisponiendo a las mujeres a desarrollar DPP tales como la IU. Esta patología es un problema de salud pública importante que deteriora significativamente la calidad de vida de quien la padece y representa un alto costo para la sociedad (Coyne y cols.

2014). La prevalencia reportada en algunos países de Europa, Asia, África y América varía del 19-30% y se incrementa considerablemente con la edad (Ebbesen y cols. 2013, Mostafaei y cols. 2020). En México existen pocos estudios sobre la prevalencia de IU y hasta el momento no se ha estimado su impacto a nivel socioeconómico. Los estudios más recientes han reportado una prevalencia del 14-50% y se han limitado a pocas áreas geográficas del país como Jalisco, Veracruz, Tlaxcala, Hermosillo y Ciudad de México (Cuevas-Romero y cols. 2017, García-Pérez y cols. 2018, Giraldo-Rodríguez y cols. 2019).

Actualmente existen varias opciones de tratamientos para los diferentes tipos de IU. Inicialmente, se eligen modalidades de tratamiento no invasivos (cambios en el estilo de vida, entrenamiento vesical, entrenamiento de los MPP o ejercicios de kegel y el tratamiento farmacológico) seguido de tratamientos invasivos (quirúrgico y electroestimulación) (Aoki y cols. 2017, Booth y cols. 2018, Lukacz y cols. 2017). A continuación, describiremos los diferentes tratamientos de electroestimulación.

2.2 Tratamientos de electroestimulación

La electroestimulación es una terapia alternativa a las tradicionales terapias (fisioterapéuticas, farmacológicas y quirúrgicas) cuando estas resultan ineficientes para tratar disfunciones urinarias, incluyendo síndrome de urgencia-frecuencia, urgencia urinaria, retención urinaria no obstructiva e IUU. La electroestimulación de raíces nerviosas sacra o de nervios periféricos (tibial y pudendo) que se originan en los segmentos lumbosacros de la médula espinal son opciones terapéuticas actualmente disponibles (Goldman y cols. 2018). El objetivo de la electroestimulación es suprimir las sensaciones viscerales anormales y los reflejos involuntarios para restaurar el control voluntario. Aunque el mecanismo de acción no es completamente comprendido, su efecto parece estar mediado por la estimulación de fibras aferentes somáticas A- β (mecanorreceptores) que inhiben las sensaciones viscerales anormales y los mecanismos motores involuntarios para mejorar y restaurar la micción (de Groat y Tai 2016, Gill y cols. 2017). Este tratamiento ofrece procedimientos menos invasivos y reversibles en comparación a los tratamientos quirúrgicos disponibles. Dependiendo del tipo de estimulación se ha evaluado su efecto a corto y mediano plazo (Weissbart y cols. 2018).

2.2.1 Electroestimulación de la raíz nerviosa sacra

En 1997, la electroestimulación sacra fue aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) como un tratamiento para IUU y posteriormente para síndrome de urgencia-frecuencia y retención urinaria no obstructiva en 1999. Actualmente, es una opción terapéutica ampliamente aceptada en el campo de la urología con datos clínicos a corto y mediano plazo. Se estima que aproximadamente más de 250,000 pacientes con DPP han recibido este tratamiento durante los últimos 20 años (Goldman y cols. 2018). El procedimiento quirúrgico se realiza en dos etapas: la primera etapa, consiste en la colocación de un electrodo a lo largo de una raíz nerviosa sacra (usualmente sacro 3, S3) con subsecuente conexión a un neuroestimulador externo llamado Interstim® (Medtronic, Minneapolis, MN). Este estudio tuvo la finalidad de evaluar la eficacia de la estimulación sacra durante un periodo mínimo de 14 días (Vaganée y cols. 2019). Los parámetros de estimulación eléctrica usualmente aplicados para este tratamiento son: una amplitud de 2V, frecuencias bajas (10-20 Hz) y un ancho de pulso de 180-210 μ s. Los parámetros de estimulación son determinados con base a las respuestas motoras (contracción visual del hallux y de los MPP) y sensoriales (sensación de hormigueo del área perineal) de cada uno de los pacientes (Hoen y cols. 2017). Durante esta etapa, se ha reportado un éxito terapéutico del 57-80% y, solamente, los pacientes que presentan una disminución $\geq 50\%$ en episodios de IUU por día son candidatos a la segunda etapa del procedimiento quirúrgico. La segunda etapa consiste en la implantación de un neuroestimulador en el plano subcutáneo del cuadrante superior externo del glúteo para proporcionar estimulación continua a largo plazo (Siegel y cols. 2018, Noblett y cols. 2018, Zhang y cols. 2019) (Figura 6).

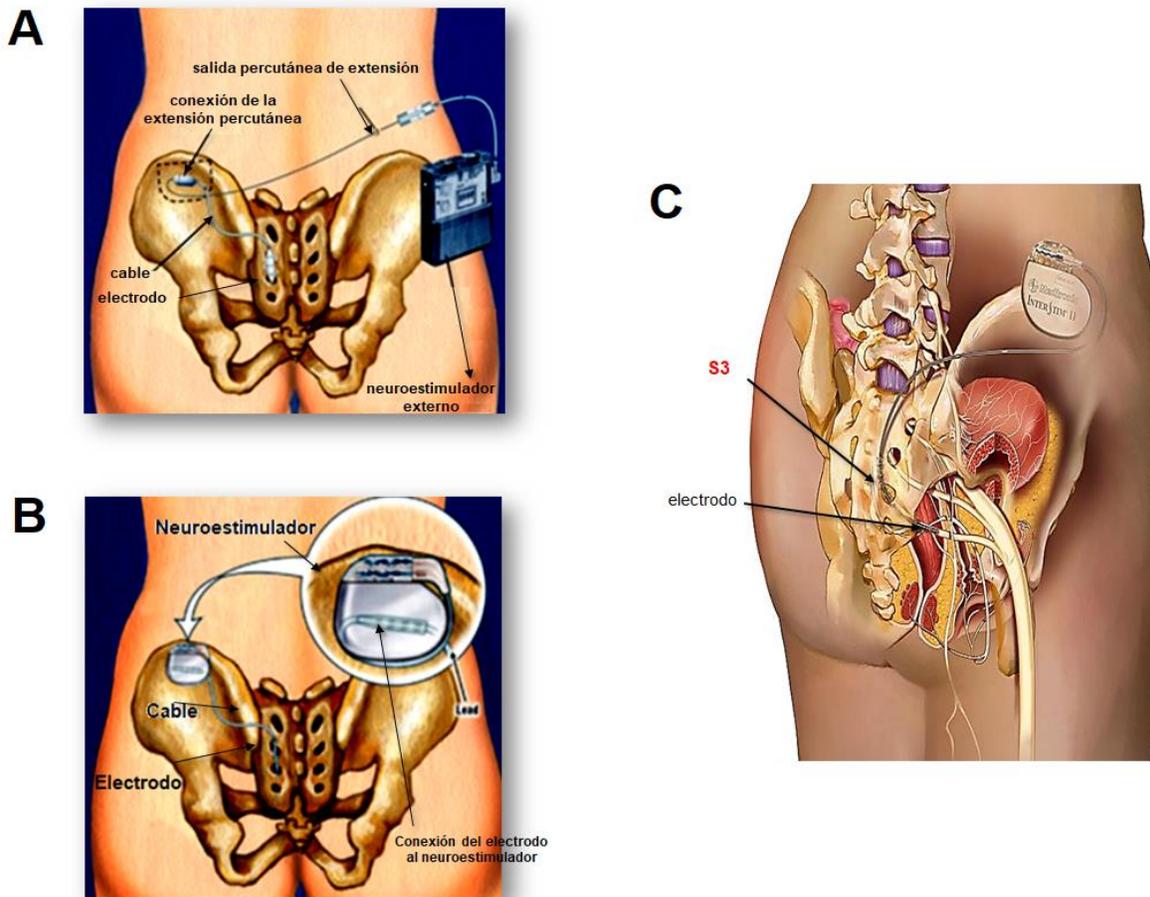


Figura 6. Representación esquemática de las etapas del procedimiento quirúrgico para la electroestimulación sacra. A) La primera etapa (estimulación aguda) consiste en la colocación de un electrodo a lo largo de una raíz nerviosa sacra para seleccionar a los pacientes adecuados para el tratamiento. B) La segunda etapa consiste en la implantación del neuroestimulador Interstim® (Medtronic, Minneapolis, MN) en el plano subcutáneo del cuadrante superior externo del glúteo. C) Colocación óptima del electrodo en la porción medial y superior del foramen S3 con subsecuente conexión al neuroestimulador implantado (Siegel y cols. 2018).

El ensayo InSite es un estudio clínico prospectivo, aleatorizado y multicéntrico que evaluó la eficacia y seguridad de la electroestimulación sacra a mediano plazo. Durante un seguimiento de 5 años se reportó una tasa de éxito terapéutico entre el 61-82% (Siegel y cols. 2016, Siegel y cols. 2018). Al final del estudio, el 64% de los pacientes presentó una disminución significativa en los episodios de IUU por día de 3.1 ± 2.7 a 1.7 ± 2.1 y sólo el 38% presentó continencia urinaria. En pacientes con urgencia-frecuencia, el éxito terapéutico fue del 57%. En este estudio se reportó una reducción significativa en el número promedio de vaciamientos por

día (12.6 ± 4.5 a 4.4 ± 4.4 veces al día). En general, los pacientes también presentaron una mejoría significativa en la calidad de vida, la función sexual y en el dolor pélvico. Sin embargo, los eventos adversos más comunes fueron un cambio indeseable en la estimulación (22%), dolor en el sitio de implantación (15%) e ineficacia (13%). Además, se informaron múltiples intervenciones quirúrgicas debido a revisión, eventos adversos, por reemplazo o retiro permanente de cualquier componente del neuroestimulador. En el 30.9% de los pacientes se intervino quirúrgicamente por un evento adverso y en el 33.5% para reemplazar la batería del neuroestimulador. La tasa de retiro permanente de cualquier componente del neuroestimulador fue del 19.1%. La razón principal fue debido a un evento adverso o por pérdida de eficacia. Cabe resaltar que el 33.5% de las intervenciones quirúrgicas se realizaron por falta de eficacia después de la implantación del neuroestimulador (Noblett y cols. 2017, Siegel y cols. 2018).

Los estudios clínicos a largo plazo son escasos y aunque algunos pacientes se benefician del tratamiento durante la primera etapa no todos presentan el mismo beneficio terapéutico después de la implantación del neuroestimulador. Ismail y cols. (2017) demostraron que la estimulación sacra fue exitosa sólo en el 63% (20/32 pacientes), después de un seguimiento promedio de 9.7 años (rango 4.7-12). Sin embargo, el 56% de los pacientes informó IU en su última visita. No obstante, el número promedio de toallas usadas por día disminuyó de 4.1 a 1.8. En cambio, la eficacia eventualmente disminuyó en el 38% después de una media de 4.3 años. El 47% de los pacientes requirió cirugías de revisión para el cambio de la batería o por disfunción del neuroestimulador (81.8%), desplazamiento del electrodo (9.1%), desplazamiento del neuroestimulador (4.5%) e implantación bilateral del electrodo por disminución de la eficacia (4.5%).

Desde su aprobación, la electroestimulación sacra ha presentado un importante refinamiento en algunos aspectos tecnológicos y quirúrgicos para disminuir su invasividad y mejorar su eficacia. Sin embargo, ha carecido de innovación tecnológica, vista en otros tipos de electroestimulación (Spinelli y cols. 2005, Zhang y cols. 2019). Desde el 2006, el neuroestimulador Interstim® es el único dispositivo aprobado por la FDA para su uso clínico en este tratamiento. Este dispositivo contiene una batería no recargable con una vida útil limitada de 3-5 años dependiendo de la configuración de los parámetros de estimulación. A largo plazo,

el reemplazo frecuente de la batería incrementa los costos de atención médica y compromete el éxito terapéutico del tratamiento (Figura 7A) (Noblett y cols. 2017).

Las limitaciones tecnológicas y los eventos adversos relacionados con el neuroestimulador Interstim® condujeron al desarrollo del primer neuroestimulador miniaturizado recargable llamado Axonics® (Modulation Technologies, Inc. Irvine, CA). Este dispositivo es 60% más pequeño comparado con el Interstim® y su batería tiene una vida útil estimada de 15 años. En junio del 2016 obtuvo aprobación en Europa, Canadá y Australia para comenzar con pruebas clínicas posteriores a su comercialización (Figura 7B) (Cohn y cols. 2017, Elterman 2018). El estudio prospectivo multicéntrico RELAX-OAB fue diseñado para evaluar la eficacia y seguridad del primer neuroestimulador recargable durante 12 meses. El 81% (26 de 32 pacientes) presentó una disminución significativa en el número de episodios de IUU por día (8.3 ± 0.8 vs 5.3 ± 0.9) y el 23% presentó continencia. El 71% de los pacientes con frecuencia urinaria disminuyeron los vaciamentos por día de 14.3 ± 1.1 a 8 ± 0.47 . En este estudio clínico también se reportaron eventos adversos relacionados con el minineuroestimulador recargable similar al neuroestimulador Interstim®. Los eventos adversos más comunes fueron estimulación incomoda, dolor e infección en el sitio de implantación y migración del electrodo. Al 4% de los pacientes les fue retirado el neuroestimulador debido a una infección o por pérdida de eficacia. Sin embargo, es necesario realizar un seguimiento a largo plazo para validar la longevidad del nuevo neuroestimulador recargable y su impacto en los costos de atención médica (Blok y cols. 2018, Blok y cols. 2019).

Aunque la electroestimulación sacra es un tratamiento ampliamente aceptado en Europa y Estados Unidos. En México continúa siendo una terapia novedosa y con pocos estudios clínicos a corto y mediano plazo. El éxito terapéutico y los eventos adversos reportados son similares a lo reportado en estudios clínicos internacionales pero su implementación en México aún es limitada y puede estar asociada a los costos de atención médica (Pelayo-Nieto y cols. 2014). El primer caso de electroestimulación sacra en México fue publicado en el 2009. En este estudio se presentó el caso clínico de una mujer de 73 años con IU grave de cinco años de evolución. La frecuencia diurna (10 a 6 eventos por día), la frecuencia nocturna (3 a 1 eventos por día), la urgencia urinaria (10 a 0 eventos por día) y la IU (4 a 1 episodios por día) prácticamente desaparecieron después de dos semanas de estimulación (Sucar-Romero y cols.

2009). El estudio más reciente reportó una mejoría mayor al 65% en los episodios de IU, en la frecuencia miccional, el volumen de vaciamiento y en la calidad de vida después de 6 meses de estimulación crónica. Lamentablemente, el 71% de los pacientes manifestó eventos adversos y el 17% presentó pérdida temporal de su eficacia. Finalmente, en el 4.8% de los pacientes se retiró el neuroestimulador por complicaciones relacionadas con los eventos adversos (Cervantes-Palma y cols. 2019).

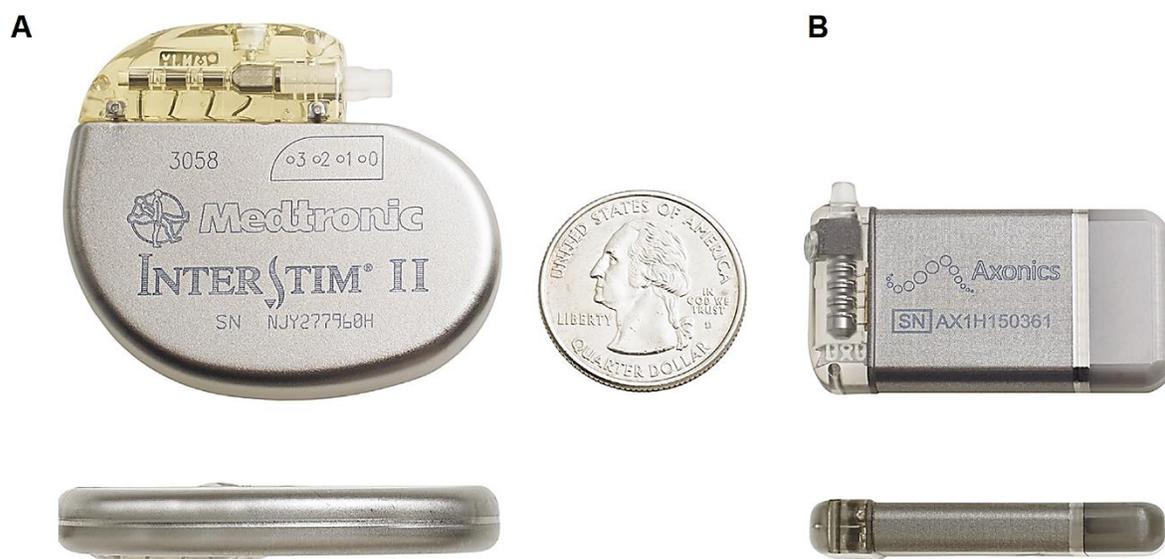


Figura 7. Dispositivos actualmente disponibles para la electroestimulación sacra. A) Neuroestimulador Interstim II® (Medtronic, Minneapolis, MN). Contiene una batería con una duración limitada de aproximadamente 3-5 años dependiendo de la configuración de los parámetros de estimulación. B) Neuroestimulador miniaturizado recargable Axonics Modulation Technologies, Inc. (Irvine, CA). Este dispositivo es aproximadamente 60% más pequeño comparado con el neuroestimulador Interstim II® (5.5 cm³ vs 14 cm³). Contiene una batería recargable con una duración estimada de 15 años (Elterman 2018).

2.2.2 Electroestimulación del nervio tibial

El nervio tibial es una rama distal del nervio ciático que se origina de las raíces nerviosas de lumbar 4 y sacro 3 (L4-S3). Este nervio es considerado una opción viable para la neuroestimulación, porque se origina de los mismos segmentos espinales que proveen inervación somática y autonómica al piso pélvico. La electroestimulación del nervio tibial es un tratamiento mínimamente invasivo, de bajo costo y con pocos eventos adversos en comparación a otros tipos de estimulación. Esta terapia fue aprobada por la FDA en el año 2000 como un

tratamiento para pacientes con IUU. Actualmente, la estimulación del nervio tibial puede realizarse de manera percutánea, transcutánea y con la implantación de un neuroestimulador cercano al nervio tibial. Los parámetros de estimulación eléctrica aplicados para esta terapia son: una amplitud máxima de 9 mA, 20 Hz y un ancho de pulso de 200 μ s, cada sesión con una duración de aproximadamente 30 minutos. La mayoría de los protocolos de estimulación sugieren una sesión por semana, durante 12 semanas y seguido de sesiones menos frecuentes para mantener la eficacia del tratamiento (Pincus y cols. 2019).

La estimulación percutánea del nervio tibial (EPNT) consiste en la inserción de una aguja de acupuntura de acero inoxidable (calibre 34) cefálica al maléolo medial del tobillo cerca del nervio tibial, mientras que un electrodo de superficie está a tierra mediante su adhesión en el borde interno de la superficie plantar del mismo pie. Para este tipo de estimulación generalmente se utiliza un generador de pulso externo de bajo voltaje (9V) conocido como Urgent® PC (Uroplasty Inc., Minneapolis, MN). Diversos ensayos controlados, aleatorizados y multicéntricos han evaluado la eficacia y seguridad de la EPNT. Estos estudios han reportado un éxito terapéutico del 55-77% durante 3 años. Los episodios de IUU por día disminuyeron significativamente y la calidad de vida mejoró, considerablemente, desde el inicio de la terapia hasta los 36 meses de estimulación (Peters y cols. 2010, Peters y cols. 2013). La naturaleza mínimamente invasiva de la terapia es la característica más atractiva para su elección. Sin embargo, solo el 57% de los pacientes continúa con el tratamiento después de las 12 sesiones de estimulación inicial y más del 40% abandona el tratamiento debido a razones logísticas y eventos adversos. A largo plazo algunos pacientes abandonan el tratamiento debido a falta de interés o dificultades para asistir frecuentemente a un consultorio médico para recibir el tratamiento. Los eventos adversos reportados son: hematomas, dolor, sangrado e inflamación en el sitio de estimulación y poca o ninguna mejoría (Salatzki y cols. 2019, te Dorsthorst y cols. 2020). Estos aspectos han contribuido al desarrollo de procedimientos menos invasivos para la estimulación del nervio tibial.

La estimulación transcutánea del nervio tibial (ETNT) es una alternativa cómoda y factible que puede ser aplicada por la paciente sin necesidad de realizar visitas frecuentes a un consultorio médico. descripción de la técnica Los parámetros de estimulación eléctrica aplicados son: una amplitud de 15-27 mA, frecuencias bajas (10-20 Hz) y un ancho de pulso de

200-250 μ s, cada sesión con una duración de 20-30 minutos. Generalmente se aplica una sesión diariamente o de 1-2 sesiones por semana durante 12 semanas como tratamiento inicial. El éxito terapéutico en algunos ensayos clínicos varía del 53-60% alcanzando una disminución \geq 50% en la frecuencia urinaria y en los episodios de IUU con resultados persistentes después de un seguimiento de 10.3 meses. La ETNT tiene un efecto terapéutico similar al obtenido durante la EPNT pero se requiere de estudios aleatorizados, controlados y multicéntricos con periodos de seguimiento más prolongado para confirmar su eficacia terapéutica (Ammi y cols. 2014, Manríquez y cols. 2016, Booth y cols. 2018b, Ramírez-García y cols. 2019).

Otra opción mínimamente invasiva para la estimulación del nervio tibial es a través de un neuroestimulador. El dispositivo se implanta en el tobillo cerca del nervio tibial bajo anestesia local o general (Van Der Pal y cols. 2006, Janssen y cols. 2013). El sistema RENOVA™ de BlueWind (Herzliya, Israel) es una de las nuevas modalidades para la estimulación de nervios periféricos. Este sistema consiste en un pequeño dispositivo en forma de cilindro que es activado inalámbricamente por una unidad de control externa. Un estudio prospectivo y multicéntrico evaluó su eficacia y seguridad durante 3 años. El número de episodios de IUU y las toallas utilizadas por día disminuyeron significativamente pero solo el 27.6% de los pacientes presentó continencia urinaria. A pesar de ello, el 47% de los pacientes presentó eventos adversos relacionados con el dispositivo tales como dolor e hinchazón en el sitio de implantación, sospecha de infección y complicaciones en la herida (van Breda y cols. 2017, Heesakkers y cols. 2018). Actualmente, existe otro dispositivo que está siendo evaluada su viabilidad clínica. El dispositivo eCoin™ (Valencia Technologies Corp., CA, USA) es un estimulador con forma y tamaño de níquel alimentado por batería diseñado para la estimulación del nervio tibial. Este dispositivo fue implantado sólo en 46 pacientes y el 69.6% mostró una disminución \geq 50% en los episodios de IUU después de 3 meses y sólo el 20% presentó continencia urinaria a los 6 meses de tratamiento. El éxito terapéutico de los nuevos dispositivos implantables tiene una perspectiva clínica prometedora, pero es necesario evaluar su viabilidad clínica en términos de costo y eficacia.

En México algunos de los ensayos clínicos más recientes se han enfocado en evaluar la eficacia de la estimulación del nervio tibial a corto plazo y en un limitado número de paciente con síntomas de vejiga hiperactiva, incluyendo la IUU. Los autores reportaron que la nicturia y

los episodios de IUU disminuyeron significativamente después de 6 semanas de tratamiento (Ramírez-García y cols. 2019). En el 2020 se publicó el primer ensayo clínico aleatorizado y prospectivo que comparó la eficacia de la ETNT y la EPNT. Después de 6 sesiones de estimulación se reportó una disminución en la frecuencia urinaria diurna, la nicturia y en los episodios de IUU sin diferencias estadísticamente significativas al comparar ambos tratamientos (Ayala-Quispe y cols. 2020).

2.2.3 Electroestimulación del nervio pudendo

La electroestimulación del nervio pudendo es un tratamiento alternativo para pacientes con síntomas persistentes de VH incluyendo IUU, urgencia-frecuencia y retención urinaria no obstructiva (Konschake y cols. 2017). En el 2005 se describió un procedimiento quirúrgico por etapas similar a la electroestimulación sacra para la implantación del neuroestimulador. La implantación del electrodo puede realizarse a través de un abordaje isquiorectal o transglúteo. El electrodo es colocado adyacente al nervio pudendo en el canal Alcock's bajo monitoreo electrofisiológico del esfínter externo del ano. Los parámetros de estimulación eléctrica generalmente aplicados para esta terapia son: una amplitud máxima de 1-5 V o 10 mA, frecuencias bajas (5-20 Hz) y un ancho de pulso de 200-210 μ s. Los pacientes que presentan un incremento >50% en el volumen vesical o en la capacidad cistométrica máxima durante la primera contracción involuntaria del músculo detrusor son candidatos a la implantación del neuroestimulador (Bosch 2005, Spinelli y cols. 2005).

Actualmente, el número de ensayos clínicos que evalúan la eficacia y seguridad de la electroestimulación del nervio pudendo es limitado en comparación a otros tipos de estimulación. En el 2005 se evaluó el éxito terapéutico del primer minineuroestimulador recargable llamado Bion® (Advanced Bionics Corporation Valencia, California) específico para la estimulación del nervio pudendo (Figura 8A). En este estudio piloto sólo el 36% (5 pacientes) fue candidato a la implantación del minineuroestimulador. Después de 6 meses de seguimiento, el número de episodios de IUU disminuyó significativamente de 6.9 a 2.9 por día y el volumen de vaciamiento por micción aumentó moderadamente de 139 a 154 ml. Los eventos adversos fueron sequedad vaginal y función intestinal alterada que se refería a una disminución en la frecuencia de defecación que fue favorable para algunos pacientes. A pesar del beneficio

terapéutico obtenido en algunos pacientes no se publicaron más estudios y el neuroestimulador nunca llegó al mercado (Groen y cols. 2005).

Otros ensayos clínicos han evaluado el éxito terapéutico de la electroestimulación del nervio pudendo utilizando el neuroestimulador Interstim®. Uno de los primeros estudios publicados demostró que el 80% (12 pacientes) fueron candidatos a la implantación del neuroestimulador. Estos pacientes presentaron una disminución significativa en el número de episodios de IU por día (7 ± 3.3 a 2.6 ± 3.3) y sólo 8 pacientes presentaron continencia urinaria. Después de seis meses, la evaluación urodinámica en 7 pacientes mostró un incremento significativo en la capacidad cistométrica máxima (153.3 ± 49.9 a 331.4 ± 110.7 ml) y 8 pacientes presentaron mejoría significativa en la función intestinal. Estos resultados sugirieron que la electroestimulación del nervio pudendo puede ser una alternativa terapéutica para pacientes refractarios a otros tipos de estimulación (Spinelli y cols. 2005). Con base a ello, se publicó el primer ensayo prospectivo, aleatorizado y ciego que comparó el éxito terapéutico de la estimulación aguda del nervio pudendo y de la raíz nerviosa sacra en pacientes con urgencia-frecuencia, IUU y retención urinaria. Durante la estimulación eléctrica del nervio pudendo se presentó un éxito terapéutico del 63% comparado con la estimulación sacra donde sólo se mostró el 46% de eficacia. En general, los pacientes reportaron una mejoría en el dolor pélvico, la urgencia-frecuencia y en la función intestinal. Al final del estudio, el 79.25% de los pacientes eligió la electroestimulación del nervio pudendo como un tratamiento alternativo para pacientes en quienes la estimulación sacra fracasó (Figura 8B) (Peters y cols. 2005).

Para confirmar los resultados anteriores, Peters y cols. (2010) evaluaron la eficacia y seguridad de la electroestimulación del nervio pudendo durante un período de 24 meses en pacientes refractarios a la estimulación sacra. El 78% presentó una disminución en la frecuencia urinaria y en los episodios de IUU después de un año de estimulación. La migración del electrodo, estimulación dolorosa o incómoda, infección en el sitio de implantación del neuroestimulador y múltiples intervenciones quirúrgicas debido al reemplazo de la batería son algunos de los eventos adversos comúnmente reportados utilizando el neuroestimulador Interstim®. Aunque se han realizado esfuerzos por desarrollar un neuroestimulador específico para la electroestimulación del nervio pudendo, actualmente no existe un dispositivo comercialmente disponible.

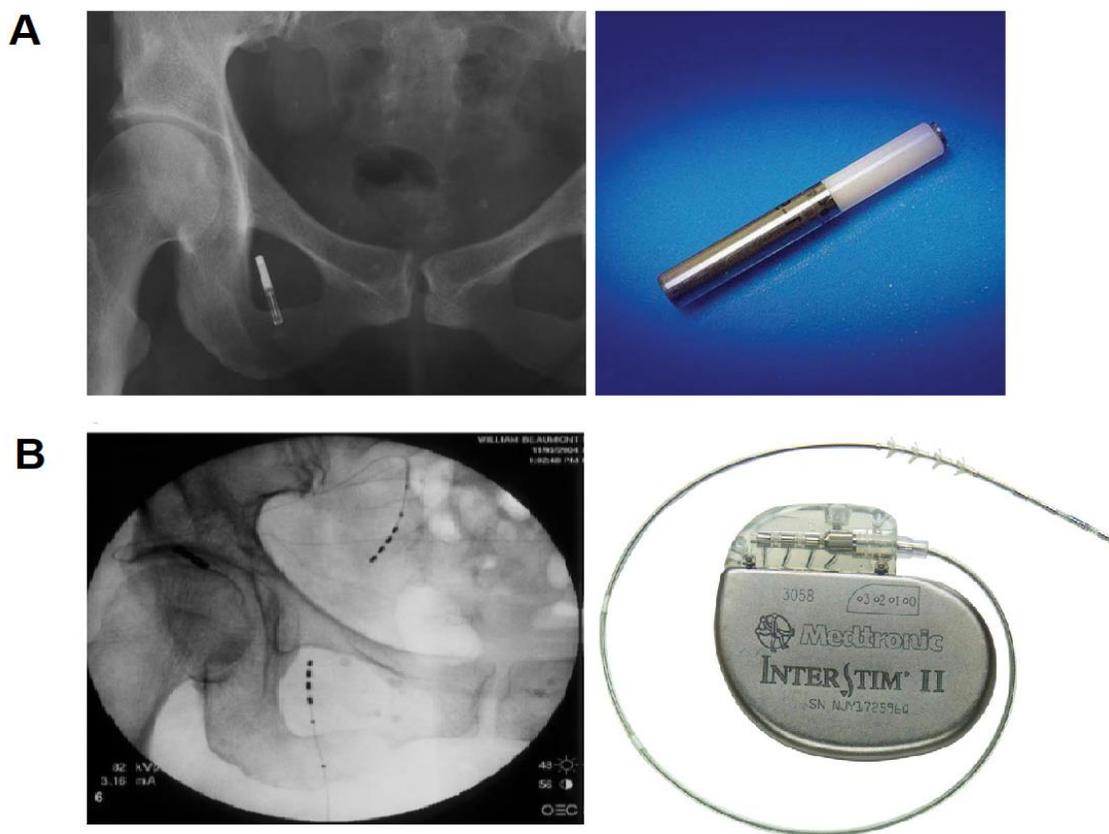


Figura 8. Dispositivos utilizados para la electroestimulación del nervio pudendo. A) Radiografía anteroposterior de la pelvis que muestra la ubicación del neuroestimulador Bion® (Advanced Bionics Corporation Valencia, California) cerca del canal Alcock. Dispositivo teleméricamente programable controlado por corriente (largo 27 mm x ancho 3.3 mm y un peso de 0.7 g). B) Radiografía que muestra la colocación de un electrodo cuadripolar en el foramen sacro y en proximidad al nervio pudendo con subsecuente conexión al neuroestimulador Interstim II® (Peters y cols. 2005).

Los estudios más recientes para estimular el nervio pudendo de manera indirecta utilizan agujas de acupuntura (Suzhou Shenlong medical apparatus factory, China) colocadas en cuatro puntos sacrococcígeos. La amplitud de estimulación máxima es de 25-55 mA, frecuencias de 2-2.5 Hz y una duración de ancho de pulso de 2 milisegundos. Cada sesión tiene una duración de 60 minutos, tres veces por semana durante un total de tres a cuatro semanas como tratamiento inicial. En estos estudios se ha comparado la eficacia de la estimulación indirecta del nervio pudendo y el entrenamiento de los MPP asistido por biorretroalimentación en mujeres con IUE

e IUU. Después de cuatro semanas de electroestimulación indirecta del nervio pudendo, el 85.7% de los pacientes presentó mejoría en la severidad de los síntomas de IU y en la calidad de vida en comparación con el 28.6% de los pacientes que realizó sólo el entrenamiento de los MPP. Sólo el 48% de los pacientes que recibió estimulación del nervio pudendo reportó resolución completa de sus síntomas después de 20.3 sesiones (Wang y cols. 2017).

En general los ensayos clínicos sugieren que la electroestimulación del nervio pudendo puede ser un tratamiento alternativo para pacientes refractarios a otros tipos de estimulación. Sin embargo, se necesitan estudios a largo plazo con cohortes de pacientes bien definidas para determinar su utilidad clínica como otra modalidad de tratamiento para pacientes con DPP. Actualmente, no es una terapia de aplicación rutinaria y a nuestro conocimiento no hay estudios en México que reporten el éxito terapéutico de la electroestimulación específica del nervio pudendo (Pérez Martínez y cols. 2018).

Los estudios en modelos animales se han realizado con el objetivo de optimizar los parámetros de estimulación eléctrica que mejoren la eficacia clínica. En la mayoría de estos estudios se ha utilizado como modelo de estudio a la gata y la rata para estimular de manera aguda nervios periféricos (tibial y pudendo) para tratar VH y un solo tipo de IU, específicamente la IUU (de Groat y Tai 2016). También, se ha propuesto un modelo de estudio de mayor tamaño como la oveja para la estimulación de la raíz nerviosa sacra (S3) utilizando un neuroestimulador implantable (InterStim II Modelo 3058) (Brink y cols. 2015). Sin embargo, es necesario realizar estudios en otros modelos animales para optimizar los parámetros de estimulación eléctrica y la selección de nuevos sitios de estimulación que mejoren la eficacia clínica para otros tipos de incontinencia. En conejas maduras multíparas, la estimulación inalámbrica aguda del nervio bulboesponjoso (nBe) incrementa la PIU máxima y el volumen expulsado. Estos resultados sugieren que la estimulación selectiva de nervios del piso pélvico podrían favorecer el cierre uretral y mejorar los mecanismos de continencia urinaria (Hernandez-Reynoso y cols. 2021).

La coneja doméstica es un modelo adecuado para desarrollar nuevos tratamientos de estimulación eléctrica en nuevos específicos del piso pelvico que contribuyan a la implementación de acciones que aminoren ciertas disfunciones urinarias relacionadas a la experiencia reproductiva.

2.3 Modelo de estudio: La coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*)

La coneja doméstica es un buen modelo experimental para estudiar procesos fisiológicos reproductivos (cópula y parto) y no reproductivos (micción) debido a sus características anatómicas, fisiológicas y conductuales (Beyer y cols. 1980, González-Mariscal y cols. 1994, Martínez-Gómez y cols. 1997, Hudson y cols. 1999, Corona-Quintanilla y cols. 2009).

En la coneja, el aparato urogenital presenta dos úteros que terminan en dos cérvix, unidos a una vagina proporcionalmente larga, de aproximadamente 18 cm. La vagina se ha dividido en tres regiones: la abdominal, que se extiende desde el cérvix hasta la parte superior de la sínfisis púbica (11 cm de largo); la vagina pélvica, que se encuentra en la cavidad pélvica cubierta por un prominente plexo venoso (4 cm) y la vagina perineal, que se localiza fuera de la cavidad pélvica (3 cm). La uretra mide en promedio 30 mm de longitud. Para su estudio se ha dividido en tres regiones: la proximal, unida al cuello vesical; la media, cercana a la vagina pélvica y la distal que desemboca en la vagina pélvica formando un único conducto urogenital donde ocurre la cópula, el parto y la expulsión de orina (Rodríguez-Antolín y cols. 2009).

Los MPP en la coneja se clasifican en dos grupos: pélvicos y perineal. Los músculos pélvicos se encuentran dentro de la cavidad pélvica (pubococcígeo, mPc) y los músculos perineales (isquiocavernoso, mIsc, y bulboesponjoso, mBe) están asociados a la vagina perineal (Martínez-Gómez y cols. 1997, Cruz y cols. 2002). En esta especie, el mIsc y el mBe son bien desarrollados a diferencia de otras especies como la rata que son vestigiales (Cruz y Downie, 2005). Con base a esto, la coneja es un buen modelo experimental para estudiar la participación del mIsc y el mBe en funciones reproductivas y urinarias (Fowler y cols. 2008, (López-García y cols. 2013) (Figura 9).

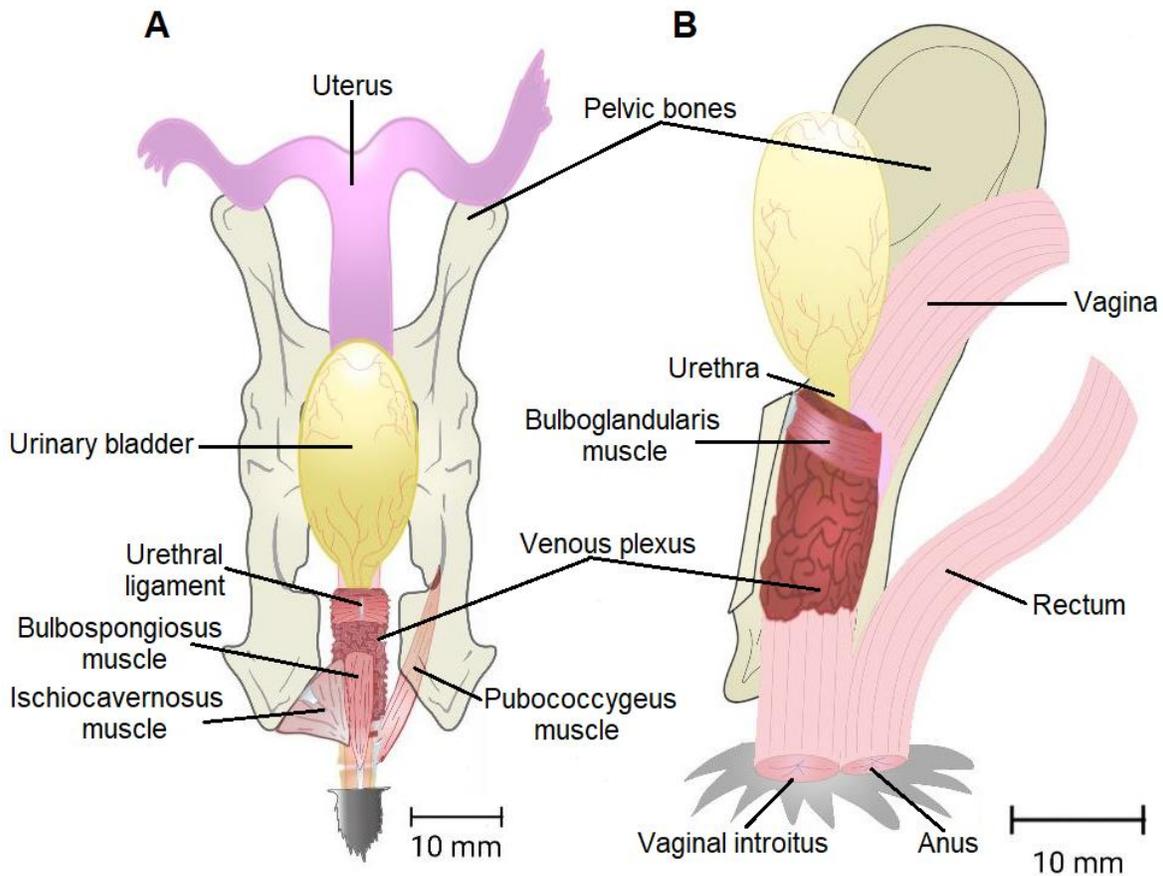


Figura 9. Aparato urogenital y musculatura estriada del piso pélvico de la coneja. A) Vista ventral y B) vista lateral del aparato urogenital. Se observan las tres regiones de la vagina (abdominal, pélvica y perineal) y la musculatura estriada pélvica (Pc) y perineal (bulboglandularis, Isc y Be) asociada a la uretra y la vagina. Se aprecia que la uretra distal desemboca en la vagina pélvica formando un único conducto urogenital (Hernández-Bonilla y cols. enviado).

En la coneja, la cópula y el parto son rápidos comparados con otras especies. Se caracteriza por tener cópulas con una duración menor a un minuto, implicando para el macho una sola intromisión acompañada de una serie breve de acelerados movimientos pélvicos que aseguran la eyaculación y la ovulación refleja (Beyer y cols. 1980). El parto sucede alrededor del día 31 de gestación y tiene una duración de diez minutos en promedio expulsando hasta diez o más crías (Hudson y cols. 1999).

Utilizando como modelo de estudio a la coneja, se ha demostrado que el mIsc y el mBe se contraen reflejamente en respuesta a la estimulación mecánica de la vagina perineal, lo cual corresponde al “reflejo vagino-cavernoso” descrito en mujeres. Estas observaciones sugirieron

que la presión ejercida sobre la vagina perineal por la contracción refleja del mIsc y el mBe puede estimular el pene para asegurar la rápida eyaculación característica del conejo (Cruz 2002). Dicha musculatura también tiene una participación fundamental durante el parto. En conejas gestantes a término con inducción del parto se registró la actividad del mIsc y el mBe durante la expulsión de las crías. De hecho, la sección bilateral de sus nervios incrementó significativamente el índice de nacimientos con retención vaginal y el número de crías muertas al nacer (Cruz 2002). A partir de estas observaciones se determinó que los músculos mIsc y mBe tienen una participación relevante en procesos reproductivos, tales como la cópula y el parto (Cruz y cols. 2002).

Otro proceso fisiológico que se lleva a cabo en el aparato urogenital es la micción. Tanto machos como hembras presentan diferentes patrones conductuales para expulsar la orina: en chorro, chisguete, goteo y rocío, existiendo diferencias con respecto a la cantidad de orina evacuada y el blanco al que es dirigida (Bell 1980, Martínez-Gómez y cols. 2007). Se ha propuesto que la contracción del mIsc y el mBe pueden contribuir en la realización de los diferentes patrones conductuales de expulsión de orina debido a que se activan reflejamente durante la fase de expulsión de orina. Incluso se mostró que el bloqueo de la actividad de los músculos perineales provoca un incremento significativo de la duración de la fase de expulsión y una disminución en la eficacia vesical y en la presión máxima. Considerando estos hallazgos, los músculos perineales tienen un rol relevante en funciones reproductivas y excretoras. Por lo tanto, la coneja doméstica representa un atractivo modelo para estudiar las bases fisiológicas de la micción involucrando la participación funcional del mIsc y el mBe (Corona-Quintanilla y cols. 2014).

2.3.1 Anatomía e inervación de los músculos estriados perineales

En la coneja se ha descrito la anatomía gruesa y la inervación macroscópica de los músculos estriados perineales tales como el Isc y el Be. Ambos músculos se encuentran anatómicamente relacionados a la pared ventral de la vagina perineal (Martínez-Gómez y cols. 1997).

El mBe es compacto y está formado por dos pares de músculos. Se origina en la porción distal del hueso púbico justo en la parte media del arco isquiático. Después de su origen, se proyecta de manera caudal sobre la parte media de la superficie ventral de la vagina perineal

para insertarse en el ligamento suspensorio del clítoris (LSC). El LSC se origina bilateralmente en la rama del isquiún y corre caudalmente para unirse en la línea media a la pared ventral de la vagina perineal y continúa caudalmente hacia el clítoris. El mBe envía un tendón sobre la superficie ventral de la vagina perineal para fusionarse con los tendones del mIsc. La estimulación eléctrica del mBe produce retracción y rigidez de la vaina clitoral, la retracción de los labios exponiendo la entrada de la vagina e incrementa la PIV (Martínez-Gómez y cols. 1997, Cruz y cols. 2002).

El mIsc es bilateral y se origina en la superficie del hueso púbico, en la porción lateral del arco isquiático. Después de su origen envía de forma caudal sus tendones en donde se fusionan lateralmente a la cruz clitoral en la porción media de la vaina clitoral. La estimulación eléctrica del mIsc produce movimientos de la vaina clitoral e incrementa la PIV (Martínez-Gómez y cols. 1997, Cruz y cols. 2002) (Figura 10).

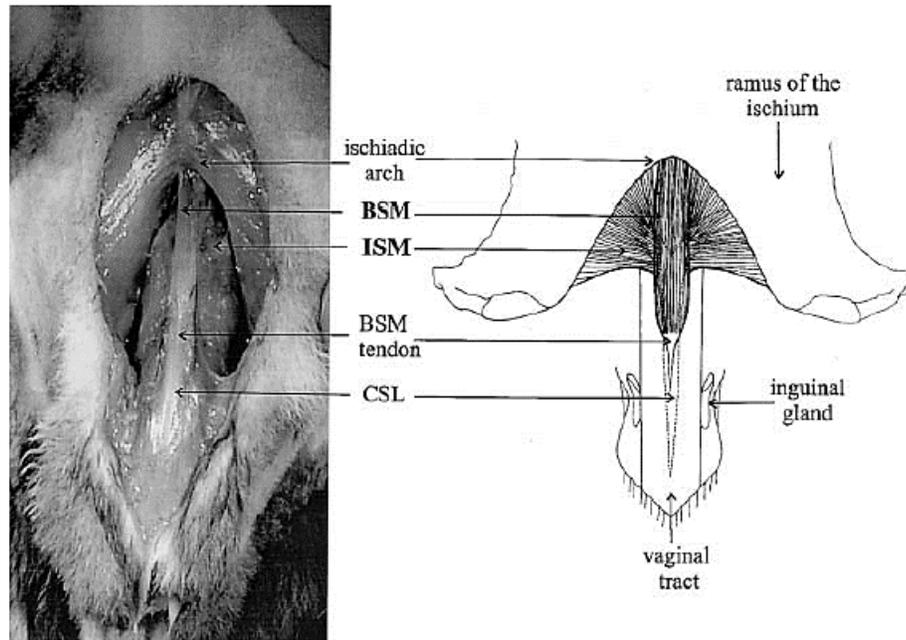


Figura 10. Vista ventral de los músculos estriados perineales de la coneja. A) La fotografía y B) El dibujo muestra la localización anatómica del mIsc y el mBe y su relación con el ligamento suspensorio del clítoris (LSC) y la vagina perineal (modificado de Cruz y cols. 2002).

El mIsc y el mBe son inervados por ramas del nervio pudendo similar a la inervación en humanos (Figura 11A, número 3). El nervio pudendo se origina de S2-S3 y de acuerdo con su origen presenta tres patrones de organización. El principal patrón de inervación fue encontrado en el 50% de las hembras (Figura 11A). En esta organización el nervio pudendo se origina principalmente de S2 (Figura 11A, número 3) y después de 2.5-3 cm se divide en 4 ramas: una de ellas se anastomosa al tronco lumbosacro (indicado con un * en la Figura 11A) y las otras 3 se anastomosan a nervios que se originan de S3 y del tronco lumbosacro, formando el plexo lumbosacro. Después de las interconexiones, los nervios se dirigen caudalmente a la fosa isquiorectal. A este nivel, la segunda rama del nervio pudendo o rama sensorial del nervio pudendo (Figura 11A, número 4) alcanza la rama del isquio y continúa caudalmente hacia el hueso púbico donde se divide en dos ramas: el nervio Be (nBe) (Figura 11A, número 5) y el nervio clítoral (nCli) (Figura 11A, número 6). Este último nervio inerva el clítoris, la vagina perineal, las glándulas prepuciales, el músculo constrictor vulvar y la piel perigenital. Es importante resaltar que el nBe es una rama del nCli. La tercera rama del nervio pudendo o rama motora del nervio pudendo (Figura 11A, número 7) inerva el mIsc (Figura 11A, número 11). La relación anatómica entre el aparato urogenital inferior y la musculatura estriada perineal requiere de un fino control nervioso para llevar a cabo funciones reproductivas y urinarias. Considerando la relación anatómica de la musculatura estriada perineal y su inervación en la coneja ofrece una buena oportunidad para investigar la participación funcional de los nervios perineales en procesos fisiológicos como la micción (Cruz y cols. 2002, Cruz y cols. 2017).

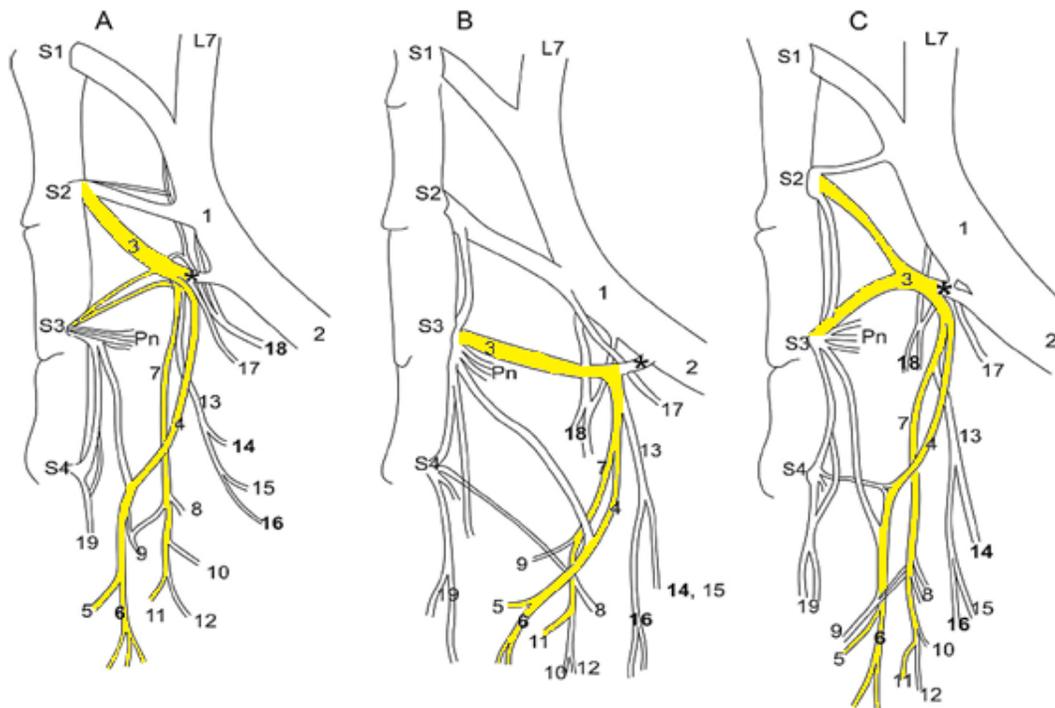


Figura 11. Organización del plexo lumbosacro en la coneja doméstica. A) Figura que representa la organización encontrada en el 50% de los animales. B) y C) Figuras que muestran un patrón encontrado en el 30% y 20% de las hembras, respectivamente. L7= nervio espinal lumbar 7; S1-S4= foramen vertebral sacra. Números: 1= tronco lumbosacro, 2= nervio ciático, 3= nervio pudendo, 4= rama sensorial del nervio pudendo, 5= nervio del músculo bulboespongioso, 6= nervio dorsal del clítoris, 7= rama motora del nervio pudendo, 8= nervio de la glándula anal, 9= Bulboglandularis, 10= nervio de la glándula inguinal, 11= nervio del músculo isquiocavernoso, 12= nervio del constrictor vulvar y nervio del esfínter externo anal, 13= rama perineal del nervio pudendo, 14= nervio del glúteo, 15= nervio muscular semitendinoso, 16= nervio perineal proximal, 17= nervio del músculo obturador interno, 18= nervio perineal distal, 19= nervio del levator ani. * Indica la rama anastomótica. Pn= nervio perineal (modificado de Cruz y cols. 2017).

2.3.2 Participación funcional de los músculos estriados perineales durante la micción

Corona-Quintanilla y cols. (2009) registraron simultáneamente cistometrogramas (CMG's) y electromiogramas (EMG's) del mPc, el mIsc y el mBe durante la micción inducida en conejas jóvenes vírgenes anestesiadas con uretano. Los CMG's mostraron las dos típicas fases de la micción: el almacenamiento y la expulsión de orina. Los músculos pélvicos (Pc) y perineales (Isc y Be) presentaron un patrón de actividad temporal y coordinado durante la micción. El músculo Pc presentó un burts de actividad tónica durante la fase de almacenamiento de la orina. Mientras que el mIsc mostró una larga actividad fásica al final del almacenamiento y durante la

expulsión de orina. La activación del mBe fue registrada durante el incremento máximo de presión de la vejiga, correspondiente a la fase de expulsión de orina. Estos resultados demuestran una fina y sincrónica regulación de la actividad refleja de los músculos del piso pélvico que involucra diferentes vías neurales (Figura 12).

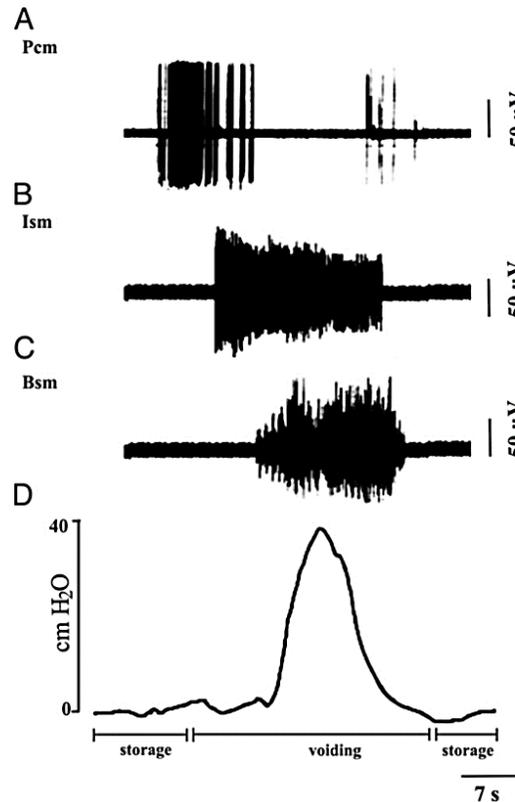


Figura 12. Registros simultáneos electromiográficos (A-C) y cistométricos (D) durante la micción inducida en conejas jóvenes vírgenes anestesiadas con uretano. S, segundos (tomado de Corona-Quintanilla y cols. 2009).

A partir de estos hallazgos, se evaluó el efecto de la estimulación eléctrica del mIsc y el mBe en la función vesical y uretral durante la micción en conejas jóvenes vírgenes. La presión vesical y la PU fueron registradas simultáneamente antes y durante la estimulación eléctrica de los músculos específicamente durante la fase de expulsión de orina (5xU, 20 Hz con una duración de 8-10 segundos). La estimulación eléctrica de los músculos favoreció la contracción vesical resultando en un incremento significativo en la eficacia de vaciamiento, la duración de la expulsión y en la presión máxima de la vejiga. Mientras que la PU máxima, el tiempo relacionado al incremento de la PU y la presión requerida para cerrar la uretra disminuyó

significativamente. Los resultados demuestran que la estimulación eléctrica del mIsc y el mBe tiene un efecto sobre la función vesical y uretral durante la micción. Ambos músculos promueven un reflejo excitatorio que favorece la contracción del músculo detrusor (reflejo uretro-cuerpocavernoso) para permitir un eficiente vaciamiento vesical y para prevenir la acumulación de orina en el tracto urogenital (Figura 13) (Corona-Quintanilla y cols. 2014).

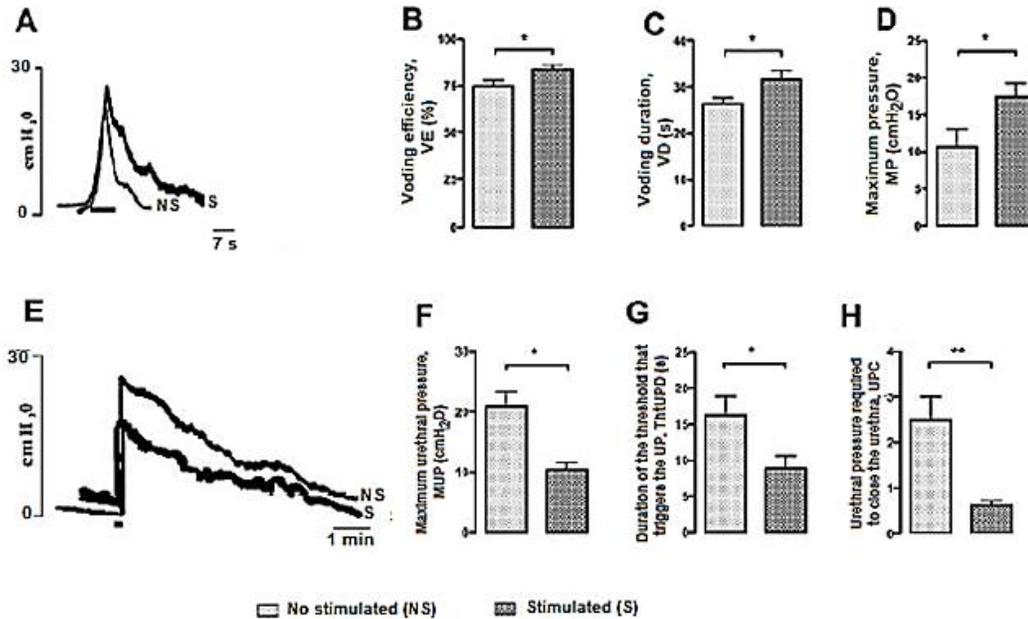


Figura 13. Estimulación eléctrica de los músculos estriados perineales durante la fase de expulsión de orina. A) Registros representativos de la presión vesical (PV) obtenidos antes (NS; no estimulado) y durante la estimulación eléctrica (S; estimulado) bilateral del mIsc y el mBe. Variables urodinámicas medidas: B) eficiencia de vaciamiento, C) duración de la expulsión y D) presión vesical máxima. E) Registros representativos de la presión uretral (PU) obtenidos antes (NS; no estimulado) y durante la estimulación eléctrica (S; estimulado) bilateral del mIsc y el mBe. Variables de PU medidas: F) presión uretral máxima, G) la duración del umbral que desencadena la PU, H) presión uretral requerida para cerrar la uretra. Los datos se muestran como media \pm DE (n=6) de tres ciclos de micción registrados antes y durante la estimulación. Para determinar diferencias significativas se realizó una prueba *t* de Student pareada (* $P < 0.05$). segundos, s (modificado de Corona-Quintanilla y cols. 2013).

Los presentes hallazgos abren la posibilidad de que la estimulación eléctrica de los nervios nIsc y el nBe pueden ser un nuevo objetivo terapéutico para la modulación de la función vesical y uretral durante la micción, siendo una nueva terapia para aliviar ciertas disfunciones urinarias relacionadas a la experiencia reproductiva. En la coneja, la multiparidad tiene efectos en la morfología y funcionamiento del aparato urogenital inferior y de los MPP (Fajardo y cols. 2008, López-García y cols. 2013).

2.3.3 Efecto de la multiparidad sobre los músculos estriados perineales

De acuerdo con Martínez-Gómez y cols. (2011), la multiparidad (4 partos) desorganiza el patrón de actividad de los músculos perineales y modifica la urodinamia. Las hembras multíparas presentan cambios en la actividad refleja del mIsc y el mBe durante la micción. Además, se han registrado cambios en algunos parámetros urodinámicos como un incremento significativo en el volumen umbral, el volumen residual y en la duración de la fase de vaciamiento. Asimismo, se registró una disminución significativa en la presión máxima de la vejiga. De acuerdo con esto, es posible que el daño muscular y nervioso de cada músculo debido a su sobredistensión durante los cuatro episodios consecutivos de gestación y parto altera su actividad durante la micción (Figura 14).

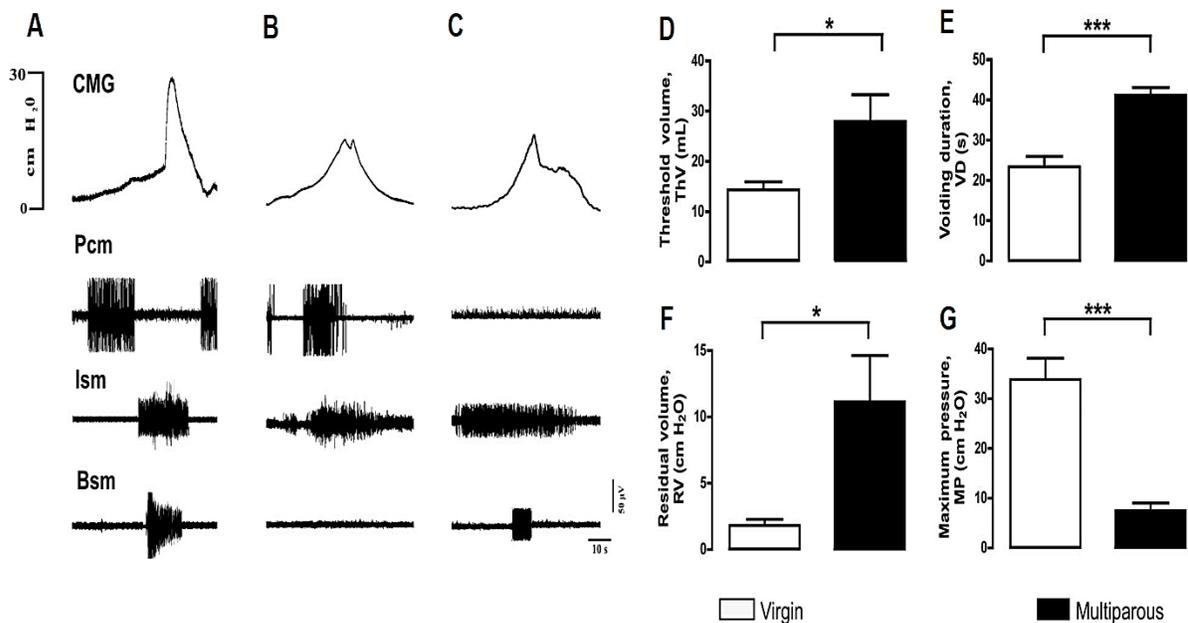


Figura 14. Cistometrograma (CMG) y electromiograma (EMG) del músculo pubococcígeo (Pc), el músculo isquiocavernoso (mIsc), el músculo bulboesponjoso (mBe) registrados simultáneamente durante la micción en conejas jóvenes vírgenes (A) y multíparas (B, C). Todas las hembras multíparas tenían un patrón de actividad muscular diferente al de las hembras vírgenes, involucrando al menos un músculo. Variables urodinámicas obtenidas de conejas vírgenes (barras en blanco) y multíparas (barras en negro) D) volumen umbral, E) duración del vaciamiento, F) volumen residual y G) presión máxima vesical. Una prueba *t* de Student no pareada fue realizada para determinar diferencias significativas entre grupos (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$). segundos, s (Martínez-Gómez y cols. 2011).

La multiparidad induce cambios en la composición del tipo de fibras de los músculos perineales. López-García y cols. (2017) evaluaron el efecto de la multiparidad en la proporción del tipo de fibras del mBe. En este estudio se comparó el porcentaje de fibras rápidas, intermedias y lentas entre conejas nulíparas y multíparas. El mBe de conejas nulíparas fue predominantemente compuesto por fibras rápidas. Sin embargo, en las conejas multíparas se presentó una disminución significativa de la proporción de fibras rápidas y un incremento significativo en el porcentaje de fibras intermedias (Figura 15).

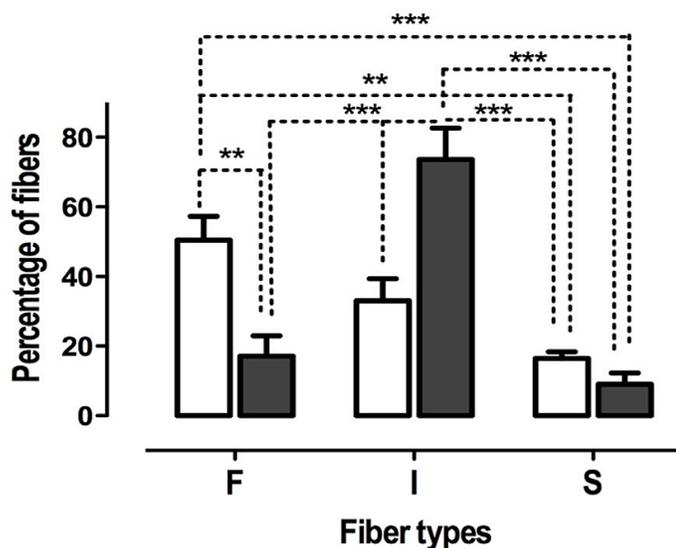


Figura 15. Comparaciones de los tipos de fibras rápidas (F), intermedias (I) y lentas (S) del mBe entre conejas nulíparas y multíparas. El número total del tipo de fibras musculares fue representado como porcentaje. Los datos se muestran en medias \pm DE. ANOVA de 2 vías seguida de una prueba post hoc Tukey se realizó para determinar diferencias significativas entre los porcentajes del tipo de fibra por grupo (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.001$) (López-García y cols. 2017).

Los cambios en la composición del tipo de fibras coinciden con la presencia de algunos marcadores bioquímicos y moleculares que indican eventos de daño y regeneración en el mBe (López-García y cols. 2015). Asimismo, se reportó que los niveles séricos de estradiol se ven afectados por la multiparidad, particularmente al final del cuarto parto. Es importante considerar que el estado estrogénico influye en los eventos celulares en términos de daño (inflamación) y regeneración muscular (activación células satélite). De tal manera que los cambios hormonales que ocurren durante cada episodio de gestación, parto y lactancia pueden modular la expresión

de receptores a estrógenos involucrados en el metabolismo, contractibilidad y daño o regeneración muscular. Así la multiparidad afecta la fisiología de los músculos perineales (López-García y cols. 2013).

En relación con los resultados anteriores, (López-Juárez y cols. (2018) evaluaron las propiedades contráctiles de los músculos perineales, así como su efecto en la génesis de la presión vaginal en conejas jóvenes nulíparas y múltiparas. En este estudio se registró la fuerza contráctil y la PIV generada por la contracción del mIsc y el mBe en respuesta su estimulación eléctrica. La multiparidad disminuyó la fuerza contráctil (Figura16) y la PIV (Figura 17) generada por la contracción de los músculos cuando se estimularon con trenes de estimulación de alta frecuencia (20, 50 y 100 Hz).

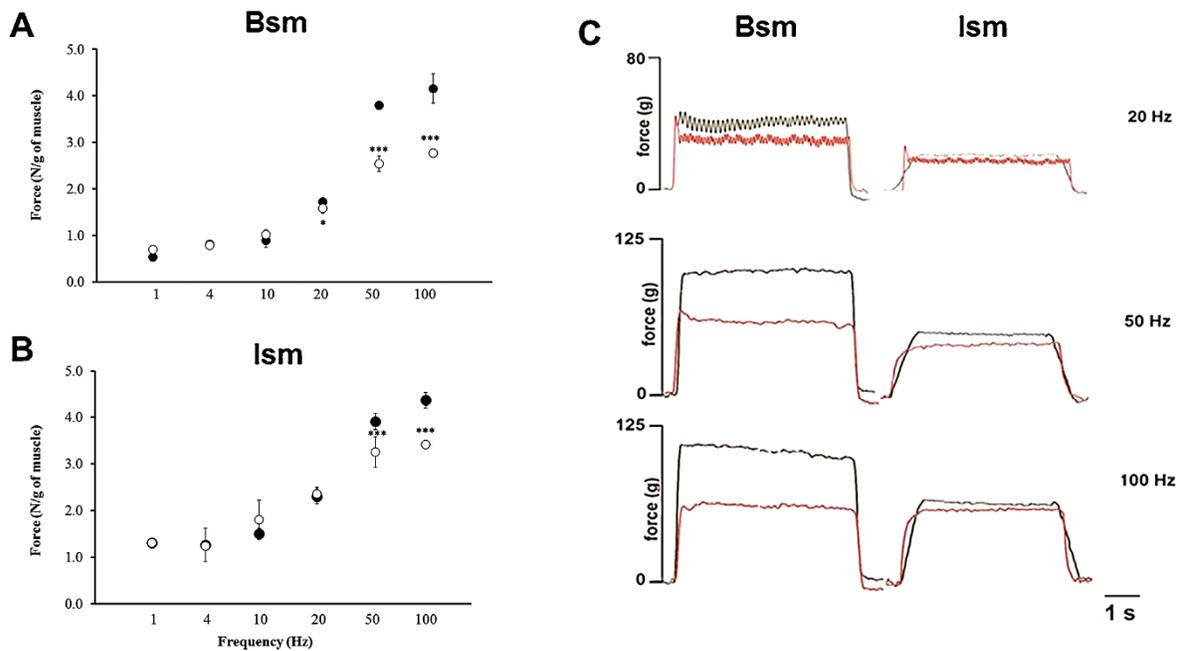


Figura 16. Fuerza contráctil normalizada (N/g de tejido) generada por el mBe (A) y el mIsc (B) en respuesta a trenes de estimulación de frecuencia ascendente (1, 4, 10, 20, 50 y 100 Hz) en conejas nulíparas (círculos negros) y múltiparas (círculos blancos). Registros representativos de la fuerza contráctil (C) desarrollada por el mBe y el mIsc en respuesta a la aplicación de trenes de estimulación de alta frecuencia (20, 50 y 100 Hz, duración de 4 segundos) en conejas nulíparas (trazos negros) y múltiparas (trazos rojos). Los datos son medias \pm DE. Una prueba de *t* de Student no pareada se realizó para determinar diferencias entre grupos (**P* < 0.05; ****P* < 0.001). Segundo, s; gramos, g; hertz, Hz; newton, N (López-Juárez y cols. 2017).

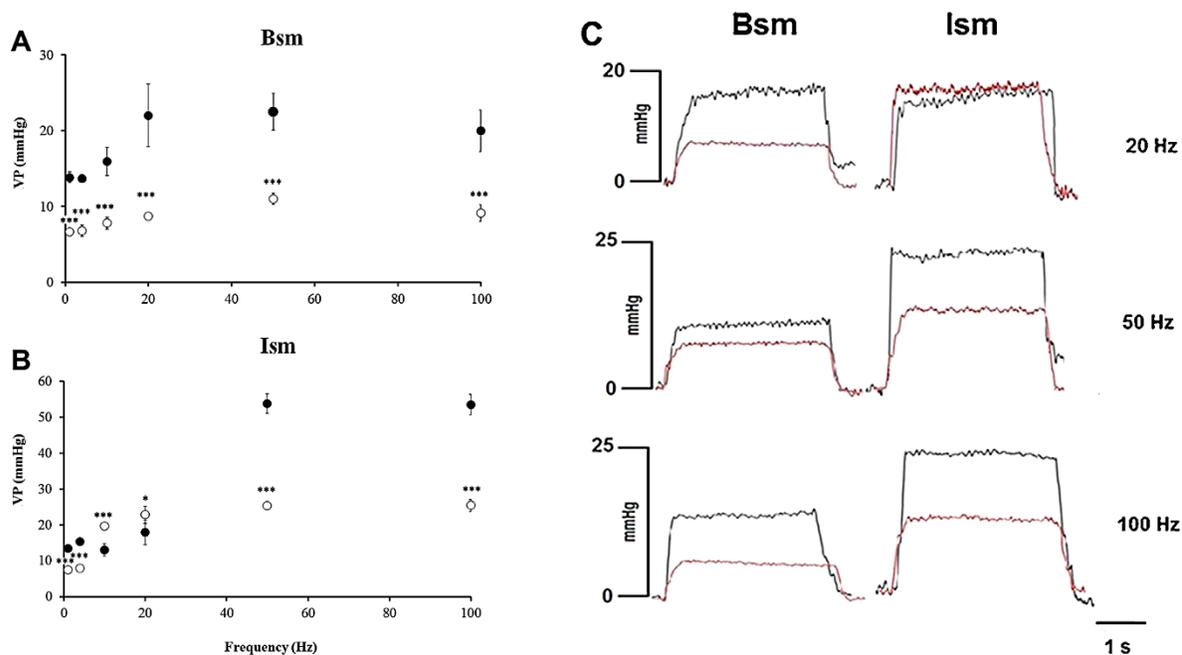


Figura 17. PIV perineal generada por el mB (A) y el mIsc (B) en respuesta a trenes de estimulación de frecuencia ascendente (1, 4, 10, 20, 50 y 100 Hz) en conejas nulíparas (círculos negros) y múltiparas (círculos blancos). Registros representativos de la presión vaginal (C) generada por el mBe y el mIsc en respuesta a la aplicación de trenes de estimulación de alta frecuencia (20, 50 y 100 Hz, duración de 4 segundos) en conejas nulíparas (trazos negros) y múltiparas (trazos rojos). Los datos son medias \pm DE. Una prueba de *t* de Student no pareada se realizó para determinar diferencias entre grupos (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$). Segundos, s; gramos, g; hertz, Hz; presión vaginal, PV; milímetros de mercurio, mmHg (López-Juárez y cols. 2017).

Los cambios en la presión vaginal también están influenciados por la desorganización de los componentes tisulares de la pared vaginal. La multiparidad reduce el espesor del epitelio afectando la cantidad de musculatura lisa y el área cubierta por vasos sanguíneos en la pared vaginal. De tal manera que la multiparidad altera las características histológicas del aparato urogenital inferior (Xelhuantzi y cols. 2014).

Por otra parte, la multiparidad también afecta la mielinización y las propiedades de conducción de los nervios del piso pélvico. (Castelán y cols. (2018) evaluaron la neurotransmisión del impulso nervioso, es decir, la generación y propagación del potencial de acción compuesto (PAC) del nBe en conejas nulíparas y múltiparas. Para ello, se aplicaron pulsos únicos de corriente a diferentes intensidades (1xU, 3xU y 5xU). La amplitud y el área de PAC generado por el nBe fue significativamente menor en las conejas múltiparas. Estos

resultados fueron asociados a un alto porcentaje de axones con mielina desorganizada que correspondía a invaginaciones, interrupción y aparente separación de las vainas de mielina (Figura 18).

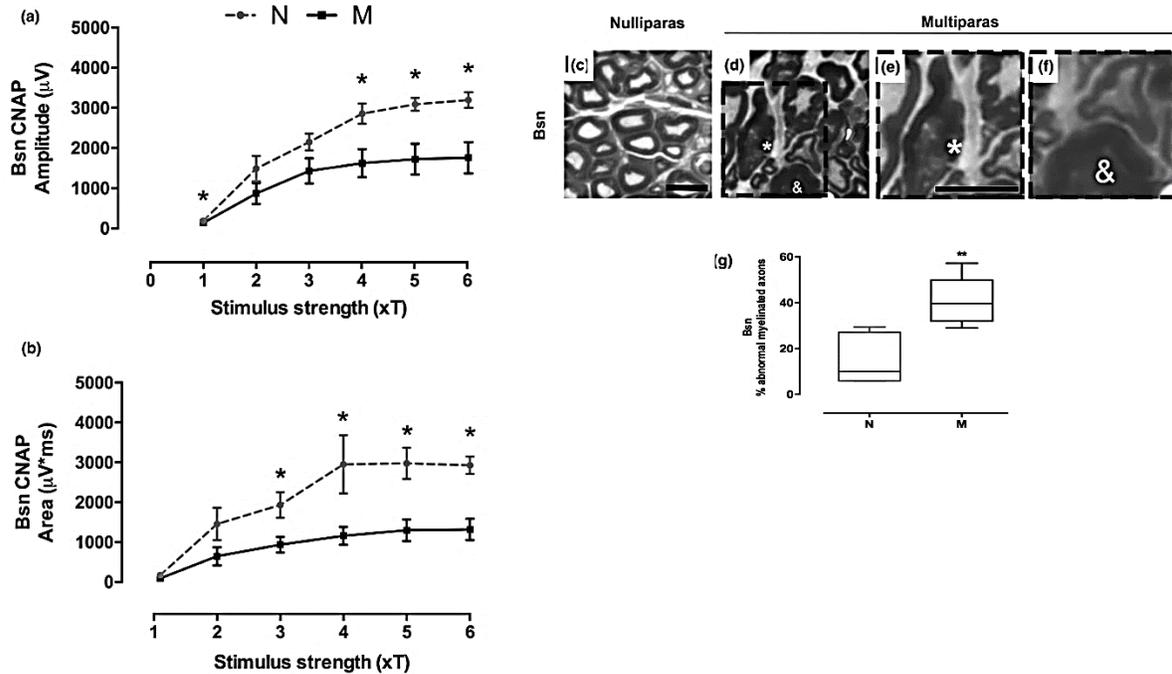


Figura 18. La multiparidad disminuye el amplitud y área del PAC de los nervios perineales en conejas. a) amplitud y b) área del PAC evocada con pulsos únicos de corriente de intensidad graduada (1-6xU) en el nBe de conejas nulíparas (trazos grises) y múltiparas (trazos negros). c) Microfotografías representativas de secciones transversales (1 µm) del nBe teñidas con azul de toluidina. nBe de hembras nulíparas (d) y múltiparas (e-g). Los símbolos indican fibras mielinizadas anormales: alteración de la mielina (*), invaginación (&) y aparente separación de las vainas de mielina (flecha). H) Porcentaje de axones mielinizados anormales (Castelán y cols. 2018).

Los estudios anteriormente mencionados demuestran que la multiparidad tiene un efecto sobre la función neuromuscular del piso pélvico. Los cambios en las propiedades electrofisiológicas e histológicas de los nervios podrían favorecer a las alteraciones en la actividad muscular perineal durante la micción. Estos hallazgos tienen una clara relevancia debido a que el daño en el tejido muscular y nervioso del piso pélvico es la principal causa para desarrollar disfunciones urinarias. La estimulación eléctrica del nIsc y el nBe puede ser una

opción viable para la modulación del aparato urogenital inferior, siendo una nueva terapia para aliviar ciertas disfunciones urinarias relacionadas a la multiparidad.

3. JUSTIFICACIÓN

La gestación y el número de partos son considerados algunos de los factores de riesgo que casusan un aumento en la incidencia de DPP como la IU. Esta patología es un problema de salud pública importante debido a su alta prevalencia e impacto negativo en la calidad de vida de la mujer. En relación a ello, se han desarrollado diversos tratamientos de electroestimulación con el objetivo de disminuir los episodios de IUU.

Los tratamientos de electroestimulación son una terapia alternativa a las tradicionales (fisioterapéuticas, farmacológicas y quirúrgicas), cuando éstas resultan ineficientes para tratar disfunciones urinarias. Sin embargo, el impacto terapéutico en la practica clínica ha sido limitado. Esto puede ser explicado en parte por la presencia de eventos adversos, limitaciones tecnológicas de los neuroestimuladores (tamaño y uso de baterías) y la falta de especificidad de las estructuras nerviosas que se estimulan. Por ejemplo, la raíz nerviosa sacra (S3) o el nervio pudendo que proveen inervación a diferentes estructuras como la uretra, el esfínter uretral y anal, el mIsc, el mBe, la piel perineal y el clítoris siendo la especificidad a nivel muy local cuando las terminaciones nerviosas ya están muy cercanas a sus órganos blancos. La falta de especificidad de la estimulación puede ser un factor importante en la disminución y falta de eficacia de la terapia en algún momento del tratamiento. Además, hay que considerar el daño en el tejido muscular y nervioso durante procesos naturales como la gestación y el parto. Todos estos aspectos pueden afectar la eficacia de la terapia a mediano y largo plazo. Por lo tanto, es necesario realizar estudios en modelos animales a través de procedimientos menos invasivos y con el desarrollo de tecnología apropiada para la electroestimulación de nervios específicos del piso pelvico.

En nuestro laboratorio la coneja doméstica ha sido un buen modelo experimental para estudiar procesos fisiológicos reproductivos (cópula y parto) y no reproductivos (micción) debido a sus características anatómicas, fisiológicas y conductuales. La multiparidad en la

coneja modifica la actividad refleja del mIsc y el mBe durante la micción y modifica la urodinamia. Tal escenario involucra un déficit en la fuerza contráctil, cambios en la proporción del tipo de fibras y alteraciones en la mielinización y en las propiedades de conducción de los nervios. El debilitamiento de los músculos perineales contribuye a un déficit en la PU y disminuye significativamente la eficiencia de vaciamiento. Sin embargo, la estimulación inalámbrica aguda del nBe incrementa la PIU máxima y el volumen vesical. Estos hallazgos sugieren que la estimulación selectiva de nervios perineales puede favorecer el cierre uretral y mejorar los mecanismos de continencia urinaria. Estos resultados podrían proporcionar información útil para desarrollar nuevos tratamientos de electroestimulación en nervios específicos del piso pélvico que contribuyan a la implementación de acciones que aminoren disfunciones urinarias relacionadas a la experiencia reproductiva. Por tal motivo, resulta viable estimular los nervios de músculos perineales como el Isc y el Be. Para ello se requiere conocer las respuestas de los músculos perineales a diferentes parámetros de estimulación (amplitud y frecuencia) para evaluar su estado funcional bajo dos condiciones, nuliparidad y multiparidad.

4. HIPÓTESIS

La multiparidad modifica la función neuromuscular de los músculos Isc y Be en respuesta a diferentes parámetros de estimulación eléctrica.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar los parámetros de estimulación eléctrica de los nervios Isc y Be para generar una respuesta contráctil óptima en los músculos perineales de conejas nulíparas y múltiparas.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar los parámetros de estimulación eléctrica del nBe registrando el umbral de estimulación, la PU, la PV, la fuerza contráctil y EMG's del músculo Be en conejas nulíparas y múltiparas.

- Determinar los parámetros de estimulación eléctrica del nIsc registrando el umbral de estimulación, la PU, la PV, la fuerza contráctil y EMG's del músculo Isc en conejas nulíparas.

6. MÉTODOLÓGÍA

Animales. En el presente estudio se utilizaron 24 conejas adultas de la raza Chinchilla (*Oryctolagus cuniculus*). Las hembras se alojaron en jaulas individuales de acero inoxidable (50 x 60 x 40 cm) bajo condiciones de bioterio en el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (Universidad Autónoma de Tlaxcala) con un ciclo de luz-oscuridad de 16:8 h (la luz se enciende a las 6 am) a temperatura de 20-28 °C. Se les proporcionó diariamente 200 gramos de alimento (Purina Coneja Chow) y agua *ad libitum*. Los Comités de Ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y de la Universidad Autónoma de Tlaxcala aprobaron todos los procedimientos experimentales.

Las hembras fueron asignadas aleatoriamente en dos grupos: nulíparas (N, n=18) y múltiparas (M, n=6). Las hembras nulíparas fueron distribuidas en 3 grupos para estimular el nIsc (n=6), el nBe (n=6), y el nCli (n=6; control no específico). Se estimuló el nCli como un control no específico, es decir, es un nervio sensorial que inerva diversas estructuras como: el clítoris, la vagina perineal, las glándulas prepuciales, el músculo constrictor vulvar y la piel perigenital. El primer experimento de este estudio consistió en determinar los parámetros de estimulación eléctrica del nIsc y el nBe registrando el umbral de estimulación, la PIU, la PIV, la fuerza contráctil y EMG's del mIsc y el mBe en conejas nulíparas. En la segunda parte de este estudio se determinó el efecto de la multiparidad sobre los parámetros de estimulación eléctrica del nBe (M, n=6 vs N, n=6).

La condición de multiparidad (4 partos) se obtuvo al aparear a las hembras a partir de los 6 meses de edad y nuevamente un día después de los primeros tres partos. Por lo tanto, las hembras estuvieron gestantes y lactantes durante un período de 20 días cuando las crías fueron destetadas (Martínez-Gómez y cols. 2011). En el día del cuarto parto, las crías recién nacidas fueron sacrificadas para evitar el período de lactancia y se dejaron transcurrir 20 días para dar oportunidad a las hembras múltiparas alcanzar una condición hormonal similar al de las hembras nulíparas, las cuales no fueron expuestas a ningún estímulo reproductivo (López-García y cols. 2013). Todas las hembras fueron anestesiadas con uretano (Sigma Chemical, EUA; 1.5 g/Kg diluido al 20% en agua destilada) administrado por vía intraperitoneal. Al final de los registros electrofisiológicos las hembras fueron sacrificadas con una sobredosis de uretano.

6.1 Experimento I. Caracterización de los parámetros de estimulación eléctrica del nIsc, el nBe y el nCli en conejas nulíparas

En este experimento se determinaron los parámetros de estimulación eléctrica del nIsc (n=6), el nBe (n=6) y el nCli (n=6; control no específico) registrando el umbral de estimulación, la fuerza contráctil, la PIU, la PIV, la actividad EMG's del mIsc y el mBe en conejas nulíparas.

6.1.1 Umbral de estimulación

El umbral de estimulación se definió como la cantidad de corriente que desencadena una mínima respuesta EMG en el mIsc y el mBe. Para ello se estimuló el nIsc, el nBe y el nCli y se registró simultáneamente la actividad EMG del mIsc y el mBe en conejas nulíparas (n=6, por cada nervio).

Electromiogramas (EMG's). Las hembras se colocaron en posición decúbito dorsal y se realizó una incisión en la línea media de la piel perineal, desde el clítoris al arco isquiático para localizar en la parte ventral de la vagina perineal, el mIsc y el mBe. Una vez identificados, se insertaron electrodos de aguja de plata (0.1 mm de diámetro) en la región media de cada músculo. Los electrodos se conectaron a un amplificador (Grass P511 AC) y éste a un osciloscopio de almacenamiento digital (Tektronix TDS2024C).

Disección del nIsc, nBe y nCli. La disección unilateral de los nervios se realizó utilizando un microscopio quirúrgico (modelo SMZ-2T, Nikon). Para localizar el nBe, se procedió a identificar el nCli en la región más cercana al origen del mBe caudal al hueso púbico separando cuidadosamente el tejido conectivo. Una vez localizado el nCli se identificó la rama que inerva el mBe. Para localizar el nIsc, se expuso el foramen del hueso púbico removiendo cuidadosamente los músculos que los cubrían. Una vez expuesto, se removió una parte del hueso realizando cortes laterales hacia la porción lateral del arco isquiático en dirección al tendón de origen del mIsc sin desincertarlo. En seguida se removieron las capas de fibras musculares expuestas hasta observar una capa de grasa. Posteriormente, el nIsc fue identificado separando cuidadosamente el tejido conectivo y adiposo cercano al origen del mIsc. El nCli se disecó después de la división de la rama que inerva el mBe, específicamente a nivel de la región media del mBe.

Estimulación eléctrica del nIsc, el nBe y nCli. La estimulación eléctrica de los nervios se realizó de manera unilateral. Los nervios fueron montados en electrodos bipolares de aguja de plata (0.1 mm de diámetro) y se aislaron con un compuesto de silicona fundida (KWIK-CAST) para evitar el flujo de corriente hacia otras estructuras adyacentes. Los electrodos se conectaron a un estimulador de corriente constante (Digitimer DS3) para aplicar pulsos cuadrados de corriente (Amperes) de intensidad graduada (mA), los cuales fueron disparados por un estimulador S84 (Grass Instruments). De manera inicial, se aplicaron pulsos únicos de corriente (1 Hz, 2 ms) en el nIsc, el nBe y nCli para encontrar el umbral de estimulación. La corriente se incrementó lentamente hasta que se observó una mínima deflexión en el registro EMG del mIsc y el mBe. Una vez determinado este valor, se multiplicó hasta 4xU para alcanzar la respuesta máxima de los músculos.

6.1.2 Fuerza mecánica contráctil del mIsc y el mBe en respuesta a la estimulación eléctrica del nIsc y el nBe

En este estudio se registró la fuerza contráctil generada por el mIsc y el mBe en respuesta a la estimulación eléctrica del nIsc y el nBe, respectivamente. Durante la estimulación eléctrica de los nervios se registró simultáneamente la fuerza contráctil y la actividad EMG del mIsc y el mBe en conejas nulíparas (n=6, por cada nervio).

Fuerza contráctil del mIsc y el mBe. Los músculos perineales se desinsertaron cortando el tendón de su inserción y separando el tejido conectivo circundante bajo un microscopio quirúrgico (modelo SMZ-2T, Nikon). A continuación, el tendón de cada músculo se sujetó individualmente mediante un hilo de algodón a un transductor de fuerza (Grass modelo FT03E). El transductor de fuerza se conectó a un amplificador Grass 7P1G DC (Grass Instruments, Quincy, MA). Una vez que se amplificó la señal se envió al programa PolyView 2.5 (Grass).

Electromiogramas (EMG's). Para el registro de la actividad EMG del mIsc y el mBe, los electrodos de aguja de plata (0.1 mm de diámetro) se colocaron en la región media de cada músculo y se conectaron a un amplificador (Grass P511 AC). Una vez que se amplificó la señal, ésta se envió al programa PolyView 2.5 (Grass).

Estimulación eléctrica del nIsc y el nBe. Se aplicaron pulsos cuadrados de corriente (mA) a través de un estimulador de corriente constante (Digitimer DS3) activado por un

estimulador S84 (Grass Instruments). El umbral de estimulación (4xU) determinado para el nIsc y el nBe se aplicó modificando la frecuencia de estimulación. Se aplicaron frecuencias bajas (1, 5, 10, 20 y 30 Hz) y frecuencias altas (40, 50, 60, 70 y 80 Hz), con una duración de 4 segundos cada una. Las frecuencias de estimulación se aplicaron aleatoriamente con un intervalo de 3 minutos para evitar la fatiga muscular. La fuerza contráctil generada por el mIsc y el mBe se normalizó en Newton por gramo de tejido (N/g) mediante la siguiente fórmula:

$$F \text{ (N/g)} = \frac{\text{fuerza contráctil del músculo (g)}}{1000 * 9.81 / \text{peso del músculo (g)}}$$

Siendo (F) la fuerza total que desarrolla el músculo por cada gramo (g) de tejido, el valor de 9.81 por efecto de la gravedad, entre el peso del músculo en g multiplicado por 1000.

6.1.3 PIU y PIV en respuesta a la estimulación eléctrica de los nervios perineales

Durante la estimulación eléctrica del nIsc, el nBe y el nCli se registró simultáneamente la PIU y la PIV, así como la actividad EMG del mIsc y el mBe en conejas nulíparas (n=6, por cada nervio).

PIU y PIV. La vejiga urinaria fue expuesta a través de una incisión sobre la piel y los músculos abdominales de aproximadamente 3 cm. La orina se drenó al ejercer presión manual sobre la vejiga. Posteriormente, se realizó una pequeña incisión en el ápice vesical y un catéter flexible de 1.5 mm de diámetro externo se introdujo y se desplazó hacia el interior del tracto urogenital hasta que éste apareció fuera de la abertura vaginal. El catéter se sujetó a un globo con hilo de algodón (8 cm de longitud) y se introdujo 5-5.5 cm hacia el interior del tracto urogenital específicamente a nivel de uretra. Para registrar la PIV, el globo se introdujo 2.5 cm a nivel de la vagina perineal donde se encuentran localizados los músculos perineales (Be e Isc). El globo se llenó con solución salina (39°C; 0.9%NaCl) mediante una jeringa hasta alcanzar el diámetro uretral y vaginal aproximadamente. Para registrar las variaciones de presión, el catéter se conectó a un transductor de presión P23BC (Statham, HatoRey, Puerto Rico) y éste a un amplificador Grass 7DA D.C. (Grass Instruments, Quincy, MA). El amplificador se conectó a otro canal del polígrafo (Grass 7P511) y una vez que se amplificó la señal, ésta se envió al programa PolyView 2.5 (Grass). Para confirmar la correcta posición del catéter en la uretra o la

vagina perineal, el globo se presionó manualmente hasta observar un incremento significativo de la presión en el sistema de registro. La PIU y la PIV se expresó en mmHg.

Electromiogramas (EMG's). Para el registro de la actividad EMG del mIsc y el mBe, los electrodos de aguja de plata (0.1 mm de diámetro) se conectaron a un amplificador (Grass P511 AC) y una vez que se amplificó la señal, se envió al programa PolyView 2.5 (Grass).

Estimulación eléctrica del nIsc, el nBe y nCli. Se aplicaron pulsos cuadrados de corriente (mA) a través un estimulador de corriente constante (Digitimer DS3) activado por un estimulador S84 (Grass Instruments). El umbral de estimulación (4xU) determinado para el nIsc, el nBe y el nCli se aplicó modificando la frecuencia de estimulación. Se aplicaron frecuencias bajas (1, 5, 10, 20 y 30 Hz) y frecuencias altas (40, 50, 60, 70 y 80 Hz) con una duración de 4 segundos cada una. Las frecuencias de estimulación se aplicaron aleatoriamente con un intervalo de 3 minutos para evitar la fatiga muscular. Al finalizar los registros electrofisiológicos, se obtuvo un segmento del nIsc, el nBe y el nCi de aproximadamente 0.5 mm de longitud para medir su diámetro. Cada nervio se disecó cuidadosamente separando el tejido conectivo circundante y ligando vasos sanguíneos para evitar sangrados excesivos.

6.2 Experimento II. Efecto de la multiparidad sobre los parámetros de estimulación eléctrica del nBe en conejas adultas

En este experimento se utilizaron 6 conejas nulíparas y 6 conejas múltiparas (n=12). Una vez anestesiadas las conejas se determinó el efecto de la multiparidad sobre los parámetros de estimulación eléctrica del nBe registrando el umbral de estimulación, la fuerza contráctil del mBe, la PIU, la PIV y la actividad EMG del mBe. Se siguió el mismo procedimiento y protocolo de estimulación descrito para el experimento I. El umbral de estimulación (4xU) determinado para el nBe se aplicó modificando la frecuencia de estimulación. Se aplicaron frecuencias bajas (1, 5, 10, 20 y 30 Hz) y frecuencias altas (40, 50, 60, 70 y 80 Hz) con una duración de 4 segundos cada una. Las frecuencias de estimulación se aplicaron aleatoriamente con un intervalo de 3 minutos para evitar la fatiga muscular. Al finalizar los registros electrofisiológicos se obtuvo un segmento del nBe de aproximadamente 0.5 mm de longitud para medir su diámetro. El nBe se disecó cuidadosamente separando el tejido conectivo circundante y se ligaron vasos sanguíneos para evitar sangrados excesivos.

6.3 Análisis estadístico

Los datos están expresados como media \pm error estándar. Los datos fueron sometidos a la prueba de normalidad de kolmogorov-Smirnov. En el experimento I, se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía con una $P \leq 0.05$, y una prueba post-hoc de Tukey para determinar diferencias significativas en el diámetro y el umbral de estimulación del nIsc, el nBe y el nCli. Para determinar diferencias significativas en la fuerza contráctil y en el peso del mIsc y el mBe se realizó una *t de student* para datos no pareados. Para determinar las diferencias significativas en la PIU y la PIV generada por la estimulación eléctrica del nIsc, el nBe y el nCli se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía con una $P \leq 0.05$, y una prueba post-hoc de Tukey. En el experimento II, se realizó una *t de student* para datos no pareados para determinar las diferencias en el diámetro y el umbral de estimulación del nBe entre nulíparas y multíparas. Para determinar diferencias significativas en la fuerza contráctil y en el peso del mBe entre nulíparas y multíparas se realizó una *t de student* para datos no pareados. Para determinar las diferencias significativas en la PIU y la PIV generada por la estimulación eléctrica del nBe entre nulíparas y multíparas se realizó una *t de student* para datos no pareados. Los datos se analizaron con la ayuda del paquete de análisis estadístico GraphPad Prim (versión 9.0 para Windows).

7. RESULTADOS

7.1 Edad y peso corporal de conejas nulíparas

La edad promedio de las hembras nulíparas fue de 14.77 ± 0.66 meses y su peso corporal fue de 4.30 ± 0.13 Kg (Tabla 1).

Tabla 1. Edad y peso corporal de hembras nulíparas (N, n=18).

	Nulíparas
Edad (meses)	14.77 ± 0.66
Peso corporal (Kg)	4.30 ± 0.13

Los valores representan la media \pm error estándar.

7.2 Características morfofisiológicas de los nervios perineales de conejas nulíparas

7.2.1 Diámetro de los nervios perineales.

Para medir el diámetro de los nervios perineales (nIsc, nBe y el nCli) se procedió a identificar su localización anatómica. El nIsc se identificó entre las fibras musculares de la superficie ventral del mIsc. Con la finalidad de preservar la integridad muscular y nerviosa del Isc para realizar los registros electrofisiológicos, así como para extraer un segmento del nIsc viable para medir su diámetro se localizó el nIsc proximal al mIsc, fue expuesto el foramen izquierdo del hueso púbico, removiendo cuidadosamente el músculo que lo cubre. Una vez expuesto, se removió parte del hueso, a través de cortes laterales en el arco isquiático cerca del tendón de origen del mIsc y sin desinsertarlo. En seguida se removieron las fibras musculares expuestas hasta observar el tejido adiposo. El nIsc fue localizado separando cuidadosamente el tejido adiposo y conectivo en dirección al tendón de origen del mIsc. Se observó que el nIsc se dirige junto con un vaso sanguíneo delgado hacia la región media del mIsc (Figura 19A).

Para localizar el nBe primero se identificó el nCli en la región más cercana al origen del mBe, caudal al hueso púbico separando cuidadosamente el tejido conectivo que lo rodea. Una vez localizado el nCli se identificó la rama que se dirige hacia la parte posterior del mBe. El nBe fue localizado cerca del origen del mBe aproximadamente 0.5 cm lateral al pubis. Mientras, el nCli se dirige caudalmente entre el mBe y el mIsc hacia la vagina perineal y el clítoris. El

nCli se disecó después de la división de la rama que inerva el mBe específicamente a nivel de la región media del mBe (Figura 19B).

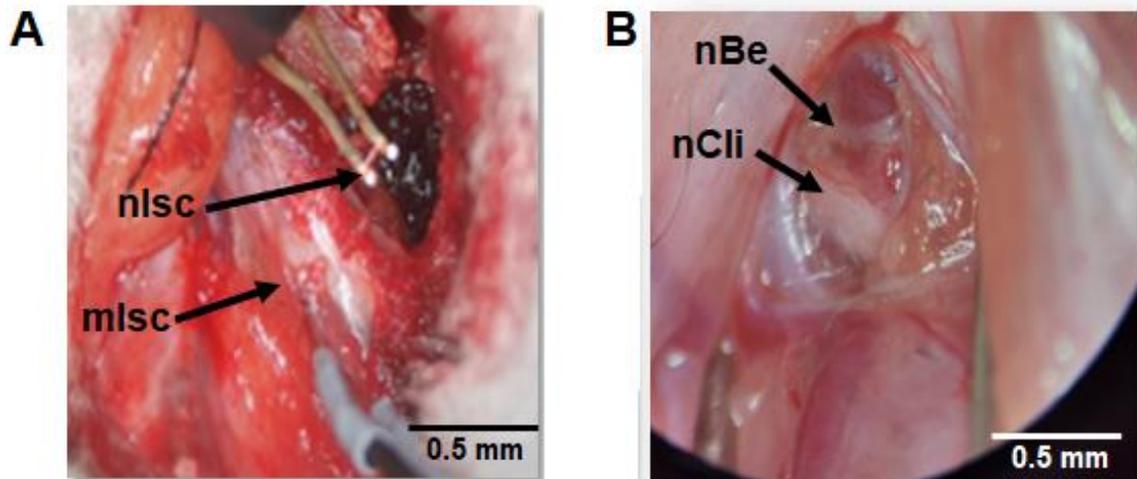


Figura 19. Fotografías que muestran la localización anatómica de los nervios perineales de la coneja. A) El nIsc fue identificado en dirección al tendón de origen del mIsc. B) El nBe fue localizado cerca del origen del mBe aproximadamente 0.5 cm caudal al pubis. El nBe es una rama del nCli por lo que se recomienda primero localizar el nCli para proceder a la identificación del nBe. Después de la división de la rama que inerva al mBe, el nCli se dirige caudalmente entre el mBe y el mIsc hacia la vagina perineal y el clítoris. El nCli se disecó a nivel de la región media del mBe. nIsc, nervio isquiocavernoso; mIsc, músculo isquiocavernoso; nBe, nervio bulboesponjoso; nCli, nervio clitoral; mBe, músculo bulboesponjoso; mm, milímetros.

El diámetro de los nervios perineales se midió al finalizar los registros electrofisiológicos. Cada nervio se disecó cuidadosamente separando el tejido conectivo circundante. El diámetro del nCli fue significativamente mayor en comparación con el nIsc y el nBe (nIsc, 0.18 ± 0.02 mm; nBe 0.17 ± 0.005 mm; nCli 0.56 ± 0.05 mm, $F_{2, 12} = 47.85$, $P < 0.0001$) (Figura 20).

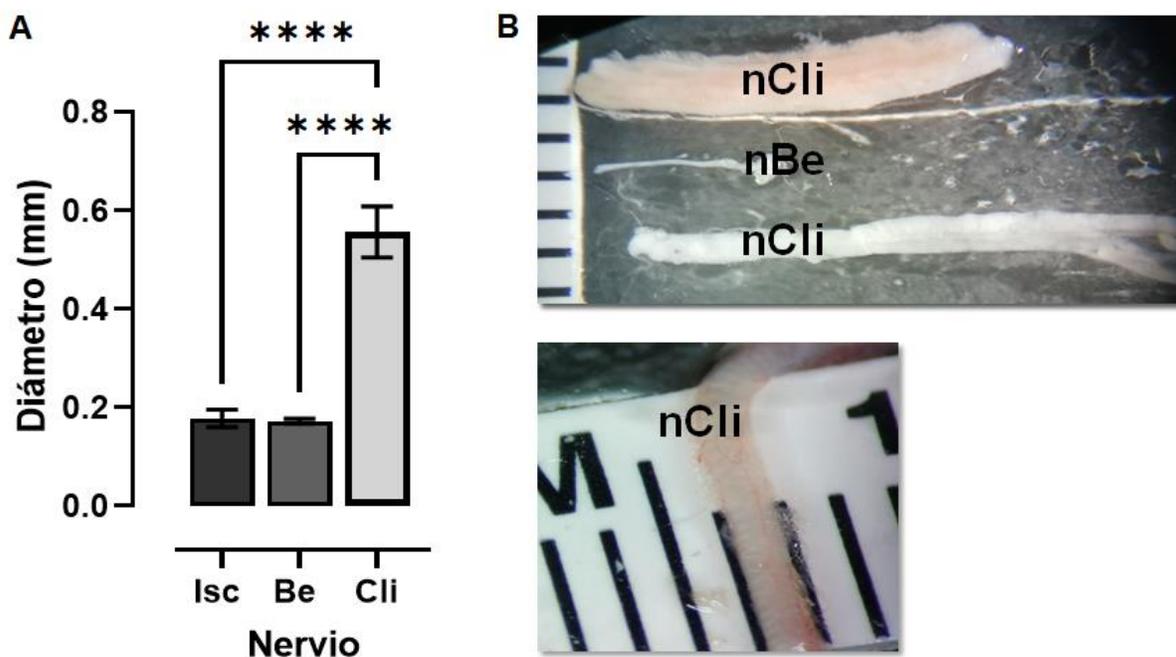


Figura 20. Diámetro y fotografías de los nervios perineales de conejas nulíparas. A) Diámetro de los nervios perineales. Los datos representan la media \pm error estándar. Para determinar las diferencias significativas entre los nervios perineales (nIsc, nBe y nCli; N, n=5 por cada nervio) se realizó una ANOVA de una vía y una prueba post-hoc de Tukey (**** $P < 0.0001$). El diámetro del nCli es significativamente mayor en comparación con el nIsc y el nBe. B) Fotografías de los nervios perineales. Se muestra un segmento del nCli y el nBe de una coneja nulípara. Isc, nervio isquiocavernoso; Be, bulboesponjoso; Cli, clítoral; mm, milímetros.

7.2.2 Umbral de estimulación. El umbral de estimulación (1xU) se definió como la cantidad de corriente necesaria para generar la mínima respuesta EMG en el mIsc y el mBe. Para ello, se estimuló selectivamente el nIsc, el nBe y el nCli (control no específico) de manera unilateral y se registró simultáneamente la actividad EMG del mIsc y el mBe, respectivamente. Se aplicaron pulsos únicos de corriente (1Hz, 2 ms) de intensidad graduada (mA). La corriente eléctrica se incrementó lentamente hasta observar una mínima deflexión en el registro EMG del mIsc y el mBe (Figura 21A, B). El umbral de estimulación obtenido durante la estimulación eléctrica del nCli (control no específico) fue significativamente mayor en comparación con los valores obtenidos durante la estimulación eléctrica selectiva del nIsc y el nBe (0.77 ± 0.09 mA, 0.46 ± 0.03 mA, 0.49 ± 0.01 mA, $F_{2, 27} = 8.422$, $P = 0.0014$; respectivamente) (Gráfica 1A). La estimulación eléctrica del nCli no desencadenó la respuesta electromiográfica del mIsc y el mBe, sólo se registró el artefacto del estímulo (Figura 21C, D). Por tal motivo, para este nervio el umbral de

estimulación se definió como la cantidad de corriente necesaria para generar la mínima contracción vulvar visualmente perceptible.

Una vez determinado el umbral de estimulación específico para cada uno de los nervios perineales, este se multiplicó hasta 4xU (1Hz, 2 ms) para alcanzar la máxima respuesta EMG del mIsc y el mBe. Por lo tanto, la estimulación eléctrica del nCli a 4xU fue significativamente mayor en comparación con los valores obtenidos durante la estimulación eléctrica selectiva del nIsc y el nBe (2.80 ± 0.17 mA, 1.86 ± 0.13 mA, 1.96 ± 0.06 mA, $F_{2, 27} = 15.85$, $P < 0.0001$; respectivamente) (Gráfica 1B).

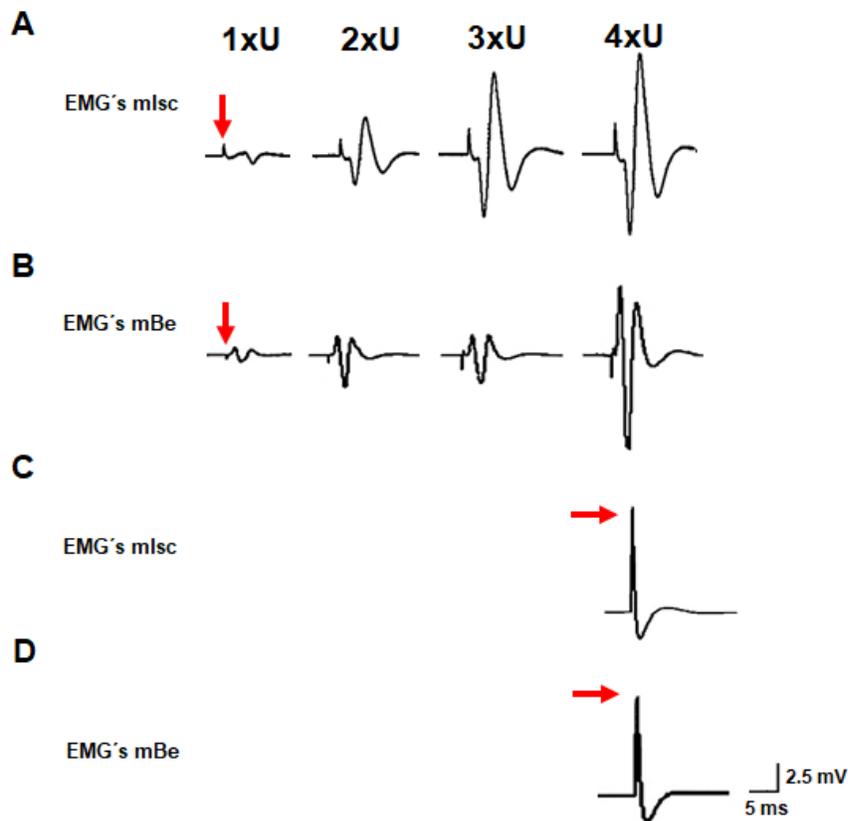
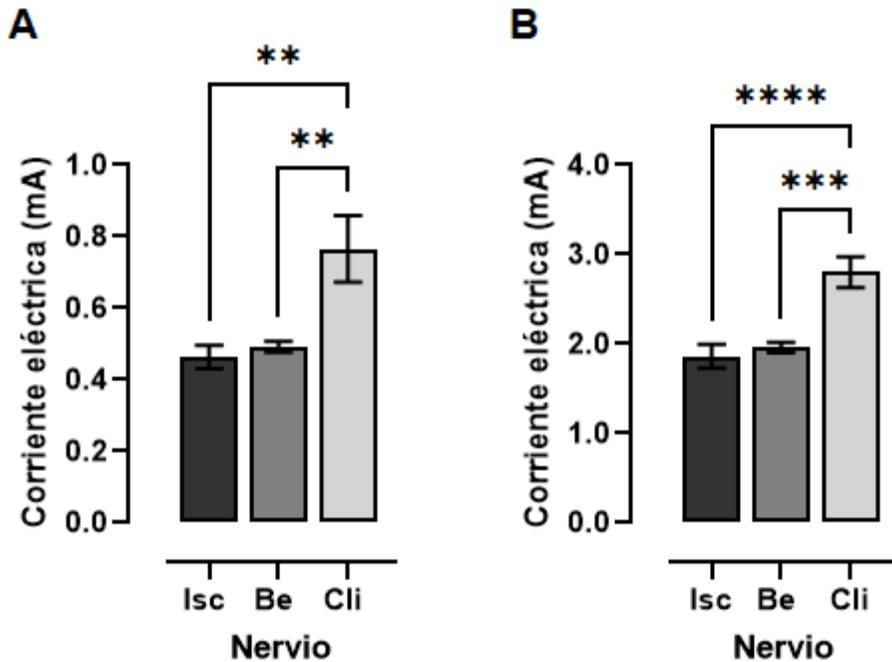


Figura 21. Registros EMG's del mIsc y mBe en respuesta a la estimulación eléctrica de los nervios perineales de una coneja nulípara. Se muestran los registros EMG's representativos del mIsc y mBe evocados por pulsos únicos de corriente (1Hz, 2 ms) a diferentes intensidades (1-4xU) aplicados en el nIsc (A), el nBe (B) y el nCli (N, n=10 por cada nervio) (C, D). La estimulación eléctrica del nCli no desencadenó la respuesta electromiográfica del mIsc y el mBe. Las flechas rojas indican el artefacto del estímulo. Los registros EMG's representan la media de 16. EMG's, electromiogramas; mIsc, músculo isquiocavernoso; mBe, músculo bulboesponjoso; mV, milivolts; ms, milisegundos.



Gráfica 1. Valor umbral obtenido durante la estimulación eléctrica selectiva de los nervios perineales de conejas nulíparas. A) Umbral del estímulo (1xU) que desencadena una mínima respuesta EMG en el mIsc y el mBe. B) Umbral del estímulo (4xU) que desencadena la máxima respuesta EMG del mIsc y el mBe. Los datos representan la media \pm error estándar. Para determinar las diferencias significativas en el valor umbral obtenido durante la estimulación eléctrica de los nervios perineales (nIsc, nBe y nCli; n=10 por cada nervio) se realizó una ANOVA de una vía y una prueba post-hoc de Tukey ($P \leq 0.05$). EMG, electromiogramas; mIsc, músculo isquiocavernoso; mBe, músculo bulboesponjoso; Isc, isquiocavernoso; Be, bulboesponjoso; Cli, clítoral; mA, miliamperios.

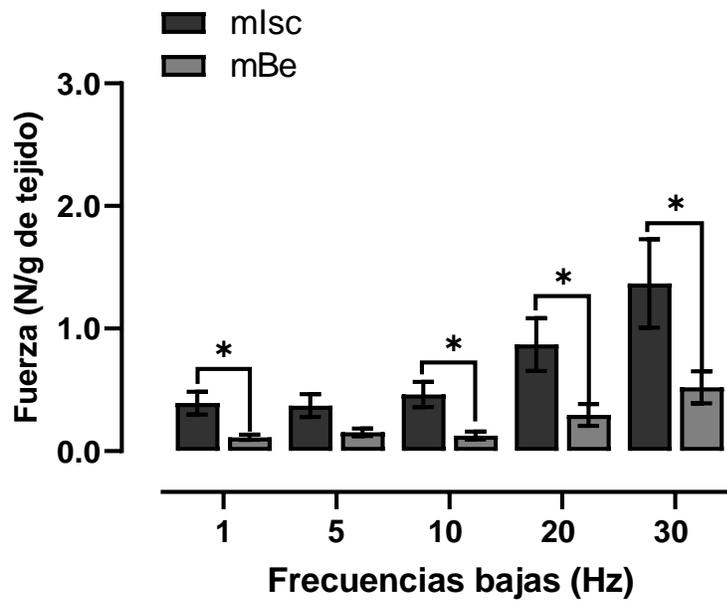
7.3 Fuerza mecánica contráctil del mIsc y el mBe en respuesta a la estimulación eléctrica del nIsc y el nBe en conejas nulíparas.

La actividad EMG y la fuerza contráctil del mIsc y el mBe fueron registradas simultáneamente durante la estimulación eléctrica unilateral del nIsc y el nBe, respectivamente. Los nervios fueron estimulados con pulsos cuadrados de corriente a 4xU modificando la frecuencia de estimulación. Se aplicaron frecuencias bajas (1, 5, 10, 20 y 30 Hz) y frecuencias altas (40, 50, 60, 70 y 80 Hz) con una duración de 4 segundos cada una. Las frecuencias de estimulación se aplicaron aleatoriamente con un intervalo de 3 minutos para evitar la fatiga muscular.

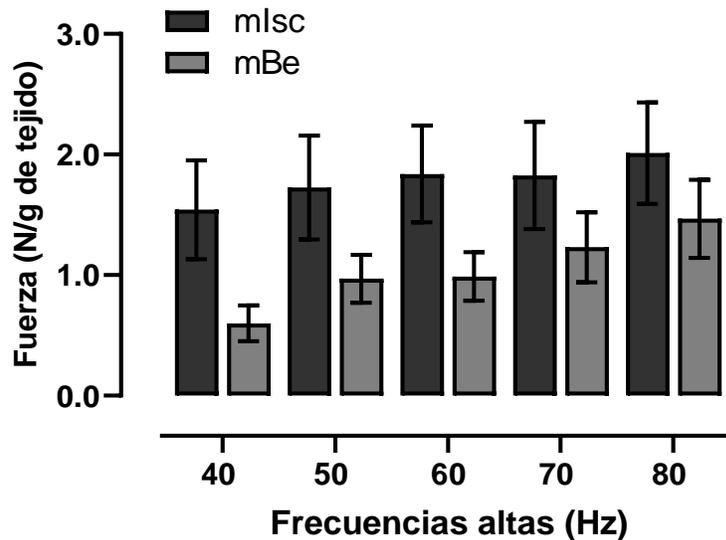
El umbral del estímulo (4xU) determinado para el nIsc y el nBe no mostró diferencias significativas (1.87 ± 0.22 vs 2.23 ± 0.28 mA, $t_6 = 1.045$, $P = 0.320$; respectivamente). La estimulación eléctrica unilateral del nIsc y el nBe desencadenó actividad EMG ipsilateral en el mIsc y el mBe, respectivamente. Asimismo, se registró un incremento en la fuerza contráctil generada por los músculos de manera dependiente de la frecuencia. Los registros representativos

de la mecánica contráctil se graficaron en gramos. La estimulación eléctrica del nIsc y el nBe a frecuencias bajas (1, 5 y 10 Hz) provocó respuestas contráctiles simples en los músculos que siguieron la frecuencia de estimulación aplicada. A 20 y 30 Hz se comenzó a observar la tetanización de las fibras musculares. Durante la estimulación eléctrica a frecuencias altas (40, 50, 60, 70 y 80 Hz), las respuestas contráctiles se fusionaron por completo adquiriendo la forma característica de tetanos y a partir de 50 Hz se observó fatiga muscular.

Los datos estadísticos de la fuerza contráctil de los músculos perineales se reportan normalizados en N/g de tejido. El peso del mBe fue significativamente mayor en comparación con el mIsc (0.19 ± 0.02 vs 0.12 ± 0.004 gramos, $t_6=3.177$, $P=0.009$; respectivamente). La fuerza normalizada incremento gradualmente en magnitud siguiendo el tren de estimulación a diferentes frecuencias. Conforme se aumentaba la frecuencia de estimulación (20-80Hz), la fuerza contráctil desarrollada por los músculos perineales también se incrementaba. Durante la estimulación eléctrica a bajas frecuencias, la fuerza contráctil del mIsc fue significativamente mayor comparado con el mBe (1 Hz, 0.39 ± 0.09 vs 0.11 ± 0.02 N/g, $t_6=2.926$, $P=0.015$; 5 Hz, 0.37 ± 0.09 vs 0.16 ± 0.03 N/g, $t_6=2.214$, $P=0.051$; 10 Hz, 0.46 ± 0.10 vs 0.13 ± 0.03 N/g, $t_6=3.132$, $P=0.010$; 20 Hz, 0.87 ± 0.22 vs 0.30 ± 0.09 N/g, $t_6=2.471$, $P=0.033$; 30 Hz, 1.37 ± 0.36 vs 0.52 ± 0.13 N/g, $t_6=2.200$, $P=0.052$; respectivamente) (Gráfica 2). Se obtuvo una tendencia similar durante la estimulación eléctrica a altas frecuencias sin diferencias estadísticamente significativas al comparar la fuerza contráctil del mIsc y el mBe (40 Hz, 1.54 ± 0.41 vs 0.60 ± 0.15 N/g, $t_6=2.164$, $P=0.055$; 50 Hz, 1.73 ± 0.43 vs 0.97 ± 0.20 N/g, $t_6=1.594$, $P=0.142$; 60 Hz, 1.84 ± 0.40 vs 0.99 ± 0.20 N/g, $t_6=1.895$, $P=0.087$; 70 Hz, 1.83 ± 0.44 vs 1.23 ± 0.29 N/g, $t_6=1.121$, $P=0.288$; 80 Hz, 2.01 ± 0.42 vs 1.47 ± 0.32 N/g, $t_6=1.026$, $P=0.329$; respectivamente) (Gráfica 3). La máxima fuerza contráctil generada por el mIsc y el mBe se registró al estimular el nIsc y el nBe a 80 Hz.



Gráfica 2. Fuerza contráctil generada por los músculos perineales a frecuencias bajas en conejas nulíparas. Se muestra los valores de la fuerza contráctil normalizada (N/g de tejido) generada por el mIsc y el mBe como respuesta a la estimulación eléctrica del nIsc y el nBe, respectivamente (N, n=6 por cada músculo). Los datos representan la media±error estándar. Para determinar diferencias significativas entre en la fuerza contráctil de los músculos se realizó una prueba de t de student de dos colas para datos no pareados (*P<0.05). mIsc, músculo isquiocavernoso; mBe, músculo bulboesponjoso; nIsc, nervio isquiocavernoso; nBe, nervio bulboesponjoso; Hz, Hertz; N, newton; g, gramos.



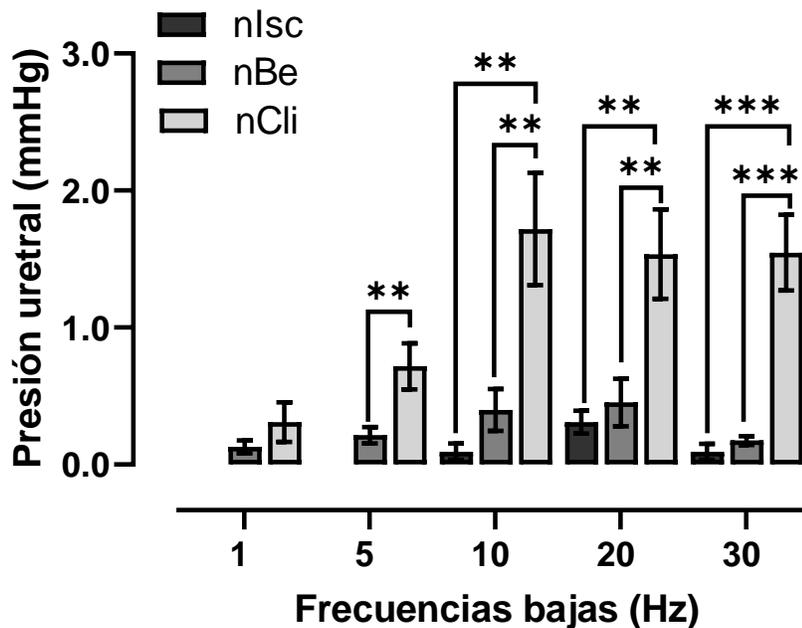
Gráfica 3. Fuerza contráctil generada por los músculos perineales a frecuencias altas en conejas nulíparas. Se muestra los valores de la fuerza contráctil normalizada (N/g de tejido) generada por el mIsc y el mBe como respuesta a la estimulación eléctrica del nIsc y el nBe, respectivamente (N, n=6 por cada músculo). Los datos representan la media±error estándar. Para determinar diferencias significativas entre en la fuerza contráctil de los músculos se realizó una prueba de t de student de dos colas para datos no pareados (*P<0.05). mIsc, músculo isquiocavernoso; mBe, músculo bulboesponjoso; nIsc, nervio isquiocavernoso; nBe, nervio bulboesponjoso; Hz, Hertz; N, newton; g, gramos.

7.4 Presión intrauretral en respuesta a la estimulación eléctrica de los nervios perineales en conejas nulíparas

Durante la estimulación eléctrica unilateral del nIsc, el nBe y el nCli (control no específico) se registró simultáneamente la PIU y la actividad EMG ipsilateral del mIsc y el mBe. Se siguió el mismo protocolo de estimulación descrito para la fuerza contráctil.

El umbral del estímulo (4xU) determinado para el nCli fue significativamente mayor en comparación con el valor umbral obtenido para el nIsc y el nBe (2.97 ± 0.24 , 1.87 ± 0.22 , 1.89 ± 0.07 mA, $F_{2,15} = 10.88$, $P=0.0012$; respectivamente). La estimulación eléctrica unilateral de los nervios perineales desencadenó la actividad EMG ipsilateral del mIsc y el mBe que coincidió con un incremento en la PIU, de manera diferencial. Los registros representativos de la PIU están expresados en mmHg. Los cambios en la PIU generados por trenes de estimulación de frecuencia ascendente aplicados al nIsc y el nBe siguieron la frecuencia de estimulación regresando inmediatamente a la línea basal cuando la estimulación finalizó. Sin embargo, el incremento en la PIU se mantuvo constante y regresó a la línea basal segundos después de la estimulación eléctrica del nCli. Durante un estímulo simple (1 Hz) aplicado al nBe y el nCli provocó un incremento en la PIU apenas perceptible sin diferencias significativas entre los nervios estimulados (0.13 ± 0.05 vs 0.31 ± 0.15 mmHg, $F_{2,15} = 3.129$, $P=0.0732$; respectivamente). A 5 Hz, la estimulación del nCli incrementó significativamente la PIU en comparación con la estimulación del nBe (0.72 ± 0.17 vs 0.22 ± 0.06 mmHg, $F_{2,15} = 12.90$, $P=0.0006$; respectivamente). Mientras, la estimulación del nIsc generó un incremento en la PIU a partir de 20 y 30 Hz. Durante la estimulación eléctrica del nCli a 10 Hz, la PIU fue significativamente mayor en comparación con la estimulación del nIsc y el nBe (1.72 ± 0.41 , 0.09 ± 0.06 , 0.40 ± 0.15 mmHg, $F_{2,15} = 11.49$, $P=0.0009$; respectivamente). Lo mismo fue obtenido cuando se estimuló el nCli a 20 Hz (nCli, 1.54 ± 0.33 , nIsc, 0.31 ± 0.08 , nBe, 0.45 ± 0.17 mmHg; $F_{2,15} = 9.372$, $P=0.0023$), 30 Hz (nCli, 1.55 ± 0.28 , nIsc 0.09 ± 0.06 , nBe, 0.18 ± 0.03 mmHg; $F_{2,15} = 24.82$, $P<0.0001$) (Gráfica 4), 40 Hz (nCli, 1.06 ± 0.26 , nIsc, 0.49 ± 0.11 , nBe 0.39 ± 0.12 mmHg; $F_{2,15} = 4.118$, $P=0.0375$), 50 Hz (nCli, 1.77 ± 0.47 , nIsc, 0.40 ± 0.02 , nBe, 0.55 ± 0.31 mmHg; $F_{2,15} = 5.393$, $P=0.0172$), 60 Hz (nCli, 1.36 ± 0.34 , nIsc 0.34 ± 0.03 , nBe 0.23 ± 0.04 mmHg; $F_{2,15} = 9.684$, $P=0.0020$), 70 Hz (nCli, 1.74 ± 0.45 , nIsc 0.48 ± 0.04 , nBe, 0.26 ± 0.05 mmHg; $F_{2,15} = 9.045$, $P=0.0026$) y 80 Hz (nCli, 1.78 ± 0.36 , nIsc 0.40 ± 0.05 , nBe

0.34±0.11 mmHg; $F_{2,15} = 13.70$, $P=0.0004$) (Gráfica 5). A partir de la estimulación eléctrica del nIsc a 20 Hz, se registró un incremento en la PIU y este se mantuvo constante hasta los 40-80 Hz. La PIU máxima registrada durante la estimulación del nIsc fue a 70 Hz. Mientras que a partir de la estimulación eléctrica del nBe a 5 Hz, se observó un aumento en la PIU que se mantuvo hasta 80 Hz. La PIU máxima inducida por la estimulación del nBe se obtuvo a 50 Hz. Durante la estimulación eléctrica del nCli, a 1 Hz se registró un incremento en la PIU y este permaneció constante de 10-80 Hz. La PIU máxima fue registrada al estimular el nCli a 80 Hz.



Gráfica 4. Presión intrauretral en respuesta a la estimulación eléctrica de nervios perineales a frecuencias bajas en conejas nulíparas. Se muestran los valores de la presión uretral (mmHg) inducida por la estimulación eléctrica del nIsc, el nBe y el nCli (N, n=6 por cada músculo). Los datos representan la media±error estándar. Para determinar diferencias significativas en la presión uretral obtenida durante la estimulación eléctrica de los nervios perineales se realizó una ANOVA de una vía y una prueba post-hoc de Tukey * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.0001$. nIsc, nervio isquiocavernoso; nBe, nervio bulboesponjoso; nIsc; nCli, nervio clitoral; Hz, Hertz; mmHg, milímetros de mercurio.

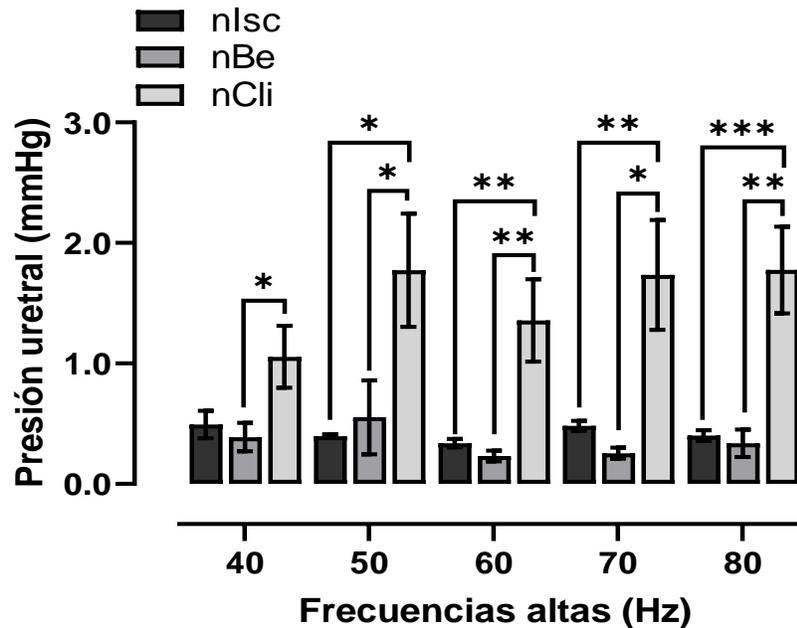


Gráfico 5. Presión intrauretral en respuesta a la estimulación eléctrica de nervios perineales a frecuencias altas en conejas nulíparas. Se muestran los valores de la presión uretral (mmHg) inducida por la estimulación eléctrica del nIsc, el nBe y el nCli (N, n=6 por cada músculo). Los datos representan la media±error estándar. Para determinar diferencias significativas en la presión uretral obtenida durante la estimulación eléctrica de los nervios perineales se realizó una ANOVA de una vía y una prueba post-hoc de Tukey *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.0001. nIsc, nervio isquiocavernoso; nBe, nervio bulboesponjoso; nCli, nervio clitoral; Hz, Hertz; mmHg, milímetros de mercurio.

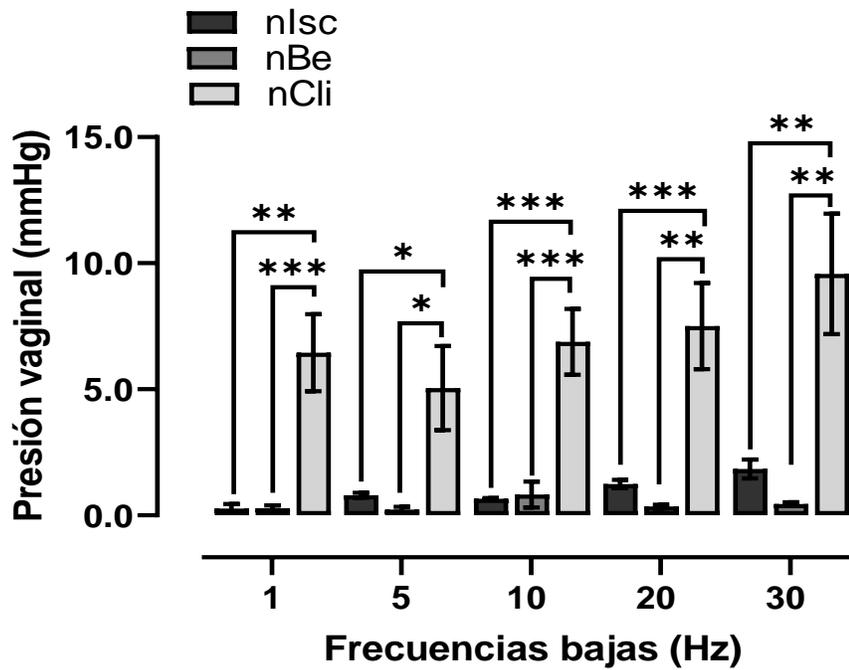
7.5 Presión intravaginal en respuesta a la estimulación eléctrica de los nervios perineales en conejas nulíparas

Durante la estimulación eléctrica unilateral del nIsc, el nBe y el nCli (control no específico) se registró simultáneamente la PIV y la actividad EMG ipsilateral del mIsc y el mBe. Se siguió el mismo protocolo de estimulación descrito para la fuerza contráctil y la PIU.

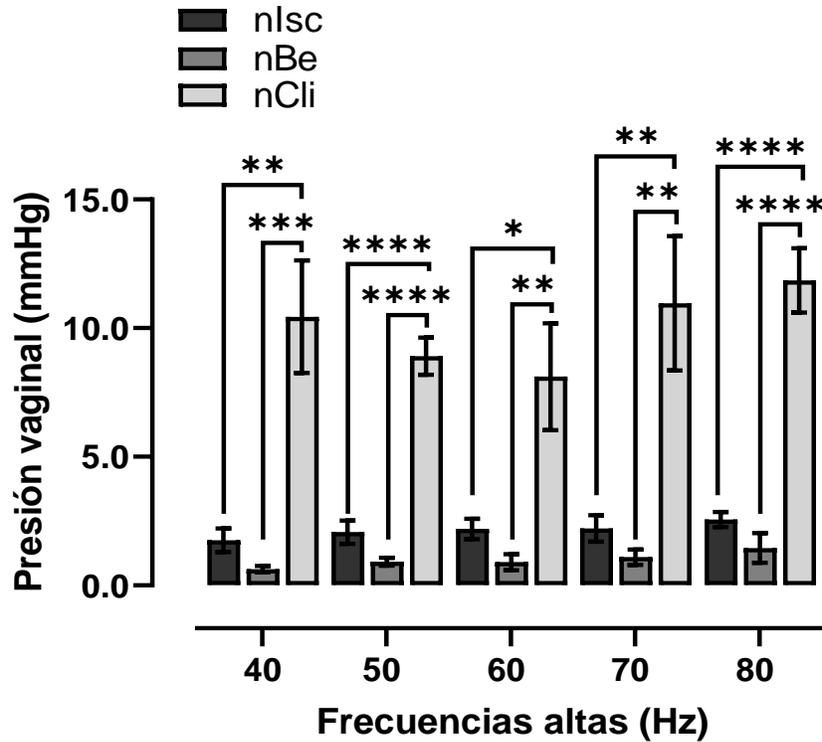
El umbral del estímulo (4xU) determinado para el nCli fue significativamente mayor en comparación con el umbral de estimulación obtenido para el nIsc y el nBe (2.97 ± 0.24 , 1.87 ± 0.22 , 2.06 ± 0.20 mA, $F_{2, 15} = 7.213$, $P = 0.0064$; respectivamente). La estimulación eléctrica de los nervios perineales desencadenó la actividad EMG del mIsc y el mBe que coincidió con un incremento en la PIV. Los cambios en la PIV generados por trenes de estimulación aplicados al nIsc y el nBe siguieron la frecuencia de estimulación regresando inmediatamente a la línea basal cuando la estimulación finalizó. Lo contrario fue observado durante la estimulación

eléctrica del nCli que incrementó la PIV y está regreso a la línea basal segundos después de que la estimulación finalizó. Los registros representativos de la PIV están expresados en mmHg. La PIV incrementó a medida que se aumentó la frecuencia de estimulación independientemente del nervio estimulado.

La PIV a 1 Hz fue significativamente mayor al estimular el nCli en comparación con la estimulación del nIsc y el nBe (nCli, 6.46 ± 1.53 , nIsc, 0.28 ± 0.17 , nBe, 0.29 ± 0.10 mmHg; $F_{2, 14} = 14.56$, $P=0.0004$), 5 Hz (nCli, 5.05 ± 1.67 , nIsc, 0.80 ± 0.10 , nBe, 0.24 ± 0.10 mmHg; $F_{2, 14} = 6.649$, $P=0.0093$), 10 Hz (nCli, 6.88 ± 1.31 , nIsc, 0.66 ± 0.03 , nBe, 0.82 ± 0.51 mmHg; $F_{2, 14} = 18.25$, $P=0.0001$), 20 Hz (nCli, 7.51 ± 1.71 , nIsc, 1.24 ± 0.16 , nBe, 0.35 ± 0.08 mmHg; $F_{2, 14} = 13.89$, $P=0.0005$) y 30 Hz (nCli, 9.58 ± 2.39 , nIsc, 1.84 ± 0.37 , nBe, 0.45 ± 0.07 mmHg; $F_{2, 14} = 11.06$, $P=0.0013$) (Gráfica 6). Lo mismo fue registrado al estimular el nCli a 40 Hz (nCli, 10.44 ± 2.19 , nIsc, 1.76 ± 0.46 , nBe, 0.63 ± 0.13 mmHg; $F_{2, 14} = 15.45$, $P=0.0003$), 50 Hz (nCli, 8.91 ± 0.72 , nIsc, 2.07 ± 0.45 , nBe, 0.93 ± 0.16 mmHg; $F_{2, 14} = 67.69$, $P<0.0001$), 60 Hz (nCli, 8.12 ± 2.08 , nIsc 2.20 ± 0.39 , nBe, 0.90 ± 0.31 mmHg; $F_{2, 14} = 8.711$, $P=0.0035$), 70 Hz (nCli, 10.97 ± 2.61 , nIsc, 2.21 ± 0.56 , nBe, 1.10 ± 0.30 mmHg; $F_{2, 14} = 10.98$, $P=0.0014$) y 80 Hz (nCli, 11.85 ± 1.25 , nIsc, 2.57 ± 0.29 , nBe, 1.46 ± 0.58 mmHg; $F_{2, 14} = 47.16$, $P<0.0001$) (Gráfica 7). Aunque la PIV registrada durante la estimulación eléctrica del nIsc fue mayor en comparación con el nBe no presentó diferencias significativas. La PIV máxima registrada durante estimulación eléctrica de los nervios perineales fue registrada a 80 Hz.



Gráfica 6. Presión intravaginal en respuesta a la estimulación eléctrica de nervios perineales a frecuencias bajas en conejas nulíparas. Se muestran los valores de la presión vaginal (mmHg) inducida por la estimulación eléctrica del nIsc, el nBe y el nCli (N, n=6 por cada músculo). Los datos representan la media±error estándar. Para determinar diferencias significativas en la presión vaginal obtenida durante la estimulación eléctrica de los nervios perineales se realizó una ANOVA de una vía y una prueba post-hoc de Tukey *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.0001. nIsc, nervio isquiocavernoso; nBe, nervio bulboesponjoso; nIsc; nCli, nervio clitoral; Hz, Hertz; mmHg, milímetros de mercurio.



Gráfica 7. Presión intravaginal en respuesta a la estimulación eléctrica de nervios perineales a frecuencias altas en conejas nulíparas. Se muestran los valores de la presión vaginal (mmHg) inducida por la estimulación eléctrica del nIsc, el nBe y el nCli (N, n=6 por cada músculo). Los datos representan la media±error estándar. Para determinar diferencias significativas en la presión vaginal obtenida durante la estimulación eléctrica de los nervios perineales se realizó una ANOVA de una vía y una prueba post-hoc de Tukey *P<0.05; ***P<0.01; ****P<0.0001. nIsc, nervio isquiocavernoso; nBe, nervio bulboesponjoso; nIsc; nCli, nervio clitoral; Hz, Hertz; mmHg, milímetros de mercurio.

7.6 Edad y peso corporal de conejas múltíparas vs nulíparas

La edad y el peso corporal de las hembras múltíparas y nulíparas fue similar entre condiciones (Tabla 2).

Tabla 2. Edad y peso corporal de hembras múltíparas y nulíparas (M, n=6 vs N, n=6).

	Múltíparas	Nulíparas	P
Edad (meses)	15.67±0.67	13.83±1.17	0.202
Peso corporal (Kg)	3.78±0.08	4.04±0.19	0.234

Los valores representan la media ± error estándar. Para determinar diferencias significativas entre en la fuerza contráctil de los músculos se realizó una prueba de t de student de dos colas para datos no pareados *P<0.05.

7.7 Características morfofisiológicas del nBe en conejas múltiparas vs nulíparas

7.7.1 Diámetro de los nervios perineales.

El diámetro del nBe se midió después de finalizar los registros electrofisiológicos. El nBe (M, n=6 vs N, n=6) se disecó cuidadosamente separando el tejido conectivo circundante y ligando los vasos sanguíneos para evitar sangrados excesivos. El diámetro del nBe de hembras múltiparas y nulíparas presentaron valores semejantes (M, 0.17 ± 0.01 vs N, 0.18 ± 0.01 mm, $t_6=0.684$, $P=0.509$) (Figura 22).

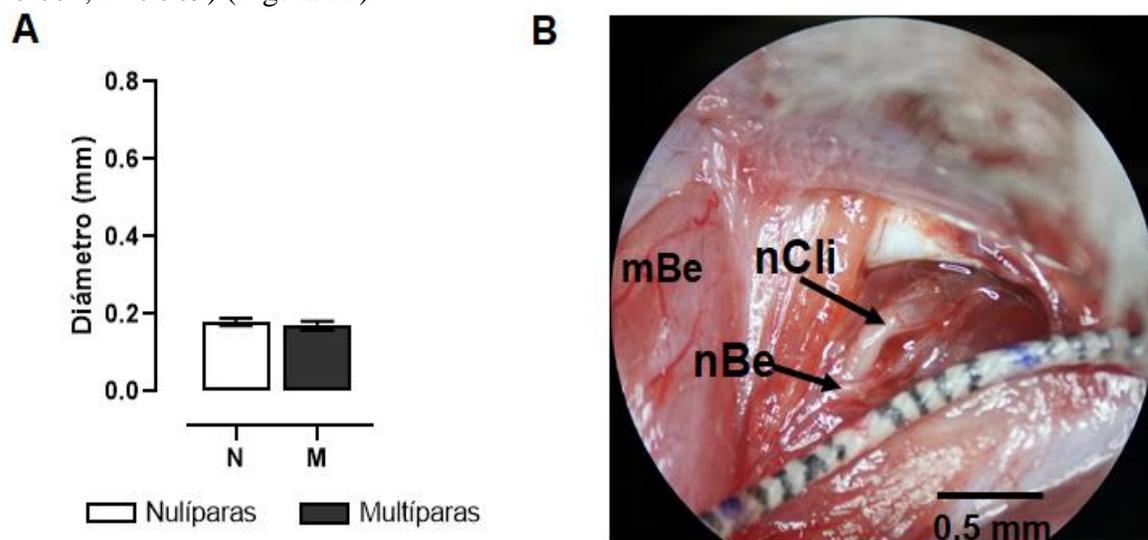
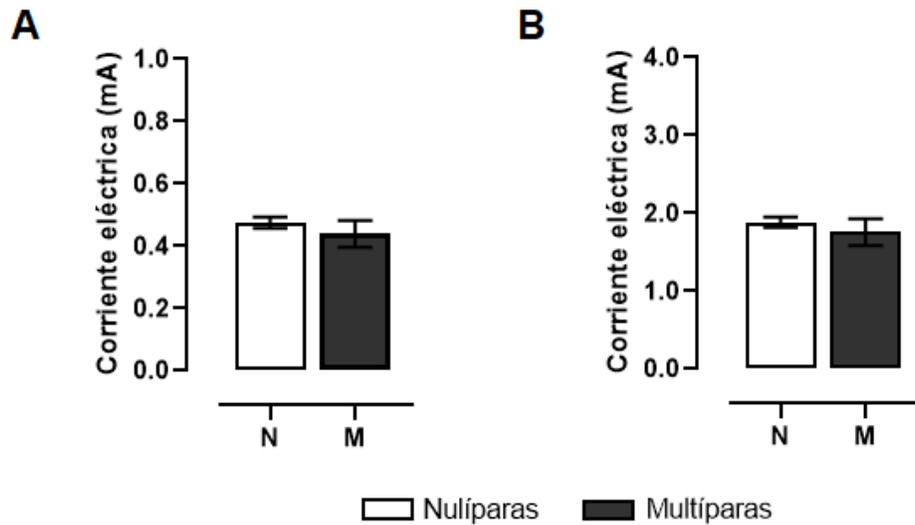


Figura 22. Diámetro del nBe de hembras múltiparas y nulíparas. A) Los datos de la gráfica representan la media \pm error estándar. Para determinar diferencias significativas entre condiciones se realizó una prueba de t de student de dos colas para datos no pareados $*P < 0.05$. Se obtuvieron valores semejantes en el diámetro del nBe entre hembras nulíparas (N, n=6) y múltiparas (M, n=6). B) Fotografía que muestra la localización anatómica del nBe en una hembra múltipara. N, nulípara; M, múltipara; mBe, músculo bulboesponjoso; nBe, nervio bulboesponjoso; nCli, nervio clitoral; mm, milímetros.

7.7.2 Umbral de estimulación. Durante la estimulación eléctrica unilateral del nBe se registró simultáneamente la actividad EMG ipsilateral de mBe. El umbral de estimulación fue determinado como se describió previamente para las hembras nulíparas. Se aplicaron pulsos únicos de corriente (1Hz, 2 ms) de intensidad graduada (mA). La cantidad de corriente eléctrica (1xU) que desencadenó la mínima respuesta EMG en el mBe fue similar entre hembras múltiparas y nulíparas (0.44 ± 0.04 vs 0.48 ± 0.02 mA, $t_6=0.752$, $P=0.469$; respectivamente) (Gráfica 8A). Por lo tanto, al multiplicar este valor hasta 4xU se obtuvieron valores similares entre múltiparas y nulíparas (1.76 ± 0.17 vs 1.89 ± 0.07 mA, $t_6=0.688$, $P=0.506$) (Gráfica 8B).



Gráfica 8. Valor umbral determinado durante la estimulación eléctrica del nBe en hembras multíparas y nulíparas. A) Umbral del estímulo (1xU) que desencadena una mínima respuesta EMG en el mBe. B) Umbral del estímulo (4xU) que desencadena la máxima respuesta EMG del mBe. Los datos representan la media \pm error estándar. Para determinar las diferencias significativas en el valor umbral obtenido entre hembras multíparas (M, n=6) y nulíparas (N, n=6) se realizó una prueba de t de student de dos colas para datos no pareados *P<0.05. nBe, nervio bulboesponjoso; mBe, músculo bulboesponjoso; EMG, electromiograma; N, nulípara; M, multípara; mA, miliamperios.

7.8 Fuerza mecánica contráctil del mBe en respuesta a la estimulación eléctrica del nBe en multíparas vs nulíparas

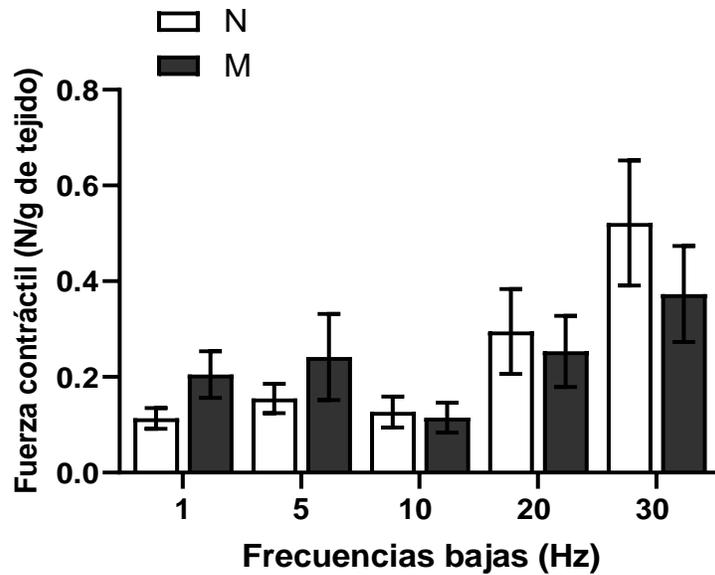
La actividad EMG y la fuerza contráctil del mBe fueron registradas simultáneamente durante la estimulación eléctrica del nBe en hembras multíparas y nulíparas. El umbral del estímulo fue determinado, como fue descrito previamente para las hembras nulíparas. El nBe fue estimulado con pulsos cuadrados de corriente a 4xU modificando la frecuencia de estimulación. Se aplicaron frecuencias bajas (1, 5, 10, 20 y 30 Hz) y frecuencias altas (40, 50, 60, 70 y 80 Hz) con una duración de 4 segundos cada una. Las frecuencias de estimulación se aplicaron aleatoriamente con un intervalo de 3 minutos cada una para evitar la fatiga muscular.

El umbral de estimulación (4xU) determinado para el nBe de hembras multíparas y nulíparas no fue significativamente diferente (2.23 ± 0.28 vs 1.76 ± 0.17 mA, $t_6 = 1.456$, $P = 0.176$; respectivamente). La estimulación eléctrica del nBe desencadenó actividad EMG en el mBe y se registró un aumento de la fuerza contráctil del mBe conforme se incrementaba la frecuencia de estimulación. La estimulación eléctrica del nBe a frecuencias bajas (1, 5 y 10 Hz) provocó

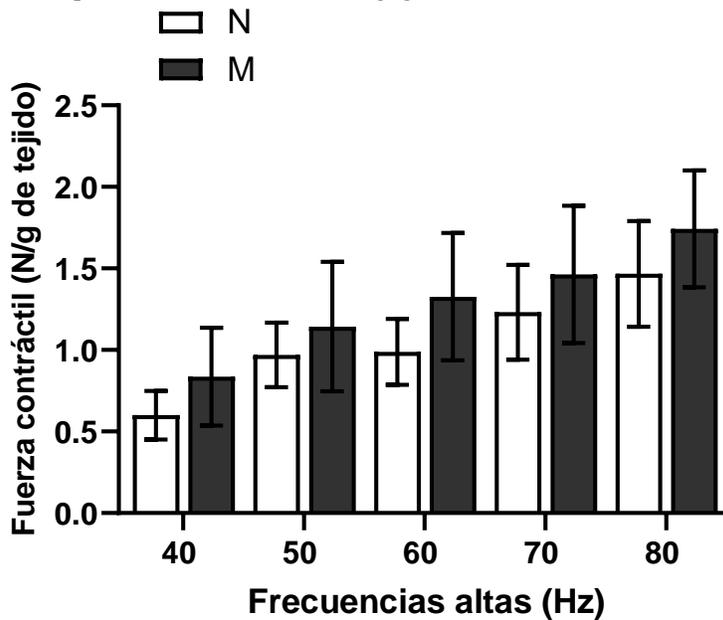
respuestas contráctiles simples en el mBe que siguió la frecuencia de estimulación aplicada. A 20 y 30 Hz se comenzó a observar la tetanización de las fibras musculares. Durante la estimulación eléctrica a frecuencias altas (40, 50, 60, 70 y 80 Hz), las respuestas contráctiles se fusionaron por completo adquiriendo la forma característica de tetanos y a partir de 70 y 80 Hz se observó fatiga muscular.

Los datos estadísticos de la fuerza contráctil del mBe se muestran normalizados en N/g de tejido. El peso del mBe fue menor en las hembras múltiparas con respecto a las nulíparas, sin presentar diferencias significativas (0.16 ± 0.01 vs 0.19 ± 0.02 gramos, $t_6=1.391$, $P=0.194$; respectivamente). La fuerza normalizada incremento gradualmente en magnitud siguiendo el tren de estimulación a diferentes frecuencias. Conforme se aumentaba la frecuencia de estimulación, la fuerza contráctil desarrollada por el mBe también se incrementaba. Durante la estimulación eléctrica a bajas frecuencias (1, 5 10, 20 y 30 Hz), la fuerza contráctil del mBe se mantuvo constante sin mostrar cambios significativos al comparar los valores entre hembras múltiparas y nulíparas (1 Hz, 0.21 ± 0.05 vs 0.11 ± 0.02 N/g, $t_6=1.719$, $P=0.116$; 5 Hz, 0.24 ± 0.09 vs 0.16 ± 0.03 N/g, $t_6=0.910$, $P=0.384$; 10 Hz, 0.12 ± 0.03 vs 0.13 ± 0.03 N/g, $t_6=0.259$, $P=0.800$; 20 Hz, 0.25 ± 0.07 vs 0.30 ± 0.09 N/g, $t_6=0.360$, $P=0.725$; 30 Hz, 0.37 ± 0.10 vs 0.52 ± 0.13 N/g, $t_6=0.899$, $P=0.389$; respectivamente). A frecuencias de 1 y 5 Hz, la fuerza contráctil desarrollada por el mBe fue ligeramente mayor en las hembras múltiparas con respecto a las nulíparas sin cambios significativos. Lo opuesto fue registrado durante la estimulación eléctrica a 20 y 30 Hz en las hembras múltiparas con respecto a las nulíparas.

Durante la estimulación eléctrica a altas frecuencias (40, 50, 60, 70 y 80 Hz), la fuerza contráctil desarrollada por el mBe de hembras múltiparas fue ligeramente mayor con respecto a las nulíparas sin cambios significativos (40 Hz, 0.84 ± 0.30 vs 0.60 ± 0.15 N/g, $t_6=0.707$, $P=0.495$; 50 Hz, 1.14 ± 0.40 vs 0.97 ± 0.20 N/g, $t_6=0.390$, $P=0.704$; 60 Hz, 1.33 ± 0.39 vs 0.99 ± 0.20 N/g, $t_6=0.769$, $P=0.459$; 70 Hz, 1.46 ± 0.42 vs 1.23 ± 0.29 N/g, $t_6=0.452$, $P=0.660$; 80 Hz, 1.74 ± 0.36 vs 1.47 ± 0.32 N/g, $t_6=0.573$, $P=0.579$; respectivamente). En hembras múltiparas y nulíparas la fuerza máxima generada por el mBe se obtuvo al estimular el nBe a 80 Hz.



Gráfica 13. Fuerza contráctil generada por el mBe a frecuencias bajas en conejas nupáras y nulíparas. Se muestra los valores de la fuerza contráctil normalizada (N/g de tejido) generada por el mBe como respuesta a la estimulación eléctrica del nBe en hembras nupáras (M, n=6) y nulíparas (N, n=6). Los datos representan la media±error estándar. Para determinar diferencias significativas en la fuerza contráctil del mBe entre condiciones se realizó una prueba de t de student de dos colas para datos no pareados (*P<0.05). mBe, músculo bulboesponjoso; nBe, nervio bulboesponjoso; M, nupápara; Hz, Hertz; N, newton; g, gramos.



Gráfica 14. Fuerza contráctil generada por el mBe a frecuencias altas en conejas nupáras y nulíparas. Se muestra los valores de la fuerza contráctil normalizada (N/g de tejido) generada por el mBe como respuesta a la estimulación eléctrica del nBe en hembras nupáras (M, n=6) y nulíparas (N, n=6). Los datos representan la media±error estándar. Para determinar diferencias significativas en la fuerza contráctil del mBe entre condiciones se realizó una prueba de t de student de dos colas para datos no pareados (*P<0.05). mBe, músculo bulboesponjoso; nBe, nervio bulboesponjoso; M, nupápara; Hz, Hertz; N, newton; g, gramos.

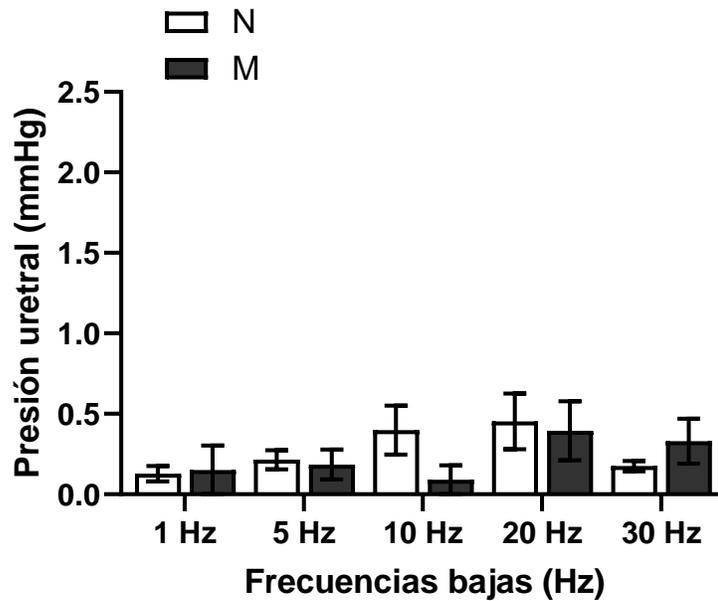
7.9 Presión intrauretral en respuesta a la estimulación eléctrica del nBe en conejas múltiparas vs nulíparas

Durante la estimulación eléctrica del nBe se registró simultáneamente la PIU y la actividad EMG del mBe en conejas múltiparas y nulíparas. La determinación del umbral del estímulo y el protocolo de estimulación fue el mismo que para las hembras nulíparas.

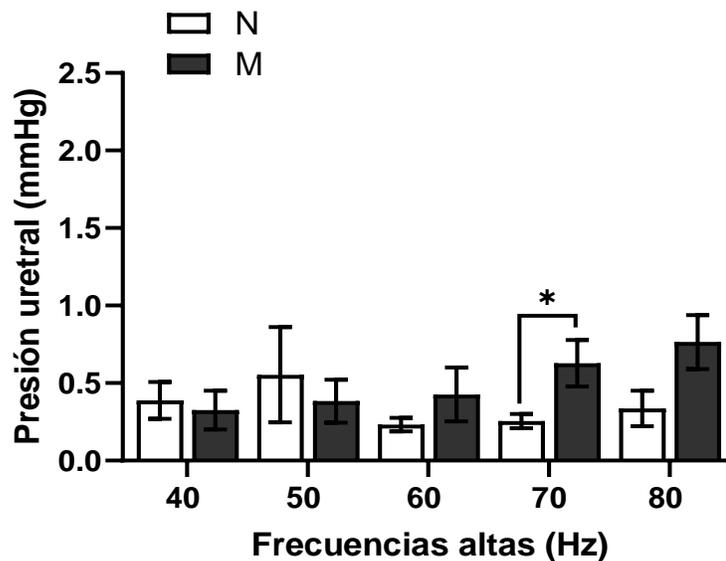
El umbral del estímulo ($4xU$) determinado para el nBe fue similar en las hembras múltiparas cuando se comparó con las hembras nulíparas (1.76 ± 0.17 vs 1.89 ± 0.07 mA, $t_6=0.719$, $P=0.488$; respectivamente). La estimulación eléctrica del nBe desencadenó actividad EMG en el mBe que coincidió con un incremento de la PIU en hembras múltiparas y nulíparas. Los cambios en la PIU generados por trenes de estimulación aplicados al nBe de hembras múltiparas no siguieron la frecuencia de estimulación observándose un incremento en la presión que adquirió la forma de meseta regresando inmediatamente a la línea basal cuando la estimulación finalizó.

La estimulación eléctrica del nBe a 1 Hz (M, 0.15 ± 0.15 vs N, 0.13 ± 0.05 mmHg, $t_6=0.146$, $P=0.886$), 5 Hz (M, 0.19 ± 0.09 vs N, 0.22 ± 0.06 mmHg, $t_6=0.271$, $P=0.791$) y 10 Hz (M, 0.09 ± 0.09 vs N, 0.40 ± 0.15 mmHg, $t_6=1.745$, $P=0.111$) no generó un incremento de la PIU en las hembras múltiparas con respecto a las nulíparas. A partir de 20 y 30 Hz se registró un incremento de la PIU en las hembras múltiparas. El incremento de la PIU a 20 Hz (M, 0.40 ± 0.18 vs N, 0.45 ± 0.17 mmHg, $t_6=0.230$, $P=0.822$) y 30 Hz (M, 0.33 ± 0.14 vs N, 0.18 ± 0.03 mmHg, $t_6=1.079$, $P=0.305$) no fue significativamente diferente entre hembras múltiparas y nulíparas (Gráfica 9). Durante la estimulación del nBe a 40 Hz (M, 0.33 ± 0.13 vs N, 0.39 ± 0.12 mmHg, $t_6=0.357$, $P=0.728$) y 50 Hz (M, 0.38 ± 0.14 vs N, 0.55 ± 0.31 mmHg, $t_6=0.503$, $P=0.625$) se registró un aumento en la PIU que se mantuvo constante sin presentar diferencias significativas entre condiciones. Mientras, la PIU generada durante la estimulación eléctrica del nBe a 60 Hz (M, 0.43 ± 0.17 vs N, 0.23 ± 0.04 mmHg, $t_6=1.087$, $P=0.302$) y 80 Hz (M, 0.77 ± 0.17 vs 0.34 ± 0.11 mmHg, $t_6=2.054$, $P=0.067$) fue mayor en las hembras múltiparas con respecto a las nulíparas sin presentar diferencias significativas entre condiciones. Sin embargo, a 70 Hz se registró un incremento significativo en la PIU de hembras múltiparas con respecto a las nulíparas (M, 0.63 ± 0.15 vs N, 0.26 ± 0.05 mmHg, $t_6=2.374$, $P=0.039$). A diferencia de las hembras nulíparas,

la PIU máxima registrada en las hembras multíparas se obtuvo al estimular el nBe a 80 Hz (Gráfica 10).



Gráfica 9. Presión intrauretral en respuesta a la estimulación eléctrica del nBe a frecuencias bajas en conejas multíparas vs nulíparas. Se muestran los valores de la presión uretral (mmHg) inducida por la estimulación eléctrica del nBe. Los datos representan la media±error estándar. Para determinar las diferencias significativas en la presión uretral obtenida durante la estimulación eléctrica del nBe entre multíparas (n=6) y nulíparas (n=6) se realizó una prueba de t de student de dos colas para datos no pareados *P<0.05. N, nulíparas; M, multíparas; Hz, Hertz; mmHg, milímetros de mercurio.



Gráfica 10. Presión intrauretral en respuesta a la estimulación eléctrica del nBe a frecuencias bajas en conejas multíparas vs nulíparas. Se muestran los valores de la presión uretral (mmHg) inducida por la estimulación eléctrica del nBe. Los datos representan la media±error estándar. Para determinar las diferencias significativas en la presión uretral obtenida durante la estimulación eléctrica del nBe entre multíparas (n=6) y nulíparas (n=6) se realizó una prueba de t de student de dos colas para datos no pareados *P<0.05. N, nulíparas; M, multíparas; Hz, Hertz; mmHg, milímetros de mercurio.

7.10 Presión intravaginal en respuesta a la estimulación eléctrica del nBe en conejas múltiparas vs nulíparas

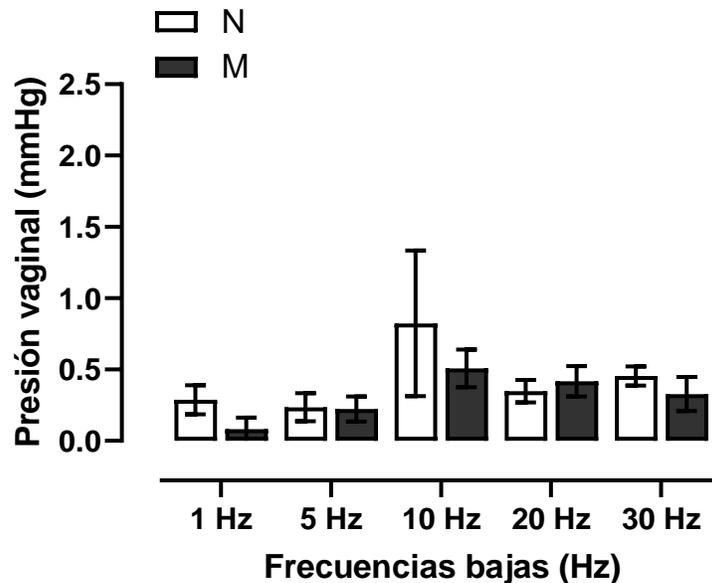
Durante la estimulación eléctrica del nBe se registró simultáneamente la PIV y la actividad EMG del mBe en hembras múltiparas y nulíparas. La determinación del umbral del estímulo y el protocolo de estimulación fue el mismo que para las hembras nulíparas.

El umbral del estímulo ($4 \times U$) determinado durante la estimulación eléctrica del nBe fue similar entre las hembras múltiparas y nulíparas (1.76 ± 0.17 vs 2.06 ± 0.20 mA, $t_6=1.140$, $P=0.280$; respectivamente). La estimulación eléctrica del nBe desencadenó actividad EMG en el mBe que coincidió con un incremento en la PIV de hembras múltiparas y nulíparas. Los cambios en la PIV generados por trenes de estimulación aplicados al nBe de hembras múltiparas no siguieron la frecuencia de estimulación. Sólo se observó un incremento en la presión que adquirió la forma de meseta regresando a la línea basal cuando la estimulación finalizó.

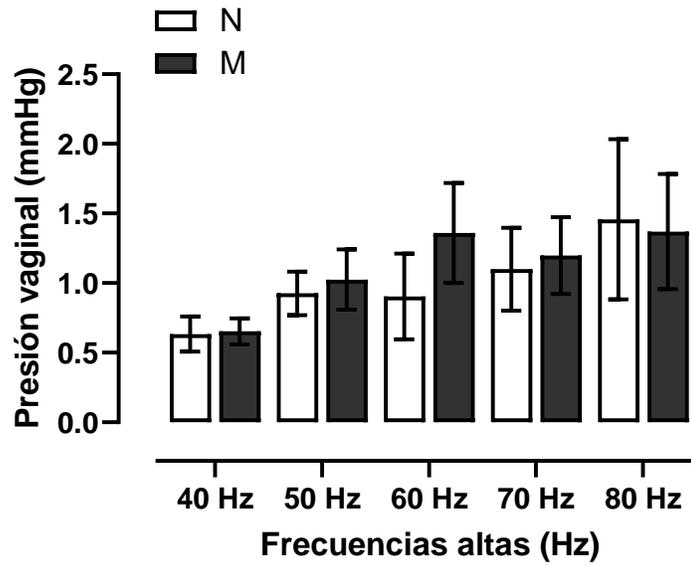
Durante la estimulación eléctrica del nBe a 1 Hz no se registró un incremento en la PIV de hembras múltiparas y nulíparas sin diferencias significativas (0.08 ± 0.08 vs 0.29 ± 0.10 mmHg, $t_6=1.594$, $P=0.145$; respectivamente). Al estimular a 5 Hz, se observó un mínimo incremento en la PIV de las hembras múltiparas que no fue significativamente diferente al obtenido en las hembras nulíparas (0.22 ± 0.09 vs 0.24 ± 0.10 mmHg, $t_6=0.096$, $P=0.924$; respectivamente). Al modificar la frecuencia de estimulación a 10 Hz, se registró una disminución en la PIV de las hembras múltiparas con respecto a las nulíparas sin cambios significativos (0.51 ± 0.13 vs 0.82 ± 0.51 mmHg, $t_6=0.653$, $P=0.530$; respectivamente). A 20 Hz, los valores en la PIV de hembras múltiparas fueron similares a los obtenidos en las hembras nulíparas (0.42 ± 0.11 vs 0.35 ± 0.08 mmHg, $t_6=0.511$, $P=0.621$; respectivamente). Lo mismo fue obtenido al incrementar la frecuencia de estimulación a 30 Hz en hembras múltiparas con respecto a las nulíparas (0.33 ± 0.12 vs 0.45 ± 0.07 mmHg, $t_6=0.868$, $P=0.407$; respectivamente) (Gráfica 11).

El incremento de la PIV durante la estimulación eléctrica del nBe a 40 Hz (M, 0.65 ± 0.09 vs N, 0.63 ± 0.13 mmHg, $t_6=0.125$, $P=0.902$), 50 Hz (M, 1.03 ± 0.22 vs N, 0.93 ± 0.16 mmHg, $t_6=0.356$, $P=0.729$), 60 Hz (M, 1.36 ± 0.36 vs N, 0.90 ± 0.31 mmHg, $t_6=0.941$, $P=0.370$), 70 Hz (M, 1.20 ± 0.27 vs N, 1.10 ± 0.30 mmHg, $t_6=0.242$, $P=0.813$) y 80 Hz (M, 1.37 ± 0.41 vs N,

1.46±0.58 mmHg, $t_6=0.127$, $P=0.901$) fue similar entre hembras multíparas y nulíparas, respectivamente (Gráfica 12). En general, la PIV incrementó a medida que se aumentó la frecuencia de estimulación. Tanto en hembras multíparas y nulíparas, la PIV máxima registrada durante la estimulación eléctrica del nBe se obtuvo a 80 Hz.



Gráfica 11. Presión intravaginal en respuesta a la estimulación eléctrica del nBe a frecuencias bajas en conejas multíparas vs nulíparas. Se muestran los valores de la presión vaginal (mmHg) inducida por la estimulación eléctrica del nBe. Los datos representan la media±error estándar. Para determinar las diferencias significativas en la presión vaginal obtenida durante la estimulación eléctrica del nBe entre multíparas (n=6) y nulíparas (n=6) se realizó una prueba de t de student de dos colas para datos no pareados * $P<0.05$. N, nulíparas; M, multíparas; Hz, Hertz; mmHg, milímetros de mercurio.



Gráfica 12. Presión intravaginal en respuesta a la estimulación eléctrica del nBe a frecuencias altas en conejas multíparas vs nulíparas. Se muestran los valores de la presión vaginal (mmHg) inducida por la estimulación eléctrica del nBe. Los datos representan la media±error estándar. Para determinar las diferencias significativas en la presión vaginal obtenida durante la estimulación eléctrica del nBe entre multíparas (n=6) y nulíparas (n=6) se realizó una prueba de t de student de dos colas para datos no pareados *P<0.05. N, nulíparas; M, multíparas; Hz, Hertz; mmHg, milímetros de mercurio.

8. DISCUSIÓN

En el presente estudio se demostró que las características morfométricas y electrofisiológicas de los nervios perineales del piso pélvico son diferentes. El diámetro del nCli es significativamente mayor en comparación con el nIsc y el nBe. Para este estudio el diámetro del nCli fue medido a nivel de la región media, antes de la ramificación con el mBe, para proveer inervación a diferentes estructuras como: el clítoris, la vagina perineal, las glándulas prepuciales, el músculo constrictor vestibular y la piel perigenital, de acuerdo a la descripción de Cruz y cols. 2017. En estudios anatómicos del clítoris en cadáveres humanos se ha descrito que el diámetro del nCli difiere a lo largo de su trayecto y esto se correlaciona con el número de axones que lo conforman o densidad nerviosa. En los humanos el diámetro del nCli, a nivel de la cruz clitoral, es de 2-4 mm, a nivel del ángulo clitoral es de 2.2-3.2 mm y en el extremo distal del nCli, cercano al cuerpo del clítoris su diámetro es de 1.9-2 mm (Jackson y cols. 2019, Kelling y cols. 2020, Blayney y cols. 2021).

Por otra parte, a nuestro conocimiento no hay estudios que describan la anatomía detallada y el diámetro del nIsc y el nBe. Estudios en cadáveres humanos solo se han delimitado a describir el diámetro del nervio pudiendo de aproximadamente 2.94 mm (rango 2.7-3.1 mm) y solo ha descrito el diámetro de algunas de sus ramas distales. El nervio perineal tiene un diámetro de 2.8 mm, el nervio rectal inferior de 1.5 mm y el nervio dorsal del clítoris es de 1.7 mm. Sin embargo, el 90% de los fascículos que constituyen estos nervios tienen diámetros inferiores a 350 μm y los fascículos más grandes tiene diámetros de aproximadamente 450 μm siendo consistente entre los tres nervios (Gustafson y cols. 2005, Agarwal y cols. 2019). De acuerdo al número de axones que constituyen cada nervio será la cantidad de corriente necesaria para generar la mínima respuesta o, denominado, umbral de estimulación. El umbral de estimulación para generar la mínima respuesta EMG del mIsc y el mBe durante la estimulación eléctrica sus respectivos nervios (nIsc y nBe) fue menor a 0.50 mA en conejas nulíparas. Al multiplicar este valor a 4xU para alcanzar la máxima respuesta EMG del mIsc y el mBe se obtuvo un valor máximo de 1.9 mA. Este umbral de estimulación es similar a la amplitud de estimulación (1.8 mA) que se aplica a las raíces nerviosas sacras, a través del neuroestimulador recargable Axonics Modulation Technologies, Inc. (Blok y cols. 2018). Sin embargo, la

amplitud de estimulación máxima que generalmente se aplica otros nervios, como el nervio tibial, de manera percutánea o a través de la implantación del neuroestimulador BlueWind RENOVA™, es de 7-9 mA (van Breda y cols. 2017, Sirls y cols. 2018); valor similar a la amplitud de estimulación (10 mA) que se aplica al nervio pudendo, a través del minineuroestimulador Bion colocado cerca del nervio (Bosch 2005). La alta intensidad de corriente que se aplica al nervio tibial y el nervio pudendo, posiblemente, está relacionado con el tipo de electrodo, la técnica para determinar el umbral de estimulación y la falta de especificidad de la estimulación. Los minineuroestimuladores implantables actualmente disponibles tienen forma cilíndrica, son colocados en su proximidad, por lo tanto, no tienen contacto directo con el nervio (Groen y cols. 2005, (Heesakkers y cols. 2018). Es claro que cuanto más cerca esté el electrodo del nervio menor será la cantidad de corriente necesaria para obtener respuestas motoras adecuadas. Además, la colocación del electrodo directamente en el nervio minimiza la posibilidad de estimular tejidos adyacentes que puedan desencadenar estimulación incomoda o parestesia reportada durante la estimulación eléctrica del nervio tibial y el nervio pudendo (Bo y cols. 2017, Goldman y cols. 2018). De hecho, uno de los eventos adversos descritos es la migración del electrodo, que en algunos casos se requiere ajustar la amplitud de estimulación o intervenir quirúrgicamente para cambiar su posición (Peters y cols. 2010). Además, la amplitud de estimulación se determina con base a respuestas motoras (flexión plantar del primer dedo del pie y la elevación del periné y del ano) evaluadas visualmente y es establecida al nivel más alto tolerable por la paciente (Bosch 2005, Peters y cols. 2013). Aunque, el electrodo se posiciona en proximidad al nervio pudendo, bajo monitoreo del potencial de acción motor compuesto del esfínter externo del ano. Se ha determinado que el nervio pudendo se ramifica distalmente en varios nervios que inervan a los músculos del piso pélvico (Spinelli y cols. 2005). En la periferia, el nervio pudendo inerva a la uretra y a diferentes músculos estriados incluido el esfínter uretral y anal, el mIsc y el mBe siendo la especificidad a nivel muy local cuando las terminaciones nerviosas ya están muy cercanas a sus órganos blancos (Thor y de Groat 2010). La falta de especificidad en la estimulación del nervio pudendo puede ser un factor determinante en la disminución y falta de eficacia de la terapia en algún momento del tratamiento, así como el dolor y la estimulación incomoda (Siegel y cols. 2018).

En este estudio se estimuló selectivamente al nIsc y al nBe y se registró simultáneamente la actividad EMG de sus respectivos músculos para determinar la cantidad de corriente necesaria para desencadenar la máxima respuesta muscular. La corriente eléctrica varía en función del diámetro y composición de los nervios, de forma que las fibras de gran diámetro tienen un umbral inferior, es decir, es de entre 10 y 20 veces menor que las fibras de pequeño diámetro (Guyton 2006, Brocker y Grill 2013). Este no fue el caso para el nCli (control no específico), su umbral de estimulación fue de 0.77 mA mayor al obtenido para el nIsc y el nBe. Durante la estimulación eléctrica del nCli no se registró la actividad EMG del mIsc y el mBe, sólo se observó el artefacto del estímulo. Por tal motivo, el umbral de estimulación se definió como la cantidad de corriente necesaria para generar la mínima contracción vulvar visualmente perceptible. Sin embargo, al multiplicar el umbral de estimulación a 4xU (2.80 mA), se registró el artefacto del estímulo y la respuesta EMG del mIsc y el mBe después de una latencia de respuesta de 8-10 ms. Este hallazgo es consistente con lo reportado previamente en coneja donde se demostró que la estimulación eléctrica del nCli induce respuestas electromiográficas ipsilaterales y contralaterales en el mIsc y el mBe como parte del denominado reflejo vaginocavernoso (Cruz y cols. 2010). En rata, también se ha descrito que la estimulación eléctrica unilateral del nCli produce activación refleja bilateral del músculo pubococcígeo, con una latencia de respuesta ipsilateral de 8 ms y contralateral de 10 ms. Las latencias de respuesta muscular evocadas después de la estimulación del nCli podría relacionarse con el tiempo de conducción a lo largo de los axones sensoriales y motores, así como el tiempo transcurrido tanto por la placa terminal motora y la transmisión sináptica interneuronal en la médula espinal (Lara-García y cols. 2018). En estudios clínicos la amplitud de estimulación del nCli es ajustada al nivel más alto tolerable por el paciente y varía 30-60 mA causando incomodidad y dolor en algunos pacientes (Opisso y cols. 2011).

El peso del mBe fue significativamente mayor en comparación con el mIsc en conejas nulíparas. El umbral de estimulación (4xU) que se aplicó al nIsc y al nBe fue similar en conejas nulíparas cuando se registró la fuerza contráctil. La fuerza normalizada en N/g de tejido del mIsc y el mBe incremento gradualmente en magnitud siguiendo el tren de estimulación a diferentes frecuencias. La máxima fuerza contráctil generada por el mIsc (2.01 N/g de tejido) y el mBe (1.47 N/g de tejido) se registró a 80 Hz. Las respuestas contráctiles evocadas durante la

estimulación del nIsc y el nBe son similares a las obtenidas durante la estimulación eléctrica directa del mIsc y el mBe en conejas nulíparas (López-Juárez y cols. 2017).

El contenido del tipo de fibras es importante para la función contráctil de los músculos esqueléticos. Las fibras musculares de contracción lenta (tipo I) presentan un metabolismo oxidativo y cuenta con grandes cantidades de mioglobulina. Su tiempo de contracción es prolongado y genera escasa fuerza durante un estímulo simple. Sin embargo, la fuerza desarrollada por estas fibras no decae al ser estimuladas. Esta resistencia a la fatiga ha sido asociada a la presencia de un considerable número de mitocondrias y a una tasa muy baja en la utilización de ATP. Las fibras musculares de contracción rápida, pero fatigables (tipo IIb) presentan un metabolismo glucolítico y generan una gran fuerza durante su contracción (hasta 100 veces más que la generada por las fibras de tipo I), pero rápidamente se fatigan al ser estimuladas con trenes de pulsos. Por lo tanto, presentan un tiempo de contracción relativamente breve, lo cual es asociado con la presencia de altas concentraciones de miosina ATPasa y de fosforilasa en su interior. En cambio, las fibras musculares de contracción rápida resistentes a la fatiga (tipo IIa/IIc) presentan características contráctiles intermedias, es decir, la duración de su sacudida es ligeramente mayor a las de tipo IIb y presentan una resistencia a la fatiga semejante a las de tipo I. Durante la estimulación repetitiva estas fibras musculares desarrollan más fuerza que las fibras tipo IIb y las fibras de tipo I (Kandel y cols. 2015).

La estimulación eléctrica del nBe a bajas frecuencias provocó respuestas contráctiles simples en el mBe que siguieron la frecuencia de estimulación aplicada. A 20 y 30 Hz se comenzó a observar tetanización de sus fibras musculares. A frecuencias altas, las respuestas contráctiles del mBe se fusionaron por completo adquiriendo la forma característica de tétanos; pero a partir de 50 Hz se observó fatiga muscular. Las propiedades contráctiles del mBe están directamente relacionadas con la composición del tipo de fibras y su metabolismo. El mBe presenta un alto contenido de fibras glucolíticas y el porcentaje de fibras rápidas (tipo IIb) es mayor que el de fibras lentas (tipo I) e intermedias (tipo IIa/IIc). Por lo tanto, el mBe puede considerarse como un músculo fatigable y es consistente con la actividad fásica registrada en los EMG's (López-García y cols. 2014, López-García y cols. 2016).

La estimulación eléctrica del nIsc desencadenó respuestas contráctiles similares en el mIsc. Sin embargo, a frecuencias bajas el mIsc generó mayor fuerza contráctil en comparación

con el mBe. Una tendencia similar fue obtenida al estimular a frecuencias altas sin diferencias estadísticamente significativas. En un estudio previamente publicado en coneja también demostró que el mIsc genera mayor fuerza por gramo de tejido seguido del mBe (López-Juárez y cols. 2017). Aunque no hay información sobre la composición del tipo de fibras y el metabolismo del mIsc, se podría suponer que presenta un alto porcentaje de fibras intermedias (tipo IIa/II_d) ya que desarrolla mayor fuerza y presenta resistencia a la fatiga por mayor tiempo (Kandel y cols. 2015). La estimulación eléctrica de 60-80 Hz se observa fatiga muscular. Estas características están directamente relacionadas con la actividad fásica del mIsc registrada en los EMG's. Así como la postdescarga intermitente que presenta durante la estimulación mecánica de la vagina perineal con una duración de 2-5 minutos y el patrón de actividad fásica de mayor duración durante la fase de expulsión de orina en comparación con el mBe (Corona-Quintanilla y cols. 2009, Cruz y cols. 2010).

El alto contenido de fibras rápidas, fatigables y glucolíticas que componen a el mBe es consistente con su participación funcional durante la micción. El mBe presenta actividad fásica exclusivamente durante la fase de expulsión de orina. Mientras, el mIsc se activa al final del almacenamiento y durante la fase de expulsión de orina (Corona-Quintanilla y cols. 2009). La estimulación eléctrica de ambos músculos perineales durante la fase de expulsión de orina modifica la función vesical y uretral. La contracción del músculo detrusor es facilitada mientras se inhibe el cierre uretral. La estimulación eléctrica bilateral de los músculos perineales favorece a un eficiente vaciamiento vesical (Corona-Quintanilla y cols. 2014). Esto sugiere que la contracción de los músculos perineales promueve un reflejo excitatorio que ayuda a contraer el detrusor como se describió en perros (Chang y cols. 2007) y ratas (Chang y cols. 2006). Que facilita la expulsión de orina posiblemente como parte del reflejo uretro-cuerpocavernoso descrito en mujeres donde las aferentes uretrales activadas por el paso de orina a través de la uretra desencadena la actividad sincronizada del mIsc y el mBe promoviendo la contracción vesical (Shafik y cols. 2008).

El presente estudio se demostró que la estimulación eléctrica de los nervios perineales (nIsc, el nBe y el nCli) desencadena actividad EMG en el mIsc y el mBe e incrementa la PIU. Los cambios en la PIU generados durante la estimulación selectiva del nIsc y el nBe adquirieron una forma característica de meseta que regresaron inmediatamente a la línea basal cuando la

estimulación finalizo. Aunque, el mIsc y el mBe están anatómicamente posicionados a la parte más distal de la uretra, propones que es posible que la estimulación de sus respectivos nervios activa algunos de sus receptores (husos musculares u órganos tendinosos del Golgi) y envía información a través de sus aferentes (Peikert May 2015). La información aferente se transmitiría a través del nervio pudendo a la médula espinal lumbosacra para modular reflejos autonómicos y somáticos que involucraría la activación refleja del mIsc y el mBe para contribuir en el cierre uretral durante incrementos de presión intra-abdominal (Fowlery cols. 2008, de Groat y Tai 2015). Este argumento se sustenta debido a que algunas de las dendritas de las motoneuronas del mIsc y el mBe localizadas en el segmento espinal L7 y S2, se dirigen a la asta lateral de la sustancia gris de la médula espinal donde se encuentran las motoneuronas autonómicas. Por lo tanto, se sugiere que la disposición de las motoneuronas perineales puede establecer circuitos con neuronas autonómicas y somáticas para facilitar la activación de reflejos visceros-somáticos y somato-somáticos que modulan las funciones genitales y urinarias (Cruz y cols. 2017).

La estimulación eléctrica del nIsc incremento la PIU a partir de 20 Hz y se mantuvo constante de 40-80 Hz. La PIU máxima registrada durante la estimulación del nIsc se obtuvo a 70 Hz. Mientras que la estimulación del nBe incremento la PIU a partir de 5 Hz y se mantuvo constante hasta 80 Hz. La máxima PIU inducida por la estimulación del nBe se obtuvo a 50 Hz. Por lo tanto, la estimulación selectiva del nIsc y el nBe a frecuencias altas desencadena un incremento sostenido de la PIU. Estos resultados son consistentes con los tratamientos de electroestimulación indirecta de MPP, ya sea vía intravaginal o transcutánea en humanos. Generalmente se aplican frecuencias relativamente altas entre 20-50 Hz para facilitar la contracción de los MPP e incrementar la presión de cierre uretral en mujeres con IUE (Guralnick y cols. 2015, Dmochowski y cols. 2019, Bae y cols. 2020).

Por otra parte, la estimulación eléctrica del nCli aumentó significativamente la PIU en comparación con el nIsc y el nBe. La PIU incrementó a partir de 1 Hz y se mantuvo constante de 10-80 Hz. La PIU máxima se obtuvo al estimular el nCli a 80 Hz. El incremento en la PIU se mantuvo constante y regresó a la línea basal segundos después de que la estimulación finalizó. Es importante mencionar que el nCli se consideró como un control no específico, por ello se estimuló específicamente a nivel de la región media del mBe antes de su ramificación para

proveer inervación a el clítoris, la vagina perineal, el músculo constrictor vestibular y la piel perigenital (Cruz y cols. 2017). Por lo tanto, la estimulación eléctrica del nCli desencadenó la contracción de dichas estructuras observando el movimiento de la vulva. Los cambios en la PIU pueden estar relacionados con la contracción del músculo constrictor vestibular. Este músculo se encuentra cubriendo la pared ventral de la vagina perineal. Se origina en la cara externa del arco isquiático y se inserta en el ligamento suspensorio del clítoris a nivel de la glándula inguinal. Su estimulación eléctrica produce retracción de la vaina clitoral y contracción de la pared vaginal y rectal (Martínez-Gómez y cols. 1997). Otro aspecto importante es que el nCli no se denervó para evitar el flujo de información a la médula espinal. En consecuencia, los cambios en la PIU también pueden deberse a la activación refleja de otros músculos estriados anatómicamente relacionados con el aparato urogenital. Estudios en modelos animales han demostrado que la estimulación de fibras aferentes del nervio pudendo induce actividad refleja del rabdoesfínter (Pastelín y cols 2012) y de los MPP (Lara-García y cols. 2018). En coneja, la estimulación del nCli induce la activación refleja del mIsc, el mBe y probablemente del músculo bulboglandular (mBg). Este último músculo tiene fibras estriadas orientadas circularmente rodeando la uretra distal y la vagina pélvica; observándose como un cinturón de fibras. Su estimulación eléctrica incrementa la PIU y presenta actividad refleja durante la fase de almacenamiento de la orina, actuando como un esfínter durante la micción (Corona-Quintanilla y cols. 2016).

Los resultados del presente estudio sugieren que el nCli es un objetivo terapéutico para la modulación del piso pélvico. En humanos se ha demostrado que la estimulación del nCli a 20 Hz puede inhibir la contracción involuntaria del músculo detrusor, incrementar la capacidad vesical y disminuir los episodios de IUU. Sin embargo, los estudios clínicos son agudos y presentan un limitado número de pacientes. Actualmente, no existe un dispositivo comercialmente disponible específico para la estimulación del nCli. El desarrollo de un neuroestimulador implantable puede contribuir en el desarrollo de estudios a largo plazo para evaluar su eficacia (Opisso y cols. 2011, Farag y cols. 2012, Van Breda y cols. 2016).

Por otra parte, este estudio demostró que la estimulación eléctrica unilateral de los nervios perineales (nIsc, el nBe y el nCli) desencadenan la actividad EMG ipsilateral del mIsc y el mBe e incrementa la PIV perineal. La PIV incrementó a medida que se aumentó la

frecuencia de estimulación independientemente del nervio estimulado. La PIV máxima registrada durante estimulación eléctrica de los nervios perineales se obtuvo a 80 Hz. Los cambios en la PIV generados durante la estimulación eléctrica selectiva del nIsc y el nBe siguieron la frecuencia de estimulación regresando inmediatamente a la línea basal cuando la estimulación finalizó. Estos cambios están directamente relacionados con la respuesta contráctil del mIsc y el mBe que se encuentran anatómicamente asociados a la pared ventral de la vagina perineal. En la coneja, la estimulación eléctrica bilateral del nIsc y el nBe incrementa la PIV en relación con la frecuencia aplicada (Cruz y cols. 2002, López-Juárez y cols. 2017). En el presente estudio, la PIV fue mayor durante la estimulación eléctrica del nIsc a frecuencias altas (20-80 Hz) en comparación con el nBe. Lo mismo se ha obtenido durante la estimulación bilateral del mIsc a 20, 50 y 100 Hz (López-Juárez y cols. 2017). Probablemente, debido a que las fibras del mIsc ocupan un área de distribución vaginal mayor en comparación con el mBe (Martínez-Gómez y cols. 1997). Además de su composición del tipo de fibras y metabolismo (López-García y cols. 2014).

En el modelo de la coneja se ha demostrado que la distensión vaginal, la estimulación mecánica de la pared vaginal y la estimulación eléctrica del nCli inducen respuesta EMG en el mIsc y el mBe. El nCli es considerado como la principal vía aferente del reflejo vaginocavernoso, también descrito en el humano (Cruz y cols. 2002, Cruz y cols. 2010). En mujeres la distensión vaginal conduce a la contracción refleja del mIsc y el mBe. Esta respuesta se ha denominado reflejo vaginocavernoso y se sugiere que participa en la erección del Cli durante la cópula. Esto puede ser importante para apoyar la cabeza del feto durante el parto y así prevenir el desgarro vaginal y perineal (Shafik 1993). Además, se propone que la contracción de los músculos perineales incrementa la presión intravaginal para ayudar a reducir el diámetro vaginal y con ello prevenir un prolapso uterino durante repentinos aumentos de presión intra-abdominal (Shafik y cols. 2002).

Los resultados del presente estudio confirman que el nCli es uno de los principales componentes nerviosos involucrados en la actividad refleja de los MPP. Su estimulación eléctrica incrementa significativamente la PIV perineal y ésta regresa a la línea basal segundos después de que la estimulación finalizó en respuesta a la activación refleja de diferentes músculos asociados al aparato urogenital, los evaluados en este estudio (mIsc, el mBe) y

probablemente el músculo constrictor vestibular, el mBg y los MPP (Cruz y cols. 2010, Lara-García y cols. 2018). La actividad refleja del mIsc y mBe requiere de un fino control nervioso para llevar a cabo procesos reproductivos (cópula y el parto) y no reproductivos (continencia y expulsión de orina). En la coneja, se ha sugerido que el incremento de la PIV generada por la contracción del mIsc y el mBe puede facilitar la cópula y la expulsión de las crías durante el parto. En la cópula la PIV perineal generada por la contracción de los músculos puede ejercer presión sobre el pene ayudando en la eyaculación característica del conejo (Beyer y cols. 1980). Durante el parto, la presión ejercida por el feto a nivel de cérvix y la vagina abdominal puede inhibir la activación del mIsc y el mBe cuando el feto pasa por la cavidad pélvica. Esto podría prevenir el incremento de la PIV e inducir de las contracciones abdominales para promover el paso de las crías a través de esta región. Una vez que la cría llega a la vagina perineal, la distensión de la pared vaginal desencadenaría la contracción de los músculos que ayudarían a expulsar las crías (Cruz 2002, Cruz y cols. 2002). Esto probablemente sea importante debido a que la denervación del mIsc y el mBe causa la retención de las crías en la vagina y se asocia con un alto porcentaje de crías muertas al nacer (Hudson y cols. 1999). Por otra parte, debido a que estos músculos se activan reflejamente durante la fase de expulsión de orina. Se sugiere que los músculos al generar PIV tendrían la capacidad de regular el diámetro del conducto urogenital y con ello regular las funciones exclusivas como el parto y la micción (Cruz y cols. 2002, (Corona-Quintanilla y cols. 2014)

La multiparidad se considera como la experiencia reproductiva que implica al menos dos episodios de cópulas, gestaciones, partos y lactancias. La gestación y el parto son eventos mecánicos y hormonales que se han relacionado con alteraciones en el aparato urogenital y en la musculatura del piso pélvico y su inervación. En el proceso de gestación, específicamente al término del embarazo, el feto incrementa considerablemente de peso y tamaño ejerciendo mayor presión y tensión sobre los MPP y su inervación. Durante el parto, la pared vaginal, los músculos, los ligamentos, el tejido conectivo y los nervios del piso pélvico pueden ser comprimidos o sobre distendidos considerablemente incluso hasta llegar a su ruptura. La exposición repetida a daño muscular y nervioso durante cada parto vaginal puede promover la aparición de desórdenes del piso pélvico, incluido el prolapso de órganos pélvicos, la vejiga hiperactiva e IU (Memon y Hanna 2014, Pereira y cols. 2016).

Utilizando como modelo de estudio a la coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*), se ha mostrado que la multiparidad altera diversas características histológicas del aparato urogenital (Xelhuantzi y cols. 2014). También hay cambios morfológicos y disminución de la fuerza contráctil y de la PIV, así como un daño diferencial en algunos músculos estriados pélvicos y perineales. Todos estos cambios en el aparato urogenital y en la musculatura estriada indican ajustes plásticos y/o daños que afectan procesos fisiológicos reproductivos y no reproductivos (Fajardo y cols. 2008, Martínez-Gómez y cols. 2011, López-García y cols. 2014).

En el presente estudio, la cantidad de corriente necesaria para generar la mínima respuesta EMG del mBe no se modifica por la multiparidad. Este hallazgo también fue obtenido al determinar el umbral eléctrico de activación del nBe para desencadenar la primera respuesta visible del PAC. Es probable que durante la estimulación eléctrica del nBe se recluten fibras nerviosas excitables que responden de la misma manera a bajos umbrales de estimulación tanto en hembras nulíparas y multíparas (Moreno-Pérez 2017). Sin embargo, la multiparidad afecta la mielinización y en consecuencia la neurotransmisión del impulso nervioso a través del nBe. La amplitud y el área del PAC del nBe disminuyen en un 40% lo que representa la media de los potenciales de acción sumados que se propagan a lo largo del nervio, sugiriendo que hay un daño parcial. Estos cambios son asociados con un alto porcentaje de axones con mielina desorganizada (Castelán y cols. 2018). Es posible que estos cambios estén relacionados con la disposición anatómica del nBe. Este nervio pasa por el arco isquiático para inervar el mBe que se encuentra en estrecha relación con la región ventral del canal vaginal. Es posible que el nBe sufra una compresión y/o estiramiento mecánico durante los múltiples partos con el paso de las crías durante el proceso del parto afectando la propagación del impulso nervioso (Cruz y cols. 2002).

Los resultados de este estudio mostraron que la fuerza normalizada en N/g de tejido del mBe en hembras multíparas se incrementa gradualmente en magnitud siguiendo el tren de estimulación a diferentes frecuencias. La máxima fuerza contráctil generada por el mBe se registró a 80 Hz (1.74 N/g de tejido). La condición de multiparidad incrementó la fuerza contráctil del mBe cuando se estimuló el nBe a 1 y 5 Hz sin presentar diferencias significativas. Este resultado es similar cuando se estimula directamente el mBe a 1 y 4 Hz (López-Juárez y cols. 2017). No obstante, la estimulación eléctrica del nBe a 20 y 30 Hz disminuyó la fuerza

contráctil del mBe y a frecuencias altas (40-80 Hz) se incrementó nuevamente sin diferencias estadísticamente significativas con respecto a las hembras nulíparas. En este aspecto, nuestros resultados son diferentes a los obtenidos durante la estimulación eléctrica directa del mBe a frecuencias altas (20, 50 y 100 Hz) donde se demostró que la multiparidad disminuye significativamente la fuerza contráctil del mBe. Esta diferencia puede deberse a que se sólo se evaluó el efecto de la multiparidad sobre la respuesta muscular y no en la función neuromuscular (López-Juárez y cols. 2017).

Los cambios en la composición del tipo de fibras del mBe también deben ser considerados. El mBe de hembras múltiparas presenta una reducción en el contenido de fibras rápidas a expensas de un incremento en la proporción de fibras intermedias glucolíticas. Tal hallazgo puede estar relacionado con un aumento en la fuerza de contracción del mBe durante la estimulación eléctrica a altas frecuencias sin cambios significativos con respecto a las hembras nulíparas (López-García y cols. 2016). El tiempo en curso de daño y regeneración del mBe también podrían influir en la fuerza contráctil. En el día 20 postparto, el mBe se encuentra en una fase regenerativa continua por lo que puede contribuir en la respuesta contráctil no alterada en las hembras múltiparas (López-García y cols. 2014).

De acuerdo con esto, es posible suponer que los cambios estructurales y funcionales del mBe modifique su actividad durante la micción. Los patrones anormales o ausentes de la actividad EMG de los MPP se asocia con alteraciones en algunas variables urodinámicas tales como el volumen umbral, el volumen residual, la duración del vaciamiento y la presión máxima (Corona-Quintanilla y cols. 2009, Martínez-Gómez y cols. 2011). La multiparidad y la edad influyen significativamente en la presión vesical y la PIU afectando la eficiencia de vaciamiento y el intervalo entre contracciones. Tal interacción también reduce la presión umbral de la PIU y el tiempo que pasa entre la presión umbral de la PIU y la PIU máxima causando inestabilidad de cierre uretral (Corona-Quintanilla y cols. 2019).

En este estudio la estimulación eléctrica del nBe en hembras múltiparas desencadenó la actividad EMG del mBe que coincidió con un aumento en la PIU. Los cambios en la PIU adquirieron una forma característica de meseta que regresó inmediatamente a la línea basal cuando la estimulación finalizó. A diferencia de las hembras nulíparas, la estimulación eléctrica del nBe incrementó la PIU de manera sostenida a partir de 20 Hz y se mantuvo constante hasta

80 Hz. La máxima PIU inducida por la estimulación del nBe se obtuvo a 80 Hz. Sin embargo, la estimulación eléctrica del nBe a altas frecuencias (60, 70 y 80 Hz) generó un incremento de la PIU mayor con respecto a las nulíparas siendo estadísticamente significativo sólo a 70 Hz. Es posible que los cambios en la frecuencia de estimulación para generar un incremento en la PIU estén relacionados con alteraciones en la organización histológica de la uretra. Asimismo, la multiparidad reduce el espesor del epitelio, el colágeno y la cantidad de musculatura lisa y estriada. Estos eventos pueden ser causados por eventos isquémicos o daño a la inervación como resultado del paso de los fetos durante el parto (Rodríguez-Antolín y cols. 2009, Xelhuanzi y cols. 2014). Los resultados de este estudio demuestran que la estimulación del nBe a frecuencias altas puede favorecer el cierre uretral en las hembras múltiparas.

Por otra parte, la estimulación eléctrica del nBe en hembras múltiparas desencadenó la actividad EMG del mBe que coincidió con un incremento en la PIV. Los cambios en la PIV adquirieron una forma característica de meseta que regreso inmediatamente a la línea basal cuando la estimulación finalizó. A diferencia de las hembras nulíparas, la estimulación eléctrica del nBe incremento la PIV a partir de 5 Hz. La máxima PIV inducida por la estimulación del nBe se obtuvo a 80 Hz. En este estudio la multiparidad no afecta la PIV evocada durante la estimulación eléctrica del nBe a diferentes frecuencias. Este efecto podría estar relacionado con las propiedades contráctiles del mBe no alteradas por la multiparidad. Es posible que los cambios en la frecuencia de estimulación para generar un incremento en la PIV estén relacionados con alteraciones en las paredes del tejido vaginal. En la condición de multiparidad los componentes tisulares de las tres capas (lamina propia, submucosa y capa muscular) se entremezclan. El espesor del epitelio y el área cubierta por musculatura lisa y vasos sanguíneos disminuyen significativamente (Rodríguez-Antolín y cols. 2009, Xelhuanzi y cols. 2014).

Los cambios causados por la multiparidad en las características histológicas del aparato urogenital es un factor determinante involucrado en las modificaciones fisiológicas que propicia a la aparición de desórdenes del piso pélvico como la IU. El presente estudio muestra la importancia de la participación funcional de los nervios perineales en las funciones del aparato urogenital, como la regulación de la presión uretral y vaginal. Proponemos, que uno de los tratamientos más viables y alternativos para la IUE es la estimulación selectiva del nBe.

9. CONCLUSIONES

1.- La amplitud y la frecuencia que activan al nervio Be e Isc en conejas nulíparas son similares. La estimulación eléctrica de los nervios a frecuencias bajas genera un aumento de la presión uretral y vaginal sin que los músculos perineales muestren fatiga significativa.

2.- La estimulación eléctrica del nervio clitoral genera un aumento de la presión uretral y vaginal probablemente desencadenado por vía refleja. El nervio clitoral podría ser un nuevo objetivo de estimulación eléctrica para la modulación de las funciones del urinario inferior.

3.- El incremento en la presión uretral por estimulación eléctrica de los nervios perineales puede ser una terapia potencial para la neuromodulación de los músculos del piso pélvico y vísceras urogenitales para mantener el cierre uretral.

10.PERSPECTIVAS

Resulta necesario realizar más estudios para establecer a la coneja como un nuevo modelo para tratamientos de estimulación eléctrica de desórdenes del piso pélvico como la incontinencia urinaria. Se propone estimular selectivamente los nervios del piso pñelvico (bulboesponjoso) como un objetivo terapéutico para la incontinencia urinaria, validando su participación como un esfínter secundario en la continencia urinaria de la coneja. Asimismo, proponemos diseñar un dispositivo de estimulación eléctrica con características viables para la neuromodulación selectiva de nervios periféricos y proponer un tratamiento de estimulación eléctrica a partir de los parámetros de estimulación determinados en este estudio. La estimulación crónica del nervio bulboesponjoso puede ser una opción terapéutica viable por o que se sugiere evaluar después del tratamiento de estimulación la cistometría, la actividad electromiográfica del músculo, la histología del nervio y músculo para demostrar su posible efecto en conejas maduras múltíparas que presentan síntomas de incontinencia o alteraciones en la actividad refleja como consecuencia de la edad y el parto.

11.REFERENCIAS

- Allen RE, Hosker GL, Smith AR, Warrell DW. 1990. Pelvic floor damage childbirth: a neurophysiological study. *Br J Obstet Gynaecol* 97(9): 770-9.
- Agarwal, P., Sharma, D., Wankhede, S., Jain, P. C., & Agrawal, N. L. (2019). Sciatic Nerve to Pudendal Nerve Transfer: Anatomical Feasibility for a New Proposed Technique. *Indian J Plast Surg*, 52(2), 222–225. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1688513>
- Ammi, M., Chautard, D., Brassart, E., Culty, T., Azzouzi, A. R., & Bigot, P. (2014). Transcutaneous posterior tibial nerve stimulation: Evaluation of a therapeutic option in the management of anticholinergic refractory overactive bladder. *Int Urogynecol J*, 25(8), 1065–1069. <https://doi.org/10.1007/s00192-014-2359-0>
- Aoki, Y., Brown, H. W., Brubaker, L., Cornu, J. N., Daly, J. O., & Cartwright, R. (2017). Urinary incontinence in women. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 1–19. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.42>
- Ashton-Miller, J. A., & DeLancey, J. O. L. (2007). Functional anatomy of the female pelvic floor. *Ann N Y Acad Sci.*, 1101, 266–296. <https://doi.org/10.1196/annals.1389.034>
- Ayala-Quispe, V. B., Guerrero-Reyes, R. H.-V. G., Gutiérrez-González, A., Moysén-Marín, C. M., & Barragán-Ochoa, C. (2020). Efficacy of transcutaneous vs percutaneous tibial nerve stimulation in non-neurogenic overactive bladder Eficacia de la neuromodulación transcutánea vs percutánea del nervio tibial en el síndrome de vejiga hiperactiva no neurogénica. *Revista Mexicana de Urología*, 80, 1–18.
- Bae, S., Lee, K. W., Jeong, H. C., Park, B. H., Bae, W. J., Lee, Y. S., Han, C. H., Kang, S. H., & Kim, S. W. (2020). Effects of low-frequency intravaginal electrical stimulation on female urinary incontinence, quality of life, and urinary symptoms: A pilot study. *Low Urin Tract Symptoms*, 12(1), 25–32. <https://doi.org/10.1111/luts.12278>
- Barber, M. D. (2004). Contemporary views on female pelvic anatomy. *Cleve Clin J Med*, 72(SUPPL.4), 3–11. https://doi.org/10.3949/ccjm.72.Suppl_4.S3
- Beyer, C., Velazquez, J., Larsson, K., & Contreras, J. L. (1980). Androgen regulation of the motor copulatory pattern in the male New Zealand white rabbit. *Hormones and Behavior*, 14(3), 179–190. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(80\)90027-6](https://doi.org/10.1016/0018-506X(80)90027-6)

- Blayney, F., Camuzard, O., Klein, A., Perchenet, A. S., Bertrand, B., Philandrianos, C., Massin, V., Abellan-Lopez, M., & Casanova, D. (2021). Anatomical study of the clitoris and its implications on female genital mutilation and surgical repair. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 74(12), 3394–3403. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2021.05.034>
- Blok, B., Van Kerrebroeck, P., de Wachter, S., Ruffion, A., Van der Aa, F., Jairam, R., Perrouin-Verbe, M. A., & Elneil, S. (2019). A prospective, multicenter study of a novel, miniaturized rechargeable sacral neuromodulation system: 12-month results from the RELAX-OAB study. *Neurourol Urodyn*, 38(2), 689–695. <https://doi.org/10.1002/nau.23892>
- Blok, B., Van Kerrebroeck, P., de Wachter, S., Ruffion, A., Van der Aa, F., Jairam, R., Perrouin-Verbe, M., & Elneil, S. (2018). Programming settings and recharge interval in a prospective study of a rechargeable sacral neuromodulation system for the treatment of overactive bladder. *Neurourol Urodyn*, 37(October 2017), S17–S22. <https://doi.org/10.1002/nau.23476>
- Bo, K., Frawley, H. C., Haylen, B. T., Abramov, Y., Almeida, F. G., Berghmans, B., Bortolini, M., Dumoulin, C., Gomes, M., McClurg, D., Meijlink, J., Shelly, E., Trabuco, E., Walker, C., & Wells, A. (2017). An International Urogynecological Association (IUGA)/International Continence Society (ICS) joint report on the terminology for the conservative and nonpharmacological management of female pelvic floor dysfunction. *Int Urogynecol J*, 28(2), 191–213. <https://doi.org/10.1002/nau.23107>
- Booth, J., Connelly, L., Dickson, S., Duncan, F., & Lawrence, M. (2018a). The effectiveness of transcutaneous tibial nerve stimulation (TTNS) for adults with overactive bladder syndrome: A systematic review. *Neuourology and Urodynamics*, 37(2), 528–541. <https://doi.org/10.1002/nau.23351>
- Booth, J., Connelly, L., Dickson, S., Duncan, F., & Lawrence, M. (2018b). The effectiveness of transcutaneous tibial nerve stimulation (TTNS) for adults with overactive bladder syndrome: A systematic review. *Neuourology and Urodynamics*, 37(2), 528–541. <https://doi.org/10.1002/nau.23351>
- Bosch, J. L. H. R. (2005). The Bion Device : A Minimally Invasive Implantable Ministimulator for Pudendal Nerve Neuromodulation in Patients with Detrusor

- Overactivity Incontinence. *Urol Clin N Am*, 32, 109–112.
<https://doi.org/10.1016/j.ucl.2004.09.003>
- Brink, T. S., Zimmerman, P. L., Mattson, M. A., Su, X., & Nelson, D. E. (2015). A chronic, conscious large animal platform to quantify therapeutic effects of sacral neuromodulation on bladder function. *Journal of Urology*, 194(1), 252–258.
<https://doi.org/10.1016/j.juro.2015.01.109>
- Brocker, D. T., & Grill, W. M. (2013). Principles of electrical stimulation of neural tissue. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 116). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53497-2.00001-2>
- Castelán, F., López-García, K., Moreno-Pérez, S., Zempoalteca, R., Corona-Quintanilla, D. L., Romero-Ortega, M. I., Jiménez-Estrada, I., & Martínez-Gómez, M. (2018). Multiparity affects conduction properties of pelvic floor nerves in rabbits. *Brain Behav*, 8(10), 1–9.
<https://doi.org/10.1002/brb3.1105>
- Cervantes-Palma, C., Campos-Salcedo, J. G., Mendoza-Álvarez, L. A., López-Silvestre, J. C., Díaz-Gómez, C., Reyes-Equihua, J. L., Estrada-Carrasco, C. E., Torres-Gómez, J. J., Hernández-Palacios, G. A., Bravo-Castro, E. I., De Jesús Oswaldo Islas-García, J., Martínez-Alonso, I. A., Izquierdo-Luna, J. S., Germán-Garrido, C. O., Ruíz-Hernández, J. A., Avilés-Díaz, D. J. P., Hernández-Valadez, O. F., Acevedo-Monroy, J. D. G., Victorio-Vargas, O. D., ... Cruz-Valentín, L. G. (2019). Evaluation of the efficacy and safety of sacral neuromodulation as voiding dysfunction treatment and its effects on quality of life in patients seen at a Mexican referral center. *Revista Mexicana de Urología*, 79(4), 1–9.
- Cervigni, M., & Gambacciani, M. (2015). Female urinary stress incontinence. *Climacteric*, 18(September), 30–36. <https://doi.org/10.3109/13697137.2015.1090859>
- Chang HY, Cheng CL, Chen JJ, Peng CW, de G. W. (2006). Reflexes evoked by electrical stimulation of afferent axons in the pudendal nerve under empty and distended bladder conditions in urethane-anesthetized rats. *J Neurosci Methods.*, 150(1), 80–89.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.06.002> Reflexes
- Chang HY, Cheng CL, Chen JJ, de G. W. (2007). Serotonergic drugs and spinal cord transections indicate that different spinal circuits are involved in external urethral

- sphincter activity in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 292(3), 1044–1053.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00175.2006>. Serotonergic
- Cohn, J. A., Kowalik, C. G., Kaufman, M. R., Reynolds, W. S., Milam, D. F., Dmochowski, R. R., Cohn, J. A., Kowalik, C. G., Kaufman, M. R., Stuart, W., Milam, D. F., Dmochowski, R. R., Cohn, J. A., Kowalik, C. G., Kaufman, M. R., Reynolds, W. S., Milam, D. F., & Dmochowski, R. R. (2017). Expert Review of Medical Devices Evaluation of the axonics modulation technologies sacral neuromodulation system for the treatment of urinary and fecal dysfunction for the treatment of urinary and fecal dysfunction. *Expert Rev Med Devices*, 14(1), 3–14.
<https://doi.org/10.1080/17434440.2017.1268913>
- Corona-Quintanilla, D. L., Castelán, F., Fajardo, V., Manzo, J., & Martínez-Gómez, M. (2009). Temporal Coordination of Pelvic and Perineal Striated Muscle Activity During Micturition in Female Rabbits. *J Urol*, 181(3), 1452–1458.
<https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.10.103>
- Corona-Quintanilla, D. L., López-Juárez, R., Pacheco, P., Romero-Ortega, M. I., Castelán, F., & Martínez-Gómez, M. (2020). Bladder and urethral dysfunction in multiparous and mature rabbits correlates with abnormal activity of pubococcygeus and bulbospongiosus muscles. *Neurourol Urodyn*, 39(1), 116–124. <https://doi.org/10.1002/nau.24176>
- Corona-Quintanilla DL, López-Juárez R, Zempoalteca R, Cuevas E, Castelán F, M.-G. M. (2016). Anatomic and Functional Properties of Bulboglandularis Striated Muscle Support its Contribution as Sphincter in Female Rabbit Micturition. *Neurourol Urodyn.*, 35(6), 689–695. <https://doi.org/10.1002/nau>
- Corona-Quintanilla DL, Zempoalteca R, Arteaga L, Castelán F, M.-G. M. (2014). The Role of Pelvic and Perineal Striated Muscles in Urethral Function During Micturition in Female Rabbits. *Neurourol Urodyn*, 33(4), 455–460. <https://doi.org/10.1002/nau>
- 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(2), 130–140. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2014.20.2.130>
- Cramer MS, Boniface ER, Holland A, G. W. (2021). Changes in Morphology of the Urethral Rhabdosphincter Postpartum. *Female Pelvic Med Reconstr Surg*, 27(3), 181–185.

<https://doi.org/10.1097/SPV.0000000000001007>.Changes

- Cruz, Y., & Downie, J. W. (2005). Sexually dimorphic micturition in rats: Relationship of perineal muscle activity to voiding pattern. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *289*(5 58-5), 1307–1318.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00088.2005>
- Cruz, Y., Hernández-Plata, I., Lucio, R. A., Zempoalteca, R., Castelán, F., & Martínez-Gómez, M. (2017). Anatomical organization and somatic axonal components of the lumbosacral nerves in female rabbits. *Neurol Urolog*, *36*(7), 1749–1756.
<https://doi.org/10.1002/nau.23209>
- Cruz, Y., Hudson, R., Pacheco, P., Lucio, R. A., & Martínez-Gómez, M. (2002). Anatomical and physiological characteristics of perineal muscles in the female rabbit. *Physiology and Behavior*, *75*(1–2), 33–40. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00638-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00638-2)
- Cruz, Y., Rodríguez-Antolín, J., Nicolás, L., Martínez-Gómez, M., & Lucio, R. A. (2010). Components of the neural circuitry of the vaginocavernosus reflex in rabbits. *Journal of Comparative Neurology*, *518*(2), 199–210. <https://doi.org/10.1002/cne.22193>
- Cuevas-Romero, E., Sánchez-Cardiel, A., Zamora-Gallegos, A. M., Cruz-Lumbreras, R., Corona-Quintanilla, D. L., Castelán, F., & Martínez-Gómez, M. (2017). Moderate-to-high normal levels of thyrotropin is a risk factor for urinary incontinence and an unsuitable quality of life in women over 65 years. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, *44*(May), 86–92. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12788>
- Cyr, M., Kruger, J., Wong, V., Francog, M., Dumoulin, C., Girard, I., & Morin, M. (2017). Pelvic floor morphometry and function in women with and without puborectalis avulsion in the early postpartum period. *Am J Obstet Gynecol*, *216*(3), 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.11.1049>
- de Groat, W. C., Griffiths, D., & Yoshimura, N. (2015). Neural control of the lower urinary tract. *Comprehensive Physiology*, *5*(1), 327–396. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130056>
- de Groat WC, T. C. (2016). Impact of Bioelectronic Medicine on the Neural Regulation of Pelvic Visceral Function William. *Bioelectron Med*, *22*(3), 25–36.
<https://doi.org/110.1016/j.bbi.2017.04.008>
- DeLancey, E. R. Trowbridge, J. M. Miller, D. M. Morgan, K. Guire, D. E. Fenner, W. J. W.

- and J. A. A.-M. (2008). Stress Urinary Incontinence: Relative Importance of Urethral Support and Urethral Closure Pressure. J. O. DeLancey, E. R. Trowbridge, J. M. Miller, D. M. Morgan, K. Guire, D. E. Fenner, W. J. Weadock and J. A. Ashton-Miller *J Urol* 2008; 179: 2286-2290. *J Urol*, 181(3), 1507. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.11.042>
- DeLancey, J. O. L. (1994). Structural support of the urethra as it relates to stress urinary incontinence: The hammock hypothesis. *Am J Obstet Gynecol*, 170(6), 1713–1723. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(94\)70346-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(94)70346-9)
- DeLancey, J. O. L., 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(1), 46–53. [https://doi.org/10.1016/S0029-7844\(02\)02465-1](https://doi.org/10.1016/S0029-7844(02)02465-1)
- Dick A. Janssen, Fawzy Farag, and J. P. H. (2013). Urgent-SQ Implant in Treatment of Overactive Bladder Syndrome: 9-Year Follow-Up Study Dick. *Neurourology and Urodynamics*, 475(October 2012), 472–475. <https://doi.org/10.1002/nau>
- Dietz, H. P., & Wilson, P. D. (2005). Childbirth and pelvic floor trauma. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 19(6), 913–924. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2005.08.009>
- Dmochowski, R., Lynch, C. M., Efros, M., & Cardozo, L. (2019). External electrical stimulation compared with intravaginal electrical stimulation for the treatment of stress urinary incontinence in women: A randomized controlled noninferiority trial. *Neurourol Urodyn*, 38(7), 1834–1843. <https://doi.org/10.1002/nau.24066>
- Ebbesen, M. H., Hunskar, S., Rortveit, G., & Hannestad, Y. S. (2013). Prevalence, incidence and remission of urinary incontinence in women: longitudinal data from the Norwegian HUNT study (EPINCONT). *BMC Urol*, 13(27), 1–10.
- Elterman, D. S. (2018). The novel Axonics ® rechargeable sacral neuromodulation system : Procedural and technical impressions from an initial North American experience. *Neurourol Urodyn*, 37(December 2017), 1–8. <https://doi.org/10.1002/nau.23482>
- Emmerson, S., Young, N., Rosamilia, A., Parkinson, L., Edwards, S. L., Vashi, A. V., Davies-Tuck, M., White, J., Elgass, K., Lo, C., Arkwright, J., Werkmeister, J. A., & Gargett, C. E. (2017). Ovine multiparity is associated with diminished vaginal muscularis, increased elastic fibres and vaginal wall weakness: Implication for pelvic organ prolapse. *Sci Rep*, 7(April), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep45709>

- Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell, Steven A. Siegelbaum, A. J. H. (2015). Principles of neural science. In *Syria Studies* (Vol. 7, Issue 1).
https://www.researchgate.net/publication/269107473_What_is_governance/link/548173090cf22525dcb61443/download%0Ahttp://www.econ.upf.edu/~reynal/Civilwars_12December2010.pdf%0Ahttps://think-asia.org/handle/11540/8282%0Ahttps://www.jstor.org/stable/41857625
- Fajardo, V., Pacheco, P., Hudson, R., Jiménez, I., & Martínez-Gómez, M. (2008). Differences in morphology and contractility of the bulbospongiosus and pubococcygeus muscles in nulliparous and multiparous rabbits. *Int Urogynecol J*, 19(6), 843–849.
<https://doi.org/10.1007/s00192-007-0541-3>
- Farag FF, Martens FM, Rijkhoff NJ, H. J. (2012). Dorsal genital nerve stimulation in patients with detrusor overactivity: A systematic review. *Curr Urol Rep* (2012), 13(5), 385–388.
<https://doi.org/10.1007/s11934-012-0273-x>
- Fitzpatrick, M., O'Brien, C., O'Connell, P. R., & O'Herlihy, C. (2003). Patterns of abnormal pudendal nerve function that are associated with postpartum fecal incontinence. *Am J Obstet Gynecol*, 189(3), 730–735. [https://doi.org/10.1067/S0002-9378\(03\)00817-2](https://doi.org/10.1067/S0002-9378(03)00817-2)
- Fowler, C. J., Griffiths, D., & De Groat, W. C. (2008). The neural control of micturition. *Nat Rev Neurosci*, 9(6), 453–466. <https://doi.org/10.1038/nrn2401>
- García-Pérez, H., Harlow, S. D., & Denman, C. (2018). The effect of pelvic pain and urinary incontinence on women's self-rated health in northern Mexico. *International Urogynecology Journal*, 29(2), 243–250. <https://doi.org/10.1007/s00192-017-3537-7>
- Gill, B. C., Pizarro-Berdichevsky, J., Bhattacharyya, P. K., Brink, T. S., Marks, B. K., Quirouet, A., Vasavada, S. P., Jonesk, S. E., & Goldmank, H. B. (2017). Real-time changes in brain activity during sacral neuromodulation for overactive bladder. *Journal of Urology*, 196(6), 1379–1385. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2017.06.074>
- Giraldo-Rodríguez, L., Agudelo-Botero, M., Mino-León, D., & Álvarez-Cisneros, T. (2019). Epidemiology, progression, and predictive factors of urinary incontinence in older community-dwelling Mexican adults: Longitudinal data from the Mexican Health and Aging Study. *Neurol Urodyn*, 38(7), 1932–1943. <https://doi.org/10.1002/nau.24096>
- Goldman, H. B., Lloyd, J. C., Noblett, K. L., Carey, M. P., Castaño Botero, J. C., Gajewski, J.

- B., Lehur, P. A., Hassouna, M. M., Matzel, K. E., Paquette, I. M., de Wachter, S., Ehlert, M. J., Chartier-Kastler, E., & Siegel, S. W. (2018). International Continence Society best practice statement for use of sacral neuromodulation. *Neurourol Urodyn*, *37*(5), 1823–1848. <https://doi.org/10.1002/nau.23515>
- González-Mariscal, G., Díaz-Sánchez, V., Melo, A. I., Beyer, C., & Rosenblatt, J. S. (1994). Maternal behavior in New Zealand white rabbits: Quantification of somatic events, motor patterns, and steroid plasma levels. *Physiology and Behavior*, *55*(6), 1081–1089. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90391-3](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90391-3)
- Groen, J., Amiel, C., & Bosch, J. L. H. R. (2005). Chronic pudendal nerve neuromodulation in women with idiopathic refractory detrusor overactivity incontinence: Results of a pilot study with a novel minimally invasive implantable mini-stimulator. *Neurourology and Urodynamics*, *24*(3), 226–230. <https://doi.org/10.1002/nau.20131>
- Gümüşsoy, S., Öztürk, R., Kavlak, O., Hortu, İ., & Yenieli, A. Ö. (2021). Investigating Pelvic Floor Muscle Strength in Women of Reproductive Age and Factors Affecting It. *Clin Nurs Res.*, *30*(7), 1047–1058. <https://doi.org/10.1177/10547738211000350>
- Guralnick, M. L., Kelly, H., Engelke, H., Koduri, S., & O'Connor, R. C. (2015). InTone: a novel pelvic floor rehabilitation device for urinary incontinence. *Int Urogynecol J*, *26*(1), 99–106. <https://doi.org/10.1007/s00192-014-2476-9>
- Gustafson, K. J., Zelkovic, P. F., Feng, A. H., Draper, C. E., Bodner, D. R., & Grill, W. M. (2005). Fascicular anatomy and surgical access of the human pudendal nerve. *World J Urol (2005)*, *23*(6), 411–418. <https://doi.org/10.1007/s00345-005-0032-4>
- Hannestad, Y. S., Rortveit, G., Sandvik, H., & Hunskaar, S. (2000). A community-based epidemiological survey of female urinary incontinence: the Norwegian EPINCONT study. Epidemiology of Incontinence in the County of Nord-Trøndelag. *J Clin Epidemiol*, *53*(11), 1150–1157.
- Heesakkers JPFA, Digesu GA, van Breda J, Van Kerrebroeck P, E. S. (2018). A novel leadless , miniature implantable Tibial Nerve Neuromodulation System for the management of overactive bladder complaints. *Neurourol Urodyn*, *37*(3), 1060–1067. <https://doi.org/10.1002/nau.23401>
- Hernandez-Reynoso, A. G., Corona-Quintanilla, D. L., López-García, K., Horbovetz, A. A.,

- Castelán, F., Zimmern, P., Martínez-Gómez, M., & Romero-Ortega, M. I. (2021). Targeted neuromodulation of pelvic floor nerves in aging and multiparous rabbits improves continence. *Sci Rep*, *11*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90088-8>
- Hinata, N., & Murakami, G. (2014). The urethral rhabdosphincter, levator ani muscle, and perineal membrane: A review. *Biomed Res Int*, *2014*, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2014/906921>
- Hudson, R., Cruz, Y., Lucio, R. A., Ninomiya, J., & Martínez-Gómez, M. (1999). Temporal and behavioral patterning of parturition in rabbits and rats. *Physiology and Behavior*, *66*(4), 599–604. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00331-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00331-X)
- Hunskar, S., Lose, G., Sykes, D., & Voss, S. (2004). The prevalence of urinary incontinence in women in four. *BJU Int*, *93*(3), 324–330. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2004.04609.x>
- Hwang, U. jae, Lee, M. seek, Jung, S. hoon, Ahn, S. hee, & Kwon, O. yun. (2019). Pelvic Floor Muscle Parameters Affect Sexual Function After 8 Weeks of Transcutaneous Electrical Stimulation in Women with Stress Urinary Incontinence. *Sex Med*, *7*(4), 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.esxm.2019.08.011>
- Ismail, S., Chartier-Kastler, E., Perrouin-Verbe, M. A., Rose-Dite-Modestine, J., Denys, P., & Phé, V. (2017). Long-Term Functional Outcomes of S3 Sacral Neuromodulation for the Treatment of Idiopathic Overactive Bladder. *Neuromodulation*, *20*(8), 825–829. <https://doi.org/10.1111/ner.12696>
- Jackson, L. A., Hare, A. M., Carrick, K. S., Ramirez, D. M. O., Hamner, J. J., & Corton, M. M. (2019). Anatomy, histology, and nerve density of clitoris and associated structures: clinical applications to vulvar surgery. *Am J Obstet Gynecol*, *221*(5), 519.e1-519.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2019.06.048>
- Jung, J., Ahn, H. K., & Huh, Y. (2012). Clinical and functional anatomy of the urethral sphincter. *Int Neurourol J*, *16*(3), 102–106. <https://doi.org/10.5213/inj.2012.16.3.102>
- Kelling, J. A., Erickson, C. R., Pin, J., & Pin, P. G. (2020). Anatomical Dissection of the Dorsal Nerve of the Clitoris. *Aesthet Surg J*, *40*(5), 541–547. <https://doi.org/10.1093/asj/sjz330>
- Konschake, M., Brenner, E., Moriggl, B., Hörmann, R., Bauer, S., Foditsch, E., Janetschek,

- G., Künzel, K. H., Sievert, K. D., & Zimmermann, R. (2017). New laparoscopic approach to the pudendal nerve for neuromodulation based on an anatomic study. *Neurourol Urodyn*, *36*(4), 1069–1075. <https://doi.org/10.1002/nau.23090>
- Kwon J, Suzuki T, Takaoka EI, Shimizu N, Shimizu T, Takai S, Yoshikawa S, de Groat WC, Y. N. (2019). Analysis of continence reflexes by dynamic urethral pressure recordings in a rat stress urinary incontinence model induced by multiple simulated birth traumas. *Am J Physiol Renal Physiol*, *317*(4), F781–F788.
- Lara-García, O., Lara-García, M., Perez-Hernandez, D., Cuevas, E., Martínez-Gómez, M., & Pacheco, P. (2018). Spinal cord neuronal components involved in the reflex activity of female rat pubococcygeus motoneurons. *Neuroscience Letters*, *670*, 105–109. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.01.048>
- Levin, R. M., Monson, F. C., Longhurst, P. A., & Wein, A. J. (1994). Rabbit as a model of urinary bladder function. *Neurourol Urodyn*, *13*(2), 119–135. <https://doi.org/10.1002/nau.1930130205>
- Lien, K. C., Mooney, B., DeLancey, J. O. L., & Ashton-Miller, J. A. (2004). Levator ani muscle stretch induced by simulated vaginal birth. *Obstet Gynecol*, *103*(1), 31–40. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000109207.22354.65>
- Lone, F., Sultan, A. H., Stankiewicz, A., Thakar, R., & Wiczorek, A. P. (2014). Vascularity of the urethra in continent women using colour doppler high-frequency endovaginal ultrasonography. *SpringerPlus*, *3*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-619>
- López-García K, Cuevas E, Sánchez-García O, Pacheco P, Martínez-Gómez M, C. F. (2015). Differential Damage and Repair Responses of Pubococcygeus and Bulbospongiosus Muscles in Multiparous Rabbits Kenia. *Neurourol Urodyn*, *35*(2), 180–185. <https://doi.org/10.1002/nau>
- López-García, K., Cuevas, E., Corona-Quintanilla, D. L., Jiménez-Estrada, I., Martínez-Gómez, M., & Castelán, F. (2013). Effect of multiparity on morphometry and oestrogen receptor expression of pelvic and perineal striated muscles in rabbits: Is serum oestradiol relevant? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, *169*(1), 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2013.03.032>
- López-García, K., Mariscal-Tovar, S., Serrano-Meneses, M. A., Castelán, F., Martínez-

- Gómez, M., & Jiménez-Estrada, I. (2017). Fiber type composition of pubococcygeus and bulbospongiosus striated muscles is modified by multiparity in the rabbit. *Neurourology and Urodynamics*, 36(6), 1456–1463. <https://doi.org/10.1002/nau.23143>
- López-Juárez, R., Zempoalteca, R., Corona-Quintanilla, D. L., Jiménez-Estrada, I., Castelán, F., & Martínez-Gómez, M. (2018). Multiparity modifies contractile properties of pelvic muscles affecting the genesis of vaginal pressure in rabbits. *Neurorol Urodyn*, 37(1), 106–114. <https://doi.org/10.1002/nau.23305>
- Lukacz, E. S., Santiago-Lastra, Y., Albo, M. E., & Brubaker, L. (2017). Urinary incontinence in women a review. *JAMA*, 318(16), 1592–1604. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.12137>
- Manríquez, V., Guzmán, R., Naser, M., Aguilera, A., Narvaez, S., Castro, A., Swift, S., & Digesu, G. A. (2016). Transcutaneous posterior tibial nerve stimulation versus extended release oxybutynin in overactive bladder patients. A prospective randomized trial. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 196, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2015.09.020>
- Martínez-Gómez, M., Lucio, R. A., Carro, M., Pacheco, P., & Hudson, R. (1997). Striated muscles and scent glands associated with the vaginal tract of the rabbit. *Anatomical Record*, 247(4), 486–495. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199704\)247:4<486::AID-AR7>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199704)247:4<486::AID-AR7>3.0.CO;2-P)
- Martínez-Gómez, M., Mendoza-Martínez, G., Corona-Quintanilla, D. L., Fajardo, V., Rodríguez-Antolín, J., & Castelán, F. (2011). Multiparity causes uncoordinated activity of pelvic- and perineal-striated muscles and urodynamic changes in rabbits. *Reprod Sci*, 18(12), 1246–1252. <https://doi.org/10.1177/1933719111411728>
- Moreno-Pérez, S. (2017). *Efecto de la multiparidad sobre el potencial de acción compuesto en los nervios que inervan al músculo bulboesponjoso, pubococcígeo y al clítoris en la coneja doméstica (Orctolagus cuniculus)*.
- Mostafaei, H., Sadeghi-Bazargani, H., Hajebrahimi, S., Salehi-Pourmehr, H., Ghojazadeh, M., Onur, R., Al Mousa, R. T., & Oelke, M. (2020). Prevalence of female urinary incontinence in the developing world: A systematic review and meta-analysis—A Report from the Developing World Committee of the International Continence Society and Iranian Research Center for Evidence Based Medicine. *Neurorol Urodyn*, 39(4), 1063–

1086. <https://doi.org/10.1002/nau.24342>
- Ng, S. F., Lok, M. K., Pang, S. M., & Wun, Y. T. (2014). Stress urinary incontinence in younger women in primary care: Prevalence and opportunistic intervention. *J Womens Health (Larchmt)*, 23(1), 65–68. <https://doi.org/10.1089/jwh.2013.4382>
- Noblett, K., Benson, K., Kreder, K., Health, S., Falls, S., & Dakota, S. (2017). *Detailed Analysis of Adverse Events and Surgical Interventions in a Large Prospective Trial of Sacral Neuromodulation Therapy for Overactive Bladder Patients*. 1139(March 2016), 1136–1139. <https://doi.org/10.1002/nau>
- Noblett, K., Berg, K. C., Kan, F., & Siegel, S. (2018). Baseline symptom severity and therapeutic success in a large prospective trial of sacral neuromodulation therapy for overactive bladder patients. *Neurourol Urodyn*, 37(5), 1667–1671. <https://doi.org/10.1002/nau.23422>
- Noblett KL, Dmochowski RR, Vasavada SP, Garner AM, Liu S, P. J. (2017). Cost Profiles and Budget Impact of Rechargeable Versus Non-Rechargeable Sacral Neuromodulation Devices in the Treatment of Overactive Bladder Syndrome Karen. *Neurourol Urodyn*, 36(7), 727–733. <https://doi.org/10.1002/nau>
- Oelrich, T. M. (1983). The striated urogenital sphincter muscle in the female. *The Anatomical Record*, 205(2), 223–232. <https://doi.org/10.1002/ar.1092050213>
- Opisso, E., Borau, A., & Rijkhoff, N. J. M. (2011). Urethral sphincter EMG-controlled dorsal penile/clitoral nerve stimulation to treat neurogenic detrusor overactivity. *J Neural Eng*, 8(3), 1–9. <https://doi.org/10.1088/1741-2560/8/3/036001>
- 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(14), 3120–3134. <https://doi.org/10.1002/cne.23079>
- Peikert, K., & May, C. A. (2015). Muscle spindles in the human bulbospongiosus and ischiocavernosus muscles. *Muscle and Nerve*, 52(1), 55–62. <https://doi.org/10.1002/mus.24500>
- Pelayo-Nieto, M., , E. Linden-Castro, A. Alias-Melgar, D. Espinosa-Pérez Grovas, I., & Ramírez-Galindo, G. Rembis-Ávila, J. Morales-Covarrubias, F. C. la R. y R. C.-B. (2014). Neuromodulación de raíces sacras (Medtronic InterStim ® System) en el

- tratamiento de disfunción miccional. *Rev Mex Urol*, 74(4), 254–257.
[https://doi.org/10.1016/S2007-4085\(15\)30052-5](https://doi.org/10.1016/S2007-4085(15)30052-5)
- Peng, C. W., Chen, J. J. J., Cheng, C. L., & Grill, W. M. (2008). Role of pudendal afferents in voiding efficiency in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 294(2), 660–672.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00270.2007>
- Pereira LC, Botelho S, Marques J, Adami DB, Alves FK, Palma P, R. C. (2016). Electromyographic Pelvic Floor Activity: Is There Impact During The Female Life Cycle? *Neurourol Urodyn*, 32(April), 215–223. <https://doi.org/10.1002/nau>
- Pérez Martínez, C., Martínez Gómez, M., Cruz Gómez, Y., & Vargas Díaz, I. B. (2018). Respuesta de la musculatura del piso pélvico a la estimulación eléctrica transcutánea del nervio pudendo durante la biorretroalimentación para incontinencia urinaria de urgencia. *Revista Mexicana de Urología*, 78(5), 359–365. <https://doi.org/10.48193/rmu.v78i5.137>
- Peters, K. M., Carrico, D. J., Perez-Marrero, R. A., Khan, A. U., Wooldridge, L. S., Davis, G. L., & MacDiarmid, S. A. (2010). Randomized Trial of Percutaneous Tibial Nerve Stimulation Versus Sham Efficacy in the Treatment of Overactive Bladder Syndrome: Results From the SUmIT Trial. *Journal of Urology*, 183(4), 1438–1443.
<https://doi.org/10.1016/j.juro.2009.12.036>
- Peters, K. M., Carrico, D. J., Wooldridge, L. S., Miller, C. J., & Macdiarmid, S. A. (2013). Percutaneous Tibial Nerve Stimulation for the Long-Term Treatment of Overactive Bladder : 3-Year Results of the STEP Study. *J Urol*, 189(6), 2194–2201.
<https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.11.175>
- Peters, K. M., Feber, K. M., & Bennett, R. C. (2005). Sacral versus pudendal nerve stimulation for voiding dysfunction: A prospective, single-blinded, randomized, crossover trial. *Neurourology and Urodynamics*, 24(7), 643–647.
<https://doi.org/10.1002/nau.20174>
- Peters KM, Killinger KA, Boguslawski BM, B. J. (2010). Retest reliability of surface electromyography on the pelvic floor muscles Grape, HH Dederling, A Jonasson, AF. *Neurourol Urodyn.*, 29(April), 1267–1271. <https://doi.org/10.1002/nau>
- Pincus, J., Rostaminia, G., Chang, C., Gafni-Kane, A., & Goldberg, R. P. (2019). Factors associated with overactive bladder symptom improvement after 1 year of monthly

- percutaneous tibial nerve stimulation therapy. *Neurourol Urodyn*, 38(6), 1676–1684.
<https://doi.org/10.1002/nau.24038>
- Pipitone, F., Sadeghi, Z., & DeLancey, J. O. L. (2021). Urethral function and failure: A review of current knowledge of urethral closure mechanisms, how they vary, and how they are affected by life events. *Neurourol Urodyn*, 40(8), 1869–1879.
<https://doi.org/10.1002/nau.24760>
- Rahn DD, Ruff MD, Brown SA, Tibbals HF, W. R. (2008). Biomechanical Properties of The Vaginal Wall: Effect of Pregnancy, Elastic Fiber Deficiency, and Pelvic Organ Prolapse. *Am J Obstet Gynecol*, 5(198), 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.02.022.Biomechanical>
- Rajasekaran, M. R., Fu, J., Nguyen, M. U. (Lilly), Wang, Y., Albo, M., & Bhargava, V. (2019). Age and multiparity related urethral sphincter muscle dysfunction in a rabbit model: Potential roles of TGF- β and Wnt- β catenin signaling pathways. *Neurourol Urodyn*, 38(2), 607–614. <https://doi.org/10.1002/nau.23889>
- Rajasekaran MR, Sohn D, Salehi M, Bhargava V, Fritsch H, M. R. (2012). Role of Puborectalis muscle in the genesis of urethral pressure. *J Urol.*, 188(4), 1382–1388.
<https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.06.001>
- Ramírez-García, I., Blanco-Ratto, L., Kauffmann, S., Carralero-Martínez, A., & Sánchez, E. (2019). Efficacy of transcutaneous stimulation of the posterior tibial nerve compared to percutaneous stimulation in idiopathic overactive bladder syndrome: Randomized control trial. *Neurourol Urodyn*, 38(1), 261–268. <https://doi.org/10.1002/nau.23843>
- Rodríguez-Antolín, J., Xelhuantzi, N., García-Lorenzana, M., Cuevas, E., Hudson, R., & Martínez-Gómez, M. (2009). General tissue characteristics of the lower urethral and vaginal walls in the domestic rabbit. *Int Urogynecol J (2009)*, 20(1), 53–60.
<https://doi.org/10.1007/s00192-008-0727-3>
- Salatzki J, Liechti MD, Spanudakis E, Gonzales G, Baldwin J, Haslam C, Pakzad M, P. J. (2019). Factors influencing return for maintenance treatment with percutaneous tibial nerve stimulation for the management of the overactive bladder. *BJU Int*, 123(5), E20–E28. <https://doi.org/10.1111/bju.14651>
- Sánchez-García, O., Hernández-Aragón, L. G., López-García, K., Juárez, M., Martínez-

- Gómez, M., & Castelán, F. (2019). Signs of damage in pelvic floor muscles at the end of pregnancy in rabbits. *Int Urogynecol J.*, *30*(6), 977–984. <https://doi.org/10.1007/s00192-019-03872-6>
- Shafik, A., Mostafa, R. M., Shafik, A. A., & El-Sibai, O. (2002). Study of the effect of straining on the bulbocavernosus muscle with evidence of a straining-bulbocavernosus reflex and its clinical significance. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.*, *13*(5), 294–298. <https://doi.org/10.1007/s001920200064>
- Shafik, A., Shafik, A. A., Sibai, O., & Shafik, I. A. (2008). Effect of micturition on clitoris and cavernosus muscles: An electromyographic study. *Int Urogynecol J.*, *19*(4), 531–535. <https://doi.org/10.1007/s00192-007-0471-0>
- Shafik, A., Sibai, O. El, Shafik, A. A., & Shafik, I. A. (2007). The effect of vaginal distension on the female urinary bladder and urethral sphincters. *Acta Obstet Gynecol Scand.*, *86*(11), 1398–1403. <https://doi.org/10.1080/00016340701647382>
- Sheng Y, Liu X, Low LK, Ashton-Miller JA, M. J. (2020). Association of Pubovisceral Muscle Tear with Functional Capacity of Urethral Closure: Evaluating Maternal Recovery from Labor and Delivery. *Am J Obstet Gynecol.*, *222*(6), 598.e1-598.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2019.11.1257>.Association
- Siegel, S., Noblett, K., Mangel, J., Bennett, J., Griebing, T. L., Sutherland, S. E., Bird, E. T., Comiter, C., Culkin, D., Zylstra, S., Kan, F., & Berg, K. C. (2018). Five-Year Followup Results of a Prospective, Multicenter Study of Patients with Overactive Bladder Treated with Sacral Neuromodulation. *J Urol.*, *199*(1), 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2017.07.010>
- Siegel, S., Noblett, K., Mangel, J., Griebing, T. L., Sutherland, S. E., Bird, E. T., Comiter, C., Culkin, D., Bennett, J., Zylstra, S., Kan, F., & Thiery, E. (2016). Three-year Follow-up Results of a Prospective, Multicenter Study in Overactive Bladder Subjects Treated With Sacral Neuromodulation. *Urology.*, *94*, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2016.04.024>
- Sirls, E. R., Killinger, K. A., Boura, J. A., & Peters, K. M. (2018). Percutaneous Tibial Nerve Stimulation in the Office Setting: Real-world Experience of Over 100 Patients. *Urology.*, *113*, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2017.11.026>

- Soave, I., Scarani, S., Mallozzi, M., Nobili, F., Marci, R., & Caserta, D. (2019). Pelvic floor muscle training for prevention and treatment of urinary incontinence during pregnancy and after childbirth and its effect on urinary system and supportive structures assessed by objective measurement techniques. *Arch Gynecol Obstet*, *299*(3), 609–623.
<https://doi.org/10.1007/s00404-018-5036-6>
- Spinelli, M., Malaguti, S., Giardiello, G., Lazzeri, M., Tarantola, J., & Van Den Hombergh, U. (2005). A new minimally invasive procedure for pudendal nerve stimulation to treat neurogenic bladder: Description of the method and preliminary data. *Neuourology and Urodynamics*, *24*(4), 305–309. <https://doi.org/10.1002/nau.20118>
- Sucar-Romero, S., Decanini-Terán, C., & Ruiz-Galindo, G. H. (2009). Primer caso de neuromodulación sacra para el tratamiento de la incontinencia urinaria y fecal en México. Informe de caso. *Revista de Gastroenterología de Mexico*, *74*(2), 122–126.
- T Hoen LA, Groen J, Scheepe JR, B. B. (2017). Intermittent Sacral Neuromodulation for Idiopathic Urgency Urinary Incontinence in Women. *Neurourol Urodyn*, *36*(2), 385–389.
<https://doi.org/10.1002/nau>
- te Dorsthorst, M. J., Heesakkers, J. P. F. A., & van Balken, M. R. (2020). Long-term real-life adherence of percutaneous tibial nerve stimulation in over 400 patients. *Neuourology and Urodynamics*, *39*(2), 702–706. <https://doi.org/10.1002/nau.24254>
- Thor, K. B., & De Groat, W. C. (2010). Neural control of the female urethral and anal rhabdosphincters and pelvic floor muscles. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *299*(2), 416–438.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00111.2010>
- Tokunaka S, Fujii H, Hashimoto H, Y. S. (1993). Proportions of fiber types in the external urethral sphincter of young nulliparous and old multiparous rabbits. *Urol Res*, *21*(2), 121–124.
- Vaganée, D., Voorham, J., Voorham-van der Zalm, P., & De Wachter, S. (2019). Needle Placement and Position of Electrical Stimulation Inside Sacral Foramen Determines Pelvic Floor Electromyographic Response—Implications for Sacral Neuromodulation. *Neuromodulation*, *22*(6), 709–715. <https://doi.org/10.1111/ner.12953>
- Van Breda, H. M. K., Farag, F. F., Martens, F. M. J., Heesakkers, J. P. F. A., & Rijkhoff, N. J.

- M. (2016). Subject-Controlled, On-demand, Dorsal Genital Nerve Stimulation to Treat Urgency Urinary Incontinence; A Pilot. *Front Neurosci.*, *10*(FEB), 1–7.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00024>
- van Breda, H. M. K., Martens, F. M. J., Tromp, J., & Heesakkers, J. P. F. A. (2017). A New Implanted Posterior Tibial Nerve Stimulator for the Treatment of Overactive Bladder Syndrome: 3-Month Results of a Novel Therapy at a Single Center. *Journal of Urology*, *198*(1), 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2017.01.078>
- Van Der Pal, F., Van Balken, M. R., Heesakkers, J. P. F. A., Debruyne, F. M. J., & Bemelmans, B. L. H. (2006). Implant-driven tibial nerve stimulation in the treatment of refractory overactive bladder syndrome: 12-Month follow-up. *Neuromodulation*, *9*(2), 163–171. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1403.2006.00056.x>
- VL, M. H. and H. (2014). Vaginal childbirth and pelvic floor disorders Hafsa. *Womens Health (Lond Engl)*, *23*(1), 1–7. <https://doi.org/10.2217/whe.13.17.Vaginal>
- Wang S, Lv J, Feng X, L. T. (2017). Efficacy of electrical pudendal nerve stimulation versus transvaginal electrical stimulation in treating female idiopathic urgency urinary incontinence. *J Urol.*, *197*(6), 1496-1501. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2017.01.065>
- Weissbart, S. J., Bhavsar, R., Rao, H., Wein, A. J., Detre, J. A., Arya, L. A., & Smith, A. L. (2018). Specific Changes in Brain Activity during Urgency in Women with Overactive Bladder after Successful Sacral Neuromodulation: A Functional Magnetic Resonance Imaging Study. *J Urol*, *200*(2), 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2018.03.129>
- Xelhuantzi, N., Rodríguez-Antolín, J., Nicolás, L., Castelán, F., Cuevas, E., & Martínez-Gómez, M. (2014). Tissue alterations in urethral and vaginal walls related to multiparity in rabbits. *Anatomical Record*, *297*(10), 1963–1970. <https://doi.org/10.1002/ar.23006>
- Yan, X., Kruger, J. A., Nielsen, P. M. F., & Nash, M. P. (2015). Effects of fetal head shape variation on the second stage of labour. *J Biomech*, *48*(9), 1593–1599.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2015.02.062>
- Young, N., Rosamilia, A., Arkwright, J., Lee, J., Davies-Tuck, M., Melendez, J., Werkmeister, J., & Gargett, C. E. (2017). Vaginal wall weakness in parous ewes: a potential preclinical model of pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J*, *28*(7), 999–1004.
<https://doi.org/10.1007/s00192-016-3206-2>

- Zhang, X., Chen, Z., Song, X., Yuan, X., Cai, D., Chen, J., Li, L., Du, G., Yang, W., & Ye, Z. (2013). Application of perineal ultrasound measurement and urodynamic study in the diagnosis and typing of stress urinary incontinence ultrasound and urodynamic study. *Urologia*, *80*(3), 233–238. <https://doi.org/10.5301/urologia.5000027>
- Zhang, Y., Zhang, P., Tian, X., Chen, G., Li, Y., Zhang, Y., Xu, Z., Wei, Z., Zhang, W., Ma, L., Shi, B., Liao, L., & Wang, J. (2019). Remotely programmed sacral neuromodulation for the treatment of patients with refractory overactive bladder: a prospective randomized controlled trial evaluating the safety and efficacy of a novel sacral neuromodulation device. *World J Urol*, *37*(11), 2481–2492. <https://doi.org/10.1007/s00345-019-02698-7>

12.PUBLICACIONES

ARTÍCULO

Efecto de la multiparidad sobre la presión uretral y vaginal en respuesta a la electroestimulación del músculo bulboglandularis

1. INTRODUCCIÓN

La IUE es el tipo de IU con mayor prevalencia en mujeres de mediana edad y es una preocupación creciente debido a la mayor esperanza de vida (Hannestad y cols. 2000, Hunskaar y cols. 2004, Ng y cols. 2014). El parto, es un factor de riesgo, que contribuye a la hipermovilidad uretral (DeLancey 1994) y lesiona o daña el esfínter externo de la uretra o grupo de los músculos del complejo esfintérico, ambos subyacen a la IUE (DeLancey 1994, DeLancey y cols. 2008). La presión uretral depende de las acciones de los vasos sanguíneos, el tejido conectivo, el lumen uretral, los nervios, la musculatura lisa y la musculatura estriada que constituye a los músculos del complejo esfintérico (Jung y cols. 2012). Los músculos del complejo esfintérico son responsables de aproximadamente el 41% de la presión de cierre uretral (Cervigni y Gambacciani, 2015). Las mujeres que sufren de IUE postparto muestran una presión de cierre uretral menor (DeLancey y cols. 2008, Zhang y cols. 2013) y un área de transversal reducida del complejo esfintérico (Cramer y cols. 2021) posiblemente, alterando el mecanismo de continencia urinaria (Cramer y cols. 2021). Sin embargo, pocos estudios han abordado la contribución del esfínter uretrovaginal en la generación de presión uretral y vaginal (DeLancey y cols. 2008, Oelrich 1983).

La coneja es una especie adecuada para estudiar la fisiología del tracto urogenital inferior (TUI), incluyendo el rol de los músculos estriados del piso pélvico (Levin y cols. 1994, Corona-Quintanilla y cols. 2009, Corona-Quintanilla y cols. 2014, Martínez-Gómez y cols. 2011, López-Juárez y cols. 2017, (Rajasekaran y cols. 2012). La actividad sincronizada de sus MPP contribuye significativamente en la continencia y el vaciamiento (Corona-Quintanilla y cols. 2009, Corona-Quintanilla y cols. 2014). La multiparidad (cuatro partos consecutivos) afecta la urodinamia y produce alteraciones en la activación sincrónica de los músculos mBe y

pubococcígeo (mPc), además de la presión vesical y uretral (Corona-Quintanilla y cols. 2020). La multiparidad también modifica las propiedades contráctiles del mBe y mPc reduciendo la presión vaginal (López-Juárez y cols. 2017). Además, las características histológicas de la uretra y la vagina son también desorganizadas en conejas multíparas (Xelhuantzi y cols. 2014). El mecanismo de cierre uretral depende de integridad muscular de los músculos del esfínter, tales como el mBg. Durante la fase de almacenamiento, el mBg muestra burts de actividad tónica que gradualmente disminuyen hasta apagarse en el inicio de la fase de vaciamiento vesical ((Rajasekaran y cols. 2019, Corona-Quintanilla y cols. 2016). Las fibras musculares circulares del mBg envuelven la uretra distal y la vagina pélvica, parecido al esfínter uretrovaginal, parte del esfínter urogenital estriado que regula la continencia urinaria en mujeres (Oelrich 1983, DeLancey y cols. 2008).

En general, planteamos la hipótesis de que la multiparidad afecta la génesis de la presión uretral y vaginal. Por lo tanto, nuestro objetivo aquí es determinar el efecto de la multiparidad sobre la presión uretral y vaginal generada por la estimulación eléctrica del mBg en conejas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Animales

Conejas adultas nulíparas (10.8 ± 0.3 meses; N, n=6) y multíparas (11.6 ± 0.2 meses; M, n=6) de la raza Chinchilla (*Oryctolagus cuniculus*) se mantuvieron alojadas en jaulas individuales de acero inoxidable (50 x 60 x 40 cm) bajo condiciones de bioterio en el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (Universidad Autónoma de Tlaxcala) con un ciclo de luz-oscuridad de 16:8 h y temperatura ambiente de 20-28 °C. Se les proporcionó diariamente 200 gramos de alimento (Conejina, Purina) y tuvieron continuo acceso al agua.

La condición de multiparidad (cuatro partos) se obtuvo al aparear a las conejas a partir de los seis meses de edad y en el primer día postparto después de los primeros tres partos, así las hembras estuvieron gestantes y lactando durante 20 días cuando las crías fueron destetadas. En el día del cuarto parto, las crías fueron sacrificadas para evitar la lactancia y permitir a las hembras multíparas alcanzar un estado hormonal similar al de las hembras nulíparas que no fueron expuestas a ningún estímulo reproductivo (Martínez-Gómez y cols. 2011). Los registros

electrofisiológicos se realizaron bajo anestesia con uretano (1.5 g/kg, i.p.; Sigma-Aldrich, México) en el día 20 postparto de las hembras multíparas y en las hembras nulíparas cuando alcanzaron la edad antes mencionada. Al final de los siguientes procedimientos experimentales, las hembras fueron sacrificadas con una sobredosis de uretano.

2.2 Disección y morfometría del mBg

Las hembras se anestesiaron con uretano (1.5 g/Kg, i.p.; Sigma-Aldrich, México) administrado por vía intraperitoneal y se colocaron en posición decúbito dorsal para realizar una incisión sobre la piel y los músculos abdominales. Posteriormente, se removió cuidadosamente la sínfisis púbica que cubre gran parte del tracto urogenital. Bajo un microscopio quirúrgico (SMZ-2T Nikon, Japan) se realizaron cortes laterales en el arco isquiático y en la parte distal de la vejiga. Para separar el hueso, el músculo Be y el músculo obturador externo fueron desinsertados para exponer el músculo obturador interno. En seguida, el origen e inserción del músculo obturador interno fue cortado para identificar el mBg. La delgada capa de fibras estriadas del mBg fue localizada ventral y rodeado la vagina pélvica, que está cubierta por un prominente plexo venoso. Las fibras del mBg estaban unidas ventralmente a un tendón o ligamento uretral (Figura). Una vez identificado el mBg, se midió el ancho en su origen y de su región media. En este estudio no se midió la longitud del músculo debido a la disposición semicircular de sus fibras estriadas. Para medir la presión uretral y vaginal durante la estimulación eléctrica del mBg, las fibras del músculo obturador interno que se unen al mismo ligamento uretral fueron removidas cuidadosamente para evitar desinsectar algunas fibras externas del mBg.

2.3 Presión uretral y vaginal generada durante la estimulación eléctrica del mBg

La vejiga fue expuesta a través de una incisión en la línea media del abdomen y una ligera presión manual fue aplicada sobre ella para expulsar la orina. Posteriormente, un catéter (1.6 mm O.D. y 1.2 mm I.D.) fue introducido en el tracto urogenital a través del ápice vesical. El catéter se arrastró hacia la uretra y la vagina hasta que este apareció en la abertura vaginal. Una vez fuera del tracto urogenital, el catéter fue atado a un globo con un hilo de algodón (8 cm de longitud) y se introdujo nuevamente en la uretra (5.5-6 cm) específicamente a nivel de uretra distal. A continuación, el globo se desplazó hacia la vagina pélvica (5 cm) para registrar

secuencialmente la presión en ambas regiones. El globo se inflo con solución salina (39°C; 0.9%NaCl) hasta alcanzar el diámetro uretral y vaginal. El catéter se conectó a un transductor de presión P23BC (Statham, HatoRey, Puerto Rico) y a un amplificador Grass 7DA D.C. para registrar las variaciones de PU y PV. Finalmente, el globo se presionó manualmente hasta observar un incremento significativo de la presión en el sistema de registro para confirmar la correcta posición del globo en la uretra o la vagina pélvica. Los registros fueron visualizados y almacenados en el programa PolyView 2.5 (Grass) para su posterior análisis.

Para determinar la contribución del mBg en la generación de presión sobre la uretra y la vagina pélvica, evocamos la contracción muscular con pulsos eléctricos cuadrados simples y trenes de estimulación de frecuencia ascendente. Electrodo bipolares de plata (0.1 mm de diámetro) se colocaron bilateralmente en la región media del mBg, Pulsos cuadrados simples de voltaje (1 Hz, 0.5 ms de duración) se aplicaron a través de una unidad de aislamiento de estímulos SIU5 (Grass Instruments, Quincy, MA) activada por un estimulador S48 (Grass Instruments) para evocar la contracción muscular. Inicialmente, la amplitud de estimulación se incrementó gradualmente hasta que la respuesta muscular fue apenas perceptible y una mínima deflexión en la señal presión se registró. Una vez que se determinó el umbral del estímulo, este se multiplicó para alcanzar la respuesta muscular máxima (4xT). Finalmente, una serie ordenada de estímulos eléctricos fueron secuencialmente aplicados con el propósito de inducir una contracción tetánica. El estímulo eléctrico fue aplicado con frecuencias de 1, 4, 10, 20, 50 y 100 Hz (4xT, con 4 segundos de duración cada una). Cada frecuencia de estimulación se aplicó por triplicado y con periodos de descanso de 8 minutos para evitar la fatiga muscular. Los valores promedio de la presión uretral y vaginal fueron expresados en mmHg.

2.4 Análisis estadístico

Los datos son promedios \pm error estándar. La normalidad de los datos se evaluó con una prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para determinar las diferencias significativas ($P < 0.05$) debido a la multiparidad, se realizó una prueba de t de Student para datos no pareados. Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa Prisma versión 6 (GraphPad Software, San Diego, California).

3. RESULTADOS

3.1 Peso corporal

A continuación, se muestra el peso corporal de las hembras nulíparas y multíparas. El peso corporal no fue estadísticamente diferente entre las condiciones ($t_6 = 1.873$, $P = 0.0906$) (Tabla 1).

Tabla 1. Peso corporal de las hembras nulíparas (N, n=6) y multíparas (M, n=6).

	N	M	P
Peso (Kg)	3.93 ± 0.15	3.58 ± 0.10	0.0906

Los datos son promedio \pm error estándar. Se realizaron pruebas t de Student para datos no apareados de dos colas para determinar diferencias significativas entre grupos. * $P < 0.05$. N, nulíparas; M, multíparas.

3.2 Disección y morfometría del mBg

El mBg se observó como una delgada capa de fibras estriadas con arreglo semicircular, observándose como un cinturón de fibras estriadas que rodea la uretra distal y una porción de la vagina pélvica (Figura 1). Sus fibras estaban unidas a tejido conectivo en lugar de hueso. A nivel de origen muscular, el ancho del mBg fue menor en hembras multíparas comparado a hembras nulíparas (8.5 ± 0.3 vs 10.6 ± 0.7 mm; $t_6 = 2.680$, $P = 0.023$). Lo mismo fue obtenido al medir el ancho de la región media del mBg (10.1 ± 0.3 vs 17.5 ± 1.9 mm; $t_6 = 3.815$, $P = 0.003$). El peso del mBg fue menor en hembras multíparas que en nulíparas (0.19 ± 0.02 vs 0.29 ± 0.03 g; $t_6 = 2.513$, $P = 0.030$) (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros morfométricos del mBg en hembras nulíparas (N, n=6) y multíparas (M, n=6).

mBg	N	M	P
Ancho en su origen (mm)	10.6 ± 0.7	8.5 ± 0.3	0.023*
Ancho de la región media (mm)	17.5 ± 1.9	10.1 ± 0.3	0.003**
Peso (gramos)	0.29 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.030**

Los datos son promedio \pm error estándar. Se realizaron pruebas t de Student para datos no

apareados de dos colas para determinar diferencias significativas entre grupos. * $P < 0.05$;
 ** $P < 0.001$. mBg, músculo bulboglandularis; N, nulíparas; M, multíparas.

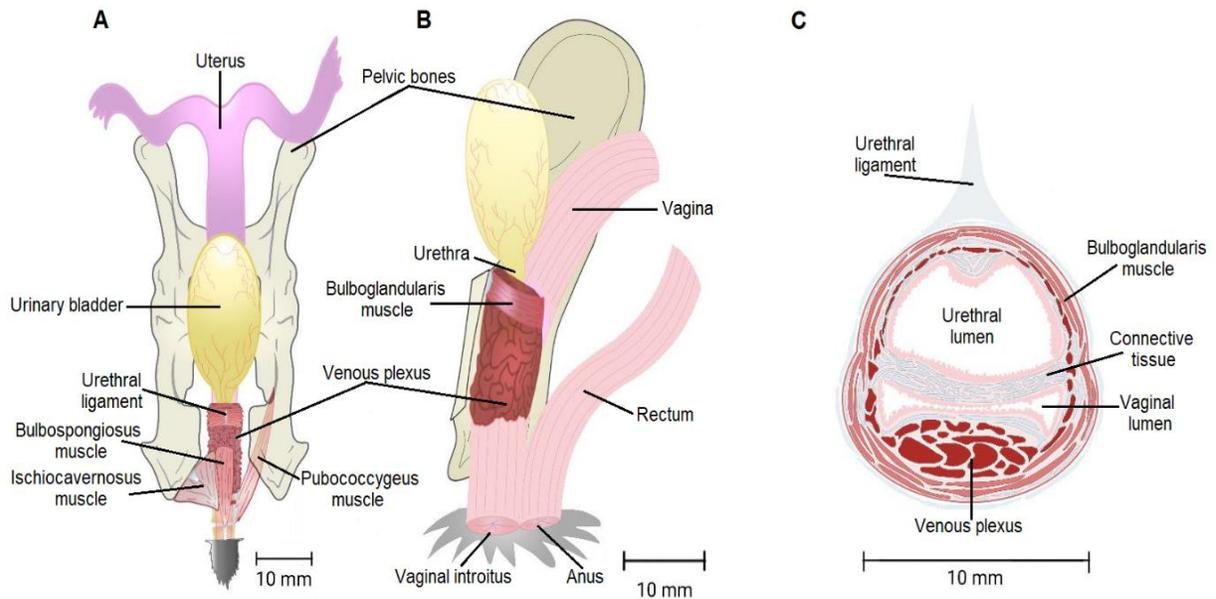


Figura 1. Dibujo del aparato urogenital inferior y anatomía del mBg. Vista ventral (A) y lateral (B) que muestra el arreglo del mBg en el lado ventral de la uretra y alrededor de la vagina, a través del ligamento uretral. El plexo venoso cubre gran parte de la vagina pélvica siendo más conspicuo en la parte distal de la vejiga. C) Representación esquemática de la sección transversal de la uretra, la vagina pélvica y la pared compartida entre ambas estructuras muestra que las fibras del mBg están orientadas circularmente formando un cinturón de fibras estriadas que rodean el plexo venoso, la vagina pélvica y la uretra distal en la línea media.

3.3 Presión uretral y vaginal durante la estimulación eléctrica del mBg

El valor umbral del estímulo que desencadena la PU mínima no fue estadísticamente diferente entre hembras nulíparas y multíparas (0.85 ± 0.11 vs 0.63 ± 0.07 V; $t_6 = 1.574$, $P = 0.147$). Sin embargo, la PU en respuesta al umbral del estímulo en hembras multíparas fue menor que en hembras nulíparas (0.36 ± 0.04 vs. 1.27 ± 0.09 mmHg; $t_6 = 8.67$, $P < 0.0001$) (Figura A). La figura 2 (A-G) muestra los registros representativos de la PU durante la aplicación del umbral del estímulo y trenes de estimulación de frecuencia ascendente al mBg de hembras nulíparas y multíparas. El umbral del estímulo aplicado se multiplicó por 4 (1 Hz, 4xU) para provocar la contracción muscular máxima del mBg y un incremento en la PU (Figura 2 B). Los pulsos del tren de estimulación a 4 y 10 Hz provocaron respuestas contráctiles simples en el mBg y cambios en la PU que siguieron la frecuencia de estimulación (Figura 2 C, D). La PU adquirió una forma característica de tétanos al estimular a 20, 50 y 100 Hz. Al aplicar 100 Hz, una contracción tónica del mBg fue observada (Figura 2 E-G).

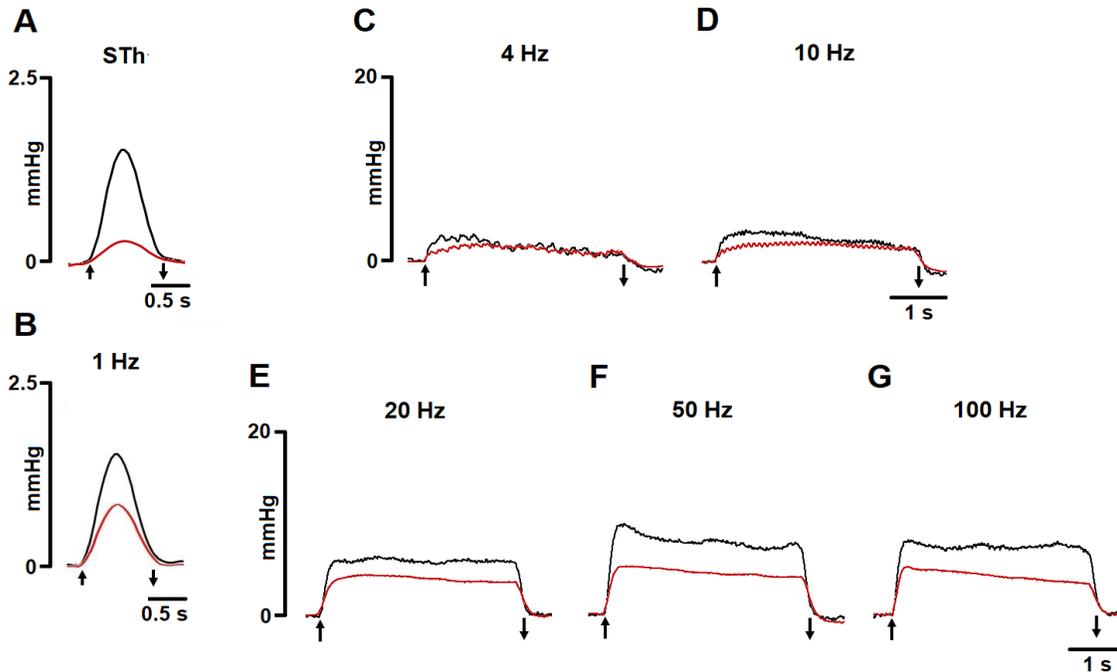
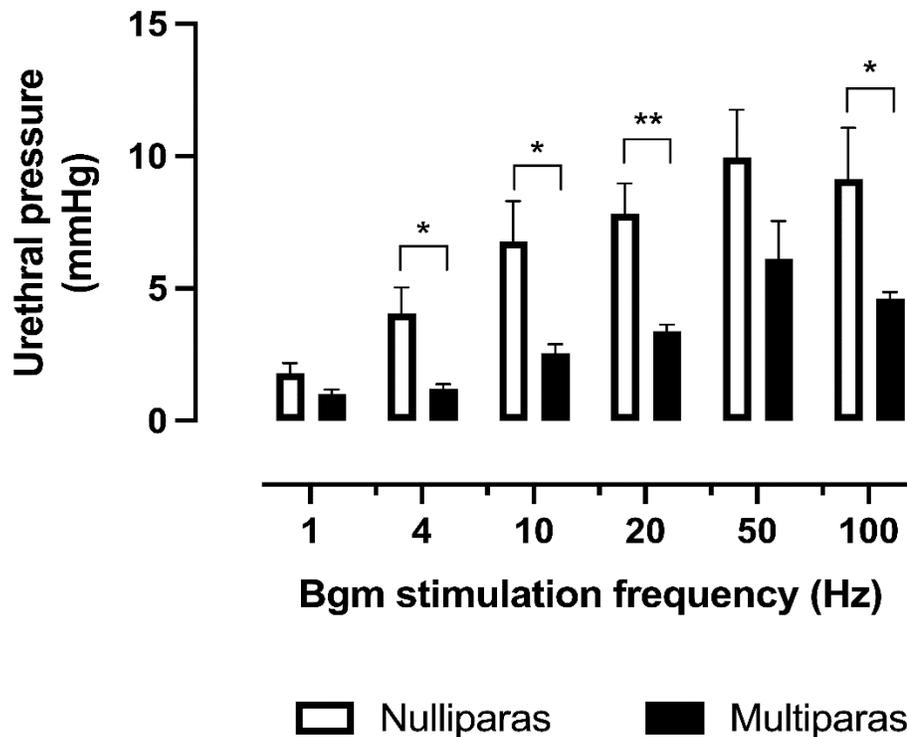


Figura 2. La multiparidad afecta la presión uretral producida por la contracción del mBg de la coneja. Se muestran los registros representativos de la PU generada durante la aplicación del umbral del estímulo (A), el umbral del estímulo multiplicado por 4 (1 Hz, 4xU) (B) y trenes de estimulación de frecuencia ascendente (C-G) al mBg de hembras nulíparas (trazos negros) y hembras múltiparas (trazos rojos). Duración del estímulo: 1 s (A, B), 4 s (C-G). *mmHg*, milímetros de mercurio; *Hz*, Hertz; *s*, segundo, n=6 por grupo. Las flechas indican el periodo de estimulación.

La PU incrementó en magnitud siguiendo la estimulación del mBg a las diferentes frecuencias (Gráfica 1). A 1 Hz, los valores de la PU no cambiaron significativamente entre hembras nulíparas y múltiparas (1.01 ± 0.17 vs. 1.79 ± 0.39 mmHg; $t_6 = 1.847$, $P = 0.094$). Por el contrario, la multiparidad disminuyó la PU durante la estimulación del mBg a 4 Hz (1.2 ± 0.19 vs. 4.06 ± 0.99 mmHg; $t_6 = 2.840$, $P = 0.017$), 10 Hz (2.57 ± 0.32 vs. 6.79 ± 1.52 mmHg; $t_6 = 2.719$, $P = 0.021$), 20 Hz (3.38 ± 0.26 vs. 7.83 ± 1.15 mmHg; $t_6 = 3.793$, $P = 0.003$), y 100 Hz (4.62 ± 0.24 vs. 9.15 ± 1.93 mmHg; $t_6 = 2.332$, $P = 0.0419$). Al estimular a 50 Hz (9.95 ± 1.80 vs. 6.11 ± 1.44 mmHg; $t_6 = 1.665$, $P = 0.126$), la PU no varió significativamente debido a la multiparidad.



Gráfica 1. Presión uretral en hembras nulíparas y múltiparas es producida por la estimulación eléctrica del mBg. Los datos son promedio \pm error estándar, $n=6$ por grupo. Las diferencias significativas ($p<0.05$) entre los grupos se evaluaron con una prueba t de Student no apareada de dos colas. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$. Hz, Hertz; mmHg, milímetros de mercurio.

A nivel de vagina pélvica, el valor umbral del estímulo del mBg de hembras múltiparas fue menor que en hembras nulíparas (0.70 ± 0.06 vs. 1.00 ± 0.02 V; $t_6 = 4.108$, $P=0.002$) y la PV en respuesta al umbral del estímulo de hembras múltiparas disminuyó significativamente en comparación con las hembras nulíparas (0.53 ± 0.04 vs. 1.29 ± 0.06 mmHg; $t_6= 9.93$, $P < 0.0001$) (Figura 3A). La figura 3(A-G) muestra los registros representativos de la PV durante la aplicación del umbral del estímulo y trenes de estimulación de frecuencia ascendente al mBg de hembras nulíparas y múltiparas. Asimismo, el umbral del estímulo aplicado se multiplicó por 4 (1 Hz, 4xU) (Figura 3B). Durante la estimulación eléctrica a 4 y 10 Hz, los cambios en la PV y en la respuesta contráctil del mBg siguieron la frecuencia de estimulación y después regreso a

la presión de referencia (Figura 3C, D). La estimulación eléctrica del mBg a 10 Hz produjo una forma de meseta en la PV (Figura 3D). La PV máxima y sostenida se observó a 20, 50 y 100 Hz (Figura 3E-G).

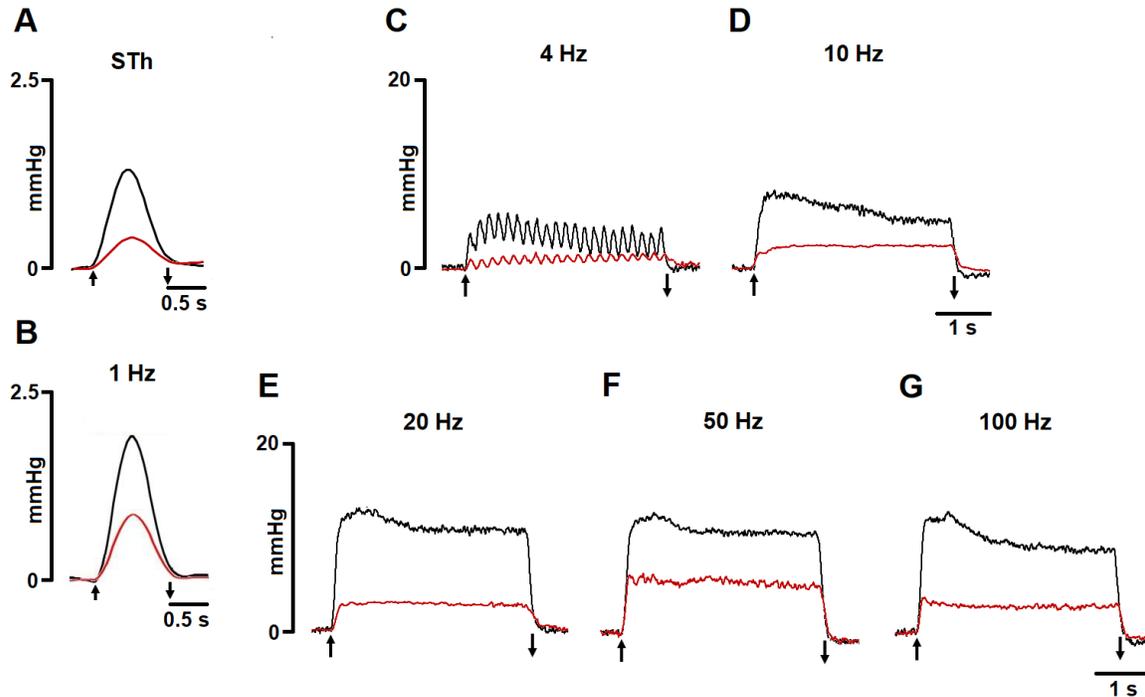
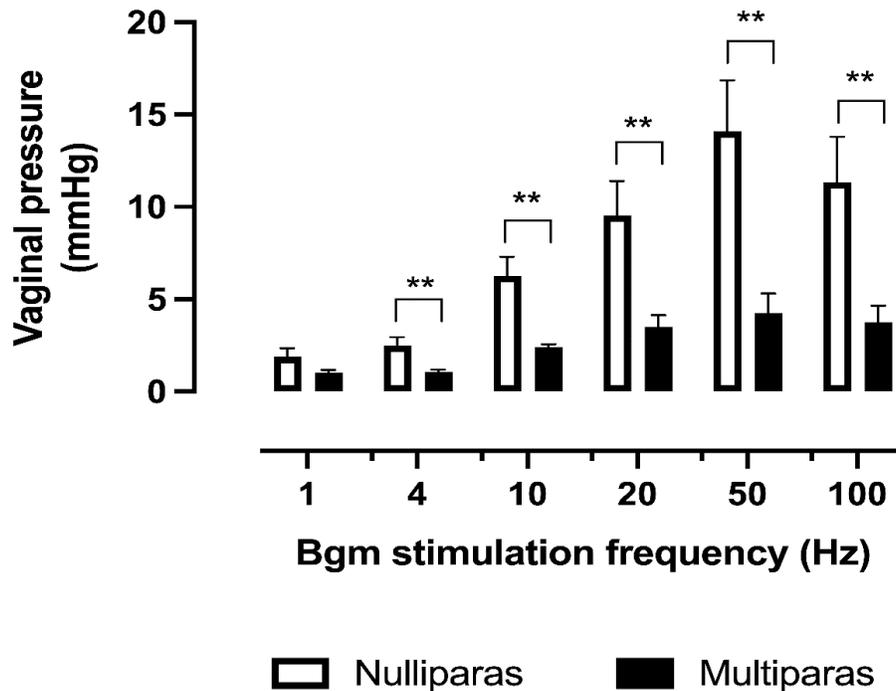


Figura 3. La multiparidad disminuye la presión vaginal generada durante la estimulación eléctrica del mBg en la coneja. Se muestran los registros representativos de la PV generada durante la aplicación de pulsos eléctricos cuadrados simples (A, B) y trenes de estimulación de frecuencia ascendente (C-G) al mBg de hembras nulíparas (trazos negros) y múltiparas (trazos rojos). Duración del estímulo: 1 s (A, B), 4 s (C-G). *mmHg*, milímetros de mercurio; *Hz*, hertz; *s*, segundos, *n*=6 por grupo. Las flechas indican el periodo de estimulación.

La PV de hembras nulíparas y múltiparas incremento como respuesta a la estimulación eléctrica del mBg de manera dependiente de la frecuencia (Gráfica 2). Al estimular a 1 Hz, la PV entre hembras nulíparas y múltiparas no cambio. La multiparidad disminuyo significativamente la PV generada durante la estimulación del mBg a 4 Hz (1.06 ± 0.13 vs. 2.49 ± 0.47 mmHg; $t_6 = 2.944$, $P = 0.014$), 10 Hz (2.41 ± 0.15 vs. 6.25 ± 1.05 mmHg; $t_6 = 3.633$, $P = 0.004$), 20 Hz (3.52 ± 0.61 vs. 9.54 ± 1.85 mmHg; $t_6 = 3.092$, $P = 0.011$), 50 Hz (4.26 ± 1.05 vs. 14.08 ± 2.78 mmHg; $t_6 = 3.308$, $P = 0.007$) y 100 Hz (3.77 ± 0.88 vs. 11.35 ± 2.44 mmHg; $t_6 = 2.915$, $P = 0.015$).



Gráfica 2. La presión vaginal en hembras nulíparas y múltíparas es producida por la estimulación eléctrica del mBg. Los datos son promedio \pm error estándar, n=6 por grupo. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos se evaluaron con una prueba t de Student no apareada de dos colas. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Hz, Hertz; mmHg, milímetros de mercurio.

4. DISCUSIÓN

Nuestros hallazgos muestran que la multiparidad disminuye el peso y ancho del mBg y afecta el incremento de la presión intrauretral e intravaginal. El bajo peso del mBg obtenido en las hembras múltíparas concuerda con reportes previos sobre daño muscular en conejas múltíparas y primíparas (López-García y cols. 2017, Sánchez-García y cols. 2019). El daño y la regeneración de la musculatura estriada pélvica y perineal son diferentes. Esto podría depender de la localización anatómica, la composición del tipo de fibras y el esfuerzo muscular de cada musculo durante el parto (López-García y cols. 2014). Se ha demostrado una reducción

significativa en el peso de los músculos mBe y mPc dos meses después del cuarto parto, coincidiendo con afectaciones en sus propiedades contráctiles (Fajardo y cols. 2008). Para el mBg y mBe, la disminución de la masa muscular puede ser indicativo de lesión miogénica. Debido a que ambos músculos se sitúan ventral a la vagina (Martínez-Gómez y cols. 1997) incrementando la posibilidad de lesión durante el parto. De manera que el paso de los fetos durante el parto puede distender el conducto vaginal y por ende al mBg. Este evento podría provocar la sobredistensión de sus fibras musculares e incluso llegar a su ruptura (Xelhuantzi y cols. 2014). Un mBg delgado con una masa baja puede afectar su contribución en la generación de PU y PV en conejas multíparas. Por lo tanto, los signos histopatológicos de lesión del mBg deben abordarse más a fondo en estudios posteriores.

Diversos estudios en coneja han demostrado la contribución de varios músculos estriados del piso pélvico, incluyendo el mBg en la generación de la PU (Rajasekaran y cols. 2012, Corona-Quintanilla y cols. 2014, Corona-Quintanilla y cols. 2016, Rajasekaran y cols. 2019). En este estudio se observó que la contracción del mBg presiona el plexo venoso contra las paredes de la uretra y la vagina incrementando la PIU. Considerando la activación refleja sincrónica de los MPP en la micción. Los resultados previamente publicados muestran que el mBg presenta actividad tónica específicamente durante la fase de almacenamiento de la orina (Corona-Quintanilla y cols. 2016). Por lo tanto, el arreglo anatómico de las fibras del mBg rodeando la uretra distal y la vagina pélvica, la habilidad de su contracción para incrementar la PIU y la relevancia de su actividad para la continencia urinaria fortalece la idea de que el mBg actúa como un esfínter (Corona-Quintanilla y cols. 2016). Además del mBg, el mPc también participa en la continencia urinaria e incrementa la presión en la vagina pélvica, donde desemboca la uretra contribuyendo a mantener la PIU durante el almacenamiento de la orina (Martínez-Gómez y cols. 1997). Asimismo, se ha demostrado que la estimulación eléctrica del músculo puborectalis (coccígeo) incrementa la presión en el canal: anal, vaginal y uretral. Esto sugiere que la contracción del mBg, mPc y puborectalis contribuyen fundamentalmente en la generación de la PU durante el almacenamiento de la orina en la coneja (Rajasekaran y cols. 2012).

En el presente estudio, los trenes de estimulación aplicados al mBg de conejas multíparas excepto el de 1 Hz, resultó en presiones uretrales más bajas que en nulíparas. No es claro si la

disminución de la PU es resultado de una fuerza contráctil menor debido a que por la disposición anatómica del mBg no se logró registrar en este estudio. De hecho, encontramos una PU menor en conejas múltiparas durante la estimulación eléctrica del mBg con frecuencias de 4-100 Hz. La PU más alta se midió entre 50 y 100 Hz y disminuyó ~40% debido a la multiparidad. Por el contrario, el umbral de estimulación para una sola contracción no cambió. Además, de la contracción del mBg, la composición uretral también puede influir en la medición de la presión. Utilizando el modelo de la coneja, se informó que la multiparidad reduce significativamente el contenido de colágeno, vasos sanguíneos y musculatura estriada de la capa externa de la uretra. Además, los límites entre la lámina propia, submucosa y la capa de musculatura lisa es indistinguible. Incluso el grosor del epitelio es más delgado y el número y longitud de pliegues epiteliales es menor (Xelhuanzi y cols. 2014, Rajasekaran y cols. 2021).

Por otra parte, las respuestas contráctiles están relacionadas con la composición del tipo de fibras musculares. Una alta proporción de fibras rápidas (tipo IIa/IIc) han sido descritas para el esfínter uretral de la rata (Buffini y cols. 2010) y la cordera (Rodríguez-Veiga y cols. 2005). En coneja, la disminución de las fibras musculares tipo 2 (rápidas) y/o conversión de fibras tipo 2 a tipo 1 (lentas) en el esfínter externo de la uretra de conejas múltiparas maduras podría contribuir en la disminución de la PU provocando un cierre inadecuado durante la continencia urinaria (Tokunaka y cols. 1993). Estos hallazgos concuerdan con la reducción de la presión de cierre uretral durante el reflejo de micción debido a la multiparidad y la edad (Corona-Quintanilla y cols. 2016, Corona-Quintanilla y cols. 2020). Es importante destacar que nuestros resultados coinciden con estudios clínicos publicados que indican que la multiparidad afecta la PIU e involucra la vasculatura (Rajasekaran y cols. 2012, Lone y cols. 2014) y la musculatura lisa y estriada (Kwon y cols. 2019, Sheng y cols. 2020).

Las fibras estriadas del mBg que rodean la uretra distal y la vagina pélvica de la coneja se asemeja a un esfínter uretrovaginal descrito en la mujer (Oelrich 1983, Xelhuanzi y cols. 2014). Este músculo actúa como un esfínter de la uretra y la vagina (Oelrich 1983, Haab y cols. 2001, Drake y cols. 2005, Hinata y Murakami 2014). Así, la contracción del mBg junto con otros músculos estriados como el Be, Isc, mPcy puborectalis contribuyen en la generación de la PV (López-Juárez y cols. 2017, Rajasekaran y cols. 2019). Sin embargo, sólo la contracción del músculo pubococcígeo y Bg (mostrado en este estudio) elevan la presión a nivel de la vagina

pélvica. La PV generada sobre las diferentes regiones de la vagina está directamente relacionado con la posición anatómica de los músculos estriados pélvicos y perineales (López-Juárez y cols. 2017).

La génesis de la PV durante la estimulación eléctrica del mBg a diferentes frecuencias disminuyó significativamente por la multiparidad. Tal efecto concuerda con los datos reportados para el músculo pubococcígeo cuando se estimuló a frecuencias entre 1 y 10 Hz en conejas multíparas. Por el contrario, durante la estimulación del músculo pubococcígeo a frecuencias altas o iguales a 50 Hz elevan la PV ~2 veces más en las conejas multíparas que en las nulíparas (López-Juárez y cols. 2017). En general, nuestros hallazgos sugieren que el rol del músculo pubococcígeo es más relevante que el mBg para la génesis de la PV en conejas multíparas. Sin embargo, la relación anatómica entre el mBg, el plexo venoso y la uretra implican un examen más profundo de los cambios vasculares que afectan la micción y la función sexual. Si los presentes hallazgos pueden explicarse en términos de fatiga muscular no evaluados en este estudio debido a las dificultades técnicas mencionadas anteriormente, podría también estar asociados con reducciones significativas en el grosor de la capa epitelial y el contenido de vasos sanguíneos (Rajasekaran y cols. 2012). En ovejas, la multiparidad, en mayor medida la primiparidad, modifica la estructura y función de la vagina afectando el grosor de la pared vaginal, el contenido muscular, las fibras de elastina y la presión (Emmerson y cols. 2017). Sorprendentemente, las alteraciones en la vagina de ovejas multíparas se consideran indicadores potenciales de otros desordenes pélvicos, como el prolapso de órganos pélvicos (Emmerson y cols. 2017, Young y cols. 2017).

Estos hallazgos indican que la multiparidad es asociada con cambios en la morfología y en las características funcionales de los músculos estriados pélvicos y perineales adyacentes al tracto urogenital de la coneja. Algunos de estos cambios se atribuyen a las fluctuaciones hormonales relacionadas con la experiencia reproductiva, el estiramiento de las fibras musculares o al aplastamiento de los nervios durante el parto (Martínez-Gómez y cols. 2011, López-García y cols. 2013, López-García y cols. 2013, Castelán y cols. 2018). Una limitación importante en nuestro estudio fue que la fragilidad del mBg que dificultó la medición de su fuerza contráctil en conejas nulíparas y multíparas. No obstante, los presentes hallazgos

fortalecen el papel de la activación coordinada de la musculatura estriada del piso pélvico en la micción.

Nuestros resultados demuestran que la multiparidad afecta la contracción del mBg para generar PU y con otros músculos del piso pélvico, la PV. La disminución de la presión puede producir un cierre uretral inadecuado durante la continencia urinaria afectando la función esfintérica.

5. CONCLUSIÓN

La multiparidad disminuye la génesis de las presiones uretrales y vaginales durante la estimulación eléctrica del mBg.

Reproductive Sciences (2023) 30:3379–3387
<https://doi.org/10.1007/s43032-023-01263-3>

GENERAL GYNECOLOGY: ORIGINAL ARTICLE



Multiparity Reduces Urethral and Vaginal Pressures Following the Bulboglandularis Muscle Stimulation in Rabbits

Cecilia Hernández-Bonilla¹ · Diego Zacapa¹ · René Zempoalteca² · Dora Luz Corona-Quintanilla² · Francisco Castelán^{2,3} · Margarita Martínez-Gómez^{2,3}

Received: 13 January 2023 / Accepted: 8 May 2023 / Published online: 5 June 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

Unlike male mammals showing a well-delimited external urethral sphincter, female mammals have urogenital sphincters shaped by muscles like the urethrovaginal sphincter. Childbirth-related injuries affect morphometry and function of urogenital sphincters in women, which frequently underlies pelvic floor disorders, including stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse. The bulboglandularis muscle (Bgm) seems to shape a urogenital sphincter in rabbits. We determined herein the effect of multiparity on urethral and vaginal pressures generated by the Bgm stimulation in age-matched nulliparous and multiparous chinchilla-breed rabbits to stimulate the Bgm with trains of ascending frequencies (from 1 to 100 Hz; 4 s duration each). Subsequently, the Bgm was excised, measured in width, and weighed. Significant differences ($P \leq 0.05$) were determined with Mann-Whitney *U* or Student *t*-tests or repeated measures two-way ANOVA followed by Tukey tests. Spearman's partial coefficients were calculated to investigate the correlation between the highest pressure (urethral or vaginal) and the Bgm width. Multiparity reduced the weight and the width in the Bgm origin and medial regions. Urethral and vaginal pressures increased in response to the electrical stimulation of Bgm with frequencies from 20 to 100 Hz. Multiparas showed significant reductions in both types of pressures. We detected a strong correlation (conditioned by multiparity) between the medial Bgm width and the highest vaginal pressure. Our present findings demonstrate that multiparity impairs the function of Bgm, resulting in diminished urethral and vaginal pressures. Furthermore, the significant narrowness of the Bgm was correlated with the vaginal pressure recorded.



Chapter 3

Basic Protocols for the Study of Maternal Behavior in Rabbits

Mario Caba, Margarita Martínez-Gómez, Cecilia Hernández Bonilla, Kurt L. Hoffman, and Angel I. Melo

Abstract

Maternal behavior in rabbits is unusual among mammals. During pregnancy, the doe builds a nest and after parturition the only maternal behavior displayed is crouching over the litter to nurse the pups. More remarkably is that the nursing visit of the mother occurs just once a day with a periodicity of slightly less than 24 h. This visit lasts less than 5 min and during that time the doe does not lick or retrieve her pups. Immediately after nursing, the mother jumps out of the nest and does not return for another 24 h. In this chapter, we will briefly describe the different components of maternal behavior in rabbits and some basic protocols for studying both nest-building behavior and nursing under laboratory conditions. We describe protocols comprising the following: (1) nest-building behaviors and systemic and central administration of hormones to experimentally induce them; (2) two different protocols for recording and analyzing maternal behavior during parturition and during the postpartum period; and (3) induction of maternal responsiveness by anosmia, induced by lesioning the accessory olfactory bulb and intranasal infusion of zinc sulfate.

CONGRESOS INTERNACIONALES Y NACIONALES



[Print this Page for Your Records](#)

[Close Window](#)

Control/Tracking Number: 2022-S-11472-SfN

Activity: Scientific Abstract

Current Date/Time: 8/29/2022 11:57:18 AM

Neuromodulation of the pelvic floor muscles increase urethral and vaginal pressure in the female rabbit

AUTHOR BLOCK: *C. HERNÁNDEZ BONILLA¹, D. A. ZACAPA¹, R. ZEMPOALTECA², D. L. CORONA QUINTANILLA², F. CASTELÁN³, M. I. ROMERO-ORTEGA⁴, M. MARTÍNEZ GÓMEZ³;

¹Univ. Autónoma de Tlaxcala, Doctorado en Ciencias Biológicas, Tlaxcala, Mexico; ²Ctr. Tlaxcala de Biología de la Conducta, Univ. Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico; ³Dept. de Biología Celular y Fisiología, Inst. de Investigaciones Biomédicas, Univ. Nacional Autónoma de México, México, México; ⁴Bioengineering and Biomed. Sci., Univ. of Houston, Houston, TX

Abstract:

Urinary incontinence (UI) is a major public health condition that negatively affects the quality of life of millions of people globally, and with great cost to society. In Overactive Bladder or Urge Urinary Incontinence Neuromodulation of the sacral S2-4 nerve branches, or the tibial nerve are considered as viable therapies. However, these treatments are not effective for stress urinary incontinence (SUI), a condition associated with partial nerve damage and muscle weakness in the pelvic and perineal muscles. We have previously reported that acute pelvic floor muscle neuromodulation (PFMN) increases the bladder capacity in old multiparous rabbits, an accepted SUI model. As these muscles serve as secondary sphincters, we reasoned that will increase the urethral and vaginal pressure of female rabbits. This hypothesis was tested in 18 nulliparous Chinchilla-breed female rabbits randomly distributed into three groups of six animals each for electrical stimulation of the following targets: 1) bulbospongiosus nerve (Bsn), isquiocavernosus nerve (Isn) and the clitoral nerve as non-specific control (Cln). Silver hook electrodes were used to stimulate the exposed target nerves and the muscle contraction threshold current was determined. Electromyograms, muscle contractile force, and urethral and vaginal pressure were recorded. Neuromodulation was applied as trains of bipolar electrical pulses ranging from 1-80 Hz with a duration of 4 seconds each. At low frequencies (20-30 Hz) muscle contraction achieved activation without fatigue. At 40-60 Hz a maximum increase in urethra and vaginal pressure was observed (0.33 ± 0.11 and 3.24 ± 1.84 mmHg, respectively). Stimulation of the Isn resulted mild increase in urethral (0.40 ± 0.04 mmHg) but significant increase in vaginal (2.56 ± 0.29 mmHg) pressure. The data supports the notion that pelvic floor neuromodulation assist in urethral closure and improves continence in SUI and may be beneficial in other pelvic floor disorders.

Author Disclosure Information:

C. Hernández Bonilla: None. **D.A. Zacapa:** None. **R. Zempoalteca:** None. **D.L. Corona Quintanilla:** None. **F. Castelán:** None. **M.I. Romero-Ortega:** Other; Shareholder of Regenerative Bioelectronics Inc. (RBI Medical), a company that has commercial interest in neuromodulation of the PFM. **M. Martínez Gómez:** None.

Presentation Preference (Complete): Poster Only

Linking Group (Complete): None selected

Theme and Topic (Complete): E.09.c. Motor unit recordings, kinematics, and EMG

Nanosymposium Information (Complete):

Keyword (Complete): ELECTRICAL STIMULATION ; NERVE ; MUSCLE

Support (Complete):

Support: Yes

Grant/Other Support: : CONACyT Grant 628536 (CHB)

Grant/Other Support: : CONACyT Grant 732830 (DAZL)

Grant/Other Support: : NIH Grant 1R01DK20307-01

Special Requests (Complete):

How do you plan to participate in Neuroscience 2022?: In-Person Only

Religious Conflict?: No Religious Conflict

Additional Conflict?: No

Is the presenting author of this abstract a high school or undergraduate student?: None

Status: Finalized



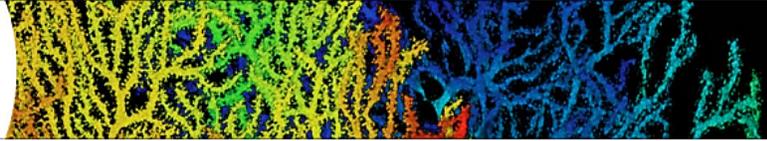
Copyright © 2022 Society for Neuroscience

Stay Connected





Neuroscience
2022



Control/Tracking Number: 2022-S-6142-SFN
Activity: Scientific Abstract
Current Date/Time: 6/16/2022 1:59:25 PM

Effects of bulbospongiosus wireless electrical stimulation on urodynamic characteristics of old multiparous rabbits

AUTHOR BLOCK: *D. A. ZACAPA¹, C. HERNÁNDEZ-BONILLA¹, D. L. CORONA-QUINTANILLA¹, O. SÁNCHEZ-GARCÍA², F. CASTELÁN³, M. MARTÍNEZ-GÓMEZ³, M. I. ROMERO-ORTEGA⁴;

¹Ctr. Tlaxcala de Biología de la Conducta, ²Facultad de Ciencias de la Salud, Univ. Autónoma De Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico; ³Inst. de Investigaciones Biomedicas, UNAM, Tlaxcala, Mexico; ⁴Bioengineering and Biomed. Sci., Univ. of Houston, Houston, TX

Abstract:

Multiparity and aging are physiological events that are recognized like some of the relevant factors of urinary disorders. Therapy as the electrical stimulation has been evaluated to stress urinary incontinence, but the intravaginal devices used to generate a mass contraction of all the pelvic floor muscles by a transcutaneous way and the results show a low efficiency on bladder modulation. The aim of this study was to evaluate the effect of wireless electrical stimulation on urodynamic characteristics in a model of old multiparous rabbits. The rabbits (n=5) were implanted with a miniature wireless electrode (OM+NClip) on right bulbospongiosus nerve (Bsn). Another old multiparous rabbit (n=5) was enrolled as a sham surgery (ShOM). After 2 weeks of recovery, 4 weeks of wireless electrical stimulation were performed on all groups. At the end of stimulation protocol, we recorded cystometry (CMG) in all animals and calculated voiding volume (Vv), volumetric intermicturition interval (Vii), threshold voiding volume (ThVv), residual volume (Rv) and voiding efficiency (Ve). Results of the CMG variables show that Vv in ShOM was 2.72 ± 0.57 ml, while in OM+NClip was 8.23 ± 1.28 ml (averages \pm ee). For Vii the results in ShOM was 5.06 ± 1.03 ml, and 11.14 ± 1.99 ml for OM+NClip group. The rest of the parameters did not show statistic differences between groups. These result suggest that unilateral wireless electrical stimulation of bulbospongiosus muscle through its specific nerve improves urinary bladder capacity probably by a strongest and longest contraction of bulbospongiosus muscle that reinforces urinary continence without apparent effect on voiding efficiency. More studies are required to assess the effects on other CMG's parameters and consequences of NClip implant in nerve tissue organization.

Author Disclosure Information:

D.A. Zacapa: None. C. Hernández-Bonilla: None. D.L. Corona-Quintanilla: None. O. Sánchez-García: None. F. Castelán: None. M. Martínez-Gómez: None. M.I. Romero-Ortega: None.

Presentation Preference (Complete): Poster Only

Linking Group (Complete): None selected

Theme and Topic (Complete): E.09.b. Motor neurons – Development, identification, intrinsic properties, and modulation; E.09.d. Motoneuron-muscle interface and muscle physiology/biochemistry

Nanosymposium Information (Complete):

Keyword (Complete): MUSCLE; ELECTRICAL STIMULATION; BLADDER

Support (Complete):

Support: Yes

Grant/Other Support: CONACyT Grant 732830 (DAZL)

Grant/Other Support: CONACyT Grant 628536 (CHB)

Grant/Other Support: NIH Grant 1R01DK20307-01

Special Requests (Complete):

How do you plan to participate in Neuroscience 2022?: In-Person Only

Religious Conflict?: No Religious Conflict

Additional Conflict?: No

Is the presenting author of this abstract a high school or undergraduate student?: None

Status: Finalized



Copyright © 2022 Society for Neuroscience

Stay Connected



cOASIS Technical Support | Monday - Friday, 9 am - 5 pm CT | Phone: 1-217-398-1792 | Email: cOASIS_Heliodesk



[Print this Page for Your Records](#)

[Close Window](#)

Control/Tracking Number: 2019-S-13510-SfN

Activity: Scientific Abstract

Current Date/Time: 7/23/2019 11:42:48 PM

Effect of multiparity on the force generated by the obturator internus and bulboglandularis muscles in the vagina and urethra of the female rabbit

AUTHOR BLOCK: *C. HERNÁNDEZ BONILLA¹, R. ZEMPOALTECA², D. L. CORONA QUINTANILLA², F. CASTELÁN³, M. MARTÍNEZ GÓMEZ³;

¹Ctr. Tlaxcala Biología de la Conducta, Univ. Autónoma De Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico; ²Ctr. Tlaxcala Biología de la Conducta, Univ. Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico; ³Inst. de Investigaciones Biomedicas, Univ. Nacional Autónoma de México, México, Mexico

Abstract:

The parturition is a mechanical and hormonal event, which has been linked to alterations in the pelvic floor muscles and its innervation. Studies in female rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) have showed that the multiparity modifies fiber type composition and the contractile properties of pelvic floor muscles, affecting the genesis of vaginal pressure. However, there are other striated muscles anatomically related to the pelvic vagina and urethra as the obturator internus (OI) and bulboglandularis (Bg) muscles that could be damaged by the effect of multiparity. The aim of this study was to evaluate in young nulliparous and young multiparous rabbits, the contractile force in isometric conditions and the pressure generated on the pelvic vagina and urethra by OI and Bg muscles. Twenty-four Chinchilla-breed female rabbits (11-12 months old) were used in this study. Animals were divided in two groups: young virgin nulliparous (n=12) and young multiparous (n=12). Each condition (nulliparous and multiparous) was randomly distributed into two experimental groups. In the first group, was evaluated the pelvic intravaginal pressure (IVP) and intraurethral pressure (IUP) generated by the contraction of the OI and Bg muscles (n=6 per group). The second group was evaluated contractile force developed by OI muscle (n=6 per group). We observed contraction of the OI muscle at 100 Hz, this contraction generated a high IVP in nulliparous females and low in multiparous. The IUP generated by the contraction of OI muscle did not show significant differences between groups. During the contraction of Bg muscle at 100 Hz, the IVP generated was greater in female nulliparous respect to multiparous. The IUP generated by the contraction of the Bg muscle in nulliparous females was greater in comparison to multiparous. The contractile force generated by OI muscle did not show significant differences between groups and the Bg was not possible registered. The results showed that the OI and Bg muscles contribute in a differential way to the generation of IVP and IUP. Likewise, the multiparity affects muscles differently because the contractile properties of the OI muscle were unchanged. This in turn, could modify reproductive and non-reproductive processes.

:

Presentation Preference (Complete): Poster Only

Linking Group (Complete): None selected

Theme and Topic (Complete): E.09.d. Motorneuron-muscle interface and muscle physiology/biochemistry ; F.07.b. Gastrointestinal/ renal/urinary/ and reproductive regulation

Nanosymposium Information (Complete):

Grant/Other Support : PAPIIT-UNAM IN212916 (MMG)

Grant/Other Support : CONACyT 628536 (CHB)



5º CONGRESO INTERNACIONAL ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE PISO PÉLVICO

CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN



CERTIFICO QUE EL TRABAJO TITULADO

Evaluación de la fuerza generada por los músculos obturador interno y
bulboglandular en la vagina y la uretra de la coneja múltipara.

Ha sido presentado en formato Poster por

Margarita Martínez Gómez
Cecilia Hernández Bonilla
René Zempoalteca Ramírez
Dora Luz Corona Quintanilla
Francisco Castelán

en el
5o Congreso Internacional ALAPP 2020
celebrado en
Cartagena, Colombia, del 4 al 7 de marzo de 2020

Dra. Simone Botelho
Presidenta del Comité Científico

Dr. Alejandro Tarazona
Presidente de ALAPP

Dr. Carlos Díaz Támara
Presidente del 5to Congreso
Internacional ALAPP



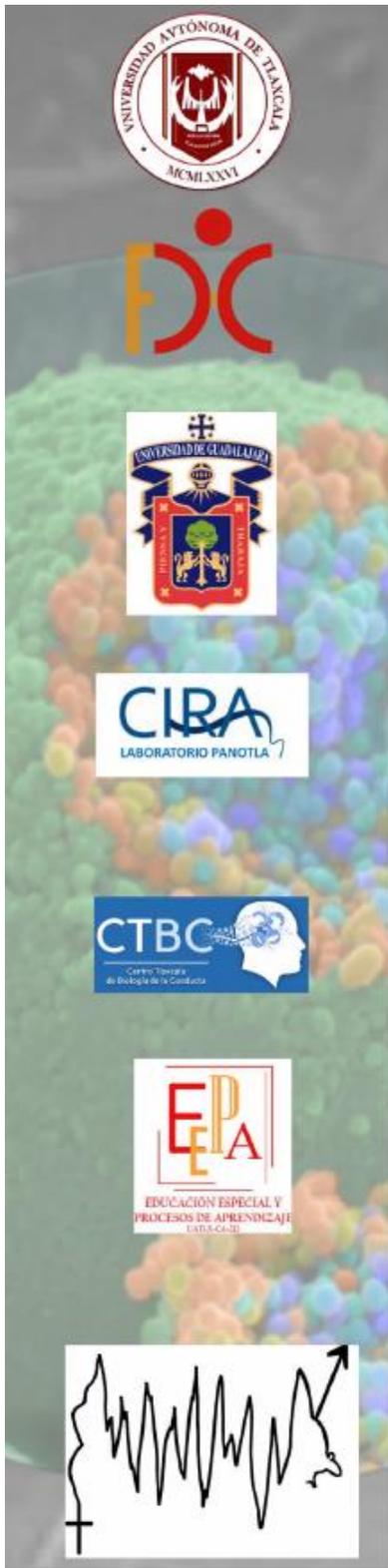
Presión uretral y vaginal generada durante la estimulación eléctrica del nervio Bulboesponjoso de la coneja nulípara

Hernández Bonilla, C., Zacapa López, D. A., Zempoalteca Ramírez, R., Corona-Quintanilla, D. L., Castelán, F., Romero-Ortega, M. y Martínez-Gómez, M.

Universidad Autónoma de Tlaxcala

Palabras clave: Incontinencia urinaria, músculos pélvicos, músculos perineales.

La incontinencia urinaria (IU) femenina es un problema de salud pública importante que afecta la calidad de vida del paciente y representa un alto costo para la sociedad. En relación a ello, se han desarrollado nuevos tratamientos como la estimulación eléctrica. Este tratamiento ha cobrado una enorme relevancia como una terapia alternativa a las tradicionales (fisioterapéuticas, farmacológicas y quirúrgicas). Sin embargo, su impacto terapéutico en la práctica clínica ha sido limitado. Esto puede deberse a la naturaleza no específica del tratamiento, como la estimulación eléctrica de las raíces sacras (S3) y del nervio pudendo que provee inervación a la vejiga urinaria, uretra, musculatura estriada pélvica y perineal, piel perigenital y clítoris. Además de las variaciones respecto al origen y curso de los nervios hace que la aplicación de la terapia sea incierta y difícil de estandarizar. Por lo tanto, se requiere desarrollar nuevos tratamientos de estimulación eléctrica específica para mejorar los síntomas relacionados a la IU y fortalecer los músculos pélvicos y perineales, como el Bulboesponjoso (Bs) que contribuyen al cierre uretral. Por lo tanto, en este estudio se evaluó el efecto de la estimulación eléctrica del nervio Bs sobre la presión uretral y vaginal de la coneja nulípara. Para ello, se aplicó estimulación eléctrica al nervio Bs y se obtuvieron registros simultáneos de actividad electromiográfica (EMG) del músculo Bs, la presión que genera sobre la uretra y la vagina. También se aplicó estimulación



eléctrica al nervio Clitoral (CI) como control no específico. Se aplicaron pulsos cuadrados de corriente de intensidad graduada (mA) a distintas frecuencias de estimulación (1, 30, 50 y 80 Hz con una duración de 4 segundos). Los resultados mostraron que el umbral de corriente eléctrica del nervio Bs es de 0.52 ± 0.02 mA y del nervio CI es de 0.78 ± 0.16 mA. La presión uretral generada durante la estimulación de eléctrica del nervio Bs a 80 Hz fue de 2.20 ± 0.26 mmHg y al estimular al nervio CI se registró una presión uretral de 1.80 ± 1.17 mmHg. Respecto a la presión vaginal, la estimulación eléctrica del nervio Bs a 80 Hz generó una presión máxima de 17.25 ± 4.80 mmHg y al estimular el nervio CI se registró una presión vaginal de 3.99 ± 2 mmHg. Durante la estimulación a 1 y 30 Hz, la respuesta del músculo Bs siguió la frecuencia de estimulación, pero a partir de las frecuencias de 50 y 80 Hz se observó la tetanización de las fibras musculares. Este estudio proporciona información útil para determinar los parámetros óptimos de estimulación eléctrica (umbral de estimulación y frecuencia) del nervio Bs con el fin de desarrollar un nuevo tratamiento de estimulación eléctrica específica para la IU.

CONACyT 628536 (CHB)
NIH 1 R01 DK120307-01



Participación de los músculos Pubococcígeo y Bulboesponjoso sobre la presión vaginal y uretral de la coneja joven nulípara

Zacapa López, D. A., Hernández-Bonilla, C., Zempoalteca-Ramírez, R., Corona-Quintanilla, D. L., Castelán, F., Romero-Ortega, M. y Martínez -Gómez, M.

Universidad Autónoma de Tlaxcala

Palabras clave: Pubococcígeo, Bulboesponjoso, presión vaginal, presión uretral, estimulación nerviosa.

Los músculos del piso pélvico (MPP) brindan soporte estructural a las vísceras del aparato urogenital en humanos. La disfunción de los MPP se asocia con alteraciones del aparato genitourinario como prolapso de vísceras pélvicas e incontinencia urinaria de esfuerzo. Uno de los modelos válidos para el estudio de estas patologías es la coneja doméstica debido a que presentan músculos perineales y pélvicos bien diferenciados que se asemejan a los del humano. En la coneja los músculos bulboesponjoso (MBs) y pubococcígeos (MPc) contribuyen en la micción y la presión vaginal. Sin embargo, no se han realizado estudios que indiquen de manera específica, la participación de cada uno de estos músculos sobre la presión uretral y vaginal. El objetivo de este estudio fue describir la participación de los MBs y MPc sobre la presión uretral y vaginal en un modelo de coneja nulípara. Se utilizaron 5 conejas hembras de ~12 meses de edad. Bajo anestesia general se insertó un catéter rígido de 1.7mm de diámetro con punta de balón a través del domo de la vejiga urinaria hasta alcanzar la vagina perineal y posteriormente hasta la uretra, se llenó con 1 ml de solución salina al 0.9%. Se disecó el MPc unilateral y su nervio ipsilateral. El nervio se montó sobre un par de electrodos de plata de 0.2 mm de diámetro conectados a una unidad de estimulación eléctrica de corriente variable Isoflex. Se estimuló eléctricamente (1Hz, 1ms de duración) en forma ascendente para encontrar el umbral de estimulación



TL18-19-2021

Characterization of the parameters of stimulation to activate the pelvic floor nerves of the female rabbit

Cecilia Hernández-Bonilla¹, Diego A. Zacapa-López¹, René Zempoalteca-Ramírez², Dora L. Corona-Quintanilla², Francisco Castelán^{2,3}, Mario Romero-Ortega⁴, Margarita Martínez-Gómez^{2,3}.

¹Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México, ²Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México, ³Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlaxcala, México.

⁴Department of Biomedical Engineering, University of Houston, Houston, Texas.

Background/Objectives: Female stress urinary incontinence (SUI) is a public health problem that negatively affects patients' quality of life and imposes a high cost to society. Damage to pelvic floor muscles and nerves has been linked to SUI. Neuromodulation of target pelvic floor muscles through electrical stimulation (ES) of the associated nerves is a potential treatment for SUI. The aim of this study was to determine the ES parameters of two specific pelvic floor nerves: bulbospongiosus nerve (Bsn) and isquiocavernosus nerve (Isn), required to generate an optimal contractile response in the associated muscles of female rabbits.

Methods: The electrical stimulation parameters of the Bsn and Isn during the urethral and vaginal pressure, contractile force, and electromyograms of the Bsn and Isn muscles. The electrical stimulus were trains of electrical pulses, with frequencies of 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80 Hz, and duration of 4 seconds each one.

Results: The low frequency stimulus (1, 5, 10, 20 and 30 Hz) provoked a single contractile response in perineal muscles, following the frequency of stimulation applied. At 20 and 30 Hz the responses began to fuse without muscle fatigue. During the applying of 40-80 Hz, the perineal muscle showed fatigue. The electrical stimulation of the Bsn generated a maximum urethral (0.88 ± 0.42 mmHg) and a vaginal pressure (6.32 ± 3.54 mmHg). While the Isn generated a minor urethral (0.40 ± 0.04 mmHg) and vaginal pressure (2.56 ± 0.29 mmHg). The contractile force generated by isquiocavernosus muscle (24.23 ± 5.09 grams) was similar to bulbospongiosus muscle (25.80 ± 5.73 grams).

Conclusions: Both nerves low frequencies (20 and 30 Hz) generate an increase of urethral and vaginal pressure, without muscle fatigue. It is possible that the increase in urethral pressure produced by both nerves helps urethral closure during urinary continence.

Funding Source(s): CONACyT 628536 (CHB) - NIH 1 R01 DK120307-01

69

Force generated by the obturator internus and rhabdosphincter muscles on vagina and urethra: effect of multiparity in the model of female rabbit

Cecilia Hernández-Bonilla^{1,2}, Rhode López-Juárez^{1,2}, René Zempoalteca-Ramírez¹, Dora Luz Corona-Quintanilla¹, Francisco Castelán^{1,3}, Margarita Martínez-Gómez^{1,3}

Centro Tlaxcala Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, México, UAT-UNAM¹, Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, México, UAT-UNAM², Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma México, México-DF, UNAM³.

Multiparity is considered as the reproductive experience that includes at least two episodes of mating, pregnancy, parturition and lactation. The parturition is a mechanical and hormonal event, which has been linked to alterations in the lower urogenital tract, the pelvic floor muscles, and its innervation. Thus, multiparity has effects in both the anatomy and physiology of these structures.

Studies in female rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) have showed that multiparity alters the histological characteristics of the vagina and urethra, and the activity of pelvic (pubococcygeous) and perineal (bulbospongiosus and ischiocavernosus) striated muscles during the micturition. In addition to these changes, multiparity modifies fiber type composition and the contractile properties of striated muscles affecting vaginal pressure, as well as differential damage in some pelvic and perineal striated muscles. All these changes in pelvic floor components indicate plastic adjustments and damage that may affect excretory and reproductive functions in female mammals. The striated musculature is constituted by a large amount of pelvic and perineal striated muscles, and considering the damaging effects caused by multiparity it is important to determine whether there is damage to muscles directly related to the pelvic vagina and urethra as the obturator internus (OI) and rhabdosphincter (RE), also called bulboglandularis. Therefore, it is relevant to understand the form and temporality in which each muscle contributes to the function of the urogenital tract generating pressure on the vagina and urethra, with a particular contractile force. Also, to determine if current changes are due to the effect of multiparity. The aim of this study was to evaluate, in young nulliparous and young multiparous rabbits, the contractile force in isometric conditions and the pressure generated on the pelvic vagina and urethra by the OI and the RE muscles.

Twenty-four Chinchilla-breed female rabbits (11-12 months old) were used in this study. Animals were divided in two groups: young virgin nulliparous (n=12) and young multiparous (n=12). Multiparous female rabbits started to copulate at 6 months old. On the day of the fourth delivery, neonate pups were euthanized to prevent lactation, and to give female rabbits the opportunity to reach a hormonal condition similar to the one maintained in nulliparous rabbits.

Urethane-anesthetized (1.5g/Kg) nulliparous and multiparous rabbits were fixed in a dorso-supine position. Physiological recordings were performed at 20 days subsequent to the fourth delivery. Each condition (nulliparous and multiparous) was randomly distributed into two experimental groups. In the first group, we evaluated the pelvic intravaginal pressure (IVP) and intraurethral pressure (IUP) generated by the contraction of the OI and RE muscles (n=6 per group). In the second group we evaluated the contractile force developed by the OI muscle (n=6 per group).

IVP and IUP generated by the OI and RE muscles. The urinary bladder was exposed through a midline incision in the abdomen, and by applying a slight manual pressure over the bladder urine was expelled. A deflated catheter balloon was introduced into the lumen throughout the bladder apex and pulled across the urethra and vagina until it appeared out of the vaginal opening. A cotton thread was tied to the catheter balloon and pulled inside the vaginal tract at either the pelvic-vagina level or urethra. The balloon was then filled with saline solution until the full diameter of the pelvic vagina or urethra was approximately reached. To record variations in IVP and IUP, the catheter was connected to a pressure transducer (Grass PT 300, Grass Instruments, Quincy, MA) connected to an amplifier (Grass 7DA DC). Data were displayed and stored in a PolyView Recorder 2.5 (Grass). For electrical stimulation, the OI muscle was exposed and a silver bipolar electrode was placed laterally to the muscle, and single square voltage pulses were applied through a stimulus isolation unit SIU5 (Grass Instruments, Quincy, MA) activated by a S48 stimulator (Grass). A series of stimulating pulse with frequencies of 1, 4, 10, 20, 50 and 100 Hz were applied. To determine the IVP and IUP generated by the contraction of the RE muscle, we proceeded to cut both the origin and insertion sites of the OI muscle and the same experimental protocol was performed. The IVP and IUP were expressed in mmHg.

Contractile force developed by OI muscle. The OI muscle was dissected, severed at their insertion site, and separated from the surrounding tissue under a surgical microscope. Subsequently, the tendon of the muscle was attached to an isometric force transducer (Grass, model FT03E) connected to a 7DA DC amplifier (Grass) and the response signal was sent to the program PolyView Recorder 2.5 (Grass). Muscle was stimulated electrically with a silver bipolar electrode located laterally and connected to a square pulse generator (Grass S48). Single square electrical stimuli were applied to muscle. Once the threshold was determined, the stimulus strength was gradually increased to reach the maximal muscle response. A series of stimulating pulses with frequencies of 1, 4, 10, 20, 50 and 100 Hz were applied to evoke fusion and tetanus responses in the muscle. Isometric contractile force was normalized in Newton per gram of tissue (N/g). Data were expressed as mean \pm standard error (SE). To determine significant differences ($P \leq 0.05$) between groups, unpaired Student t tests were carried out.

The results show that at 100 Hz, the contraction of the OI muscle was able to generate a greater IVP in nulliparous than in multiparous female rabbits ($P=0.009$). At the level of the urethra, the pressure generated by the OI muscle did not show significant differences between groups ($P=0.858$). During the contraction of the RE muscle at 100 Hz, the IVP generated was greater in female nulliparous when compared to multiparous rabbits ($P=0.002$). At the level of urethra, the pressure generated by the contraction of the RE muscle in nulliparous females was greater in comparison to multiparous ($P=0.0014$). The contractile force generated by the OI muscle was not significantly different between groups ($P=0.148$). These results suggest that both the OI and the RE muscles contribute in a differential way to the generation of IVP and

>

Universidad Autónoma de Tlaxcala
Tlaxcala, Tlax., México



CMi-167

Caracterización de parámetros de estimulación eléctrica de nervios específicos del piso pélvico en la coneja

¹Hernández Bonilla Cecilia (estudiante de posgrado), ²Zempoalteca René, ²Corona-Quintanilla Dora Luz, ³Romero-Ortega Mario, ^{2,4}Castelán Francisco, ^{2,4}Martínez-Gómez Margarita.

¹Doctorado en Ciencias Biológicas UATx,

²Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta UATx,

³Departamento de Bioingeniería, UDT,

⁴Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biología Celular y Fisiología UNAM,

Estudios clínicos han evaluado la eficacia de la estimulación eléctrica de raíces espinales sacra (S3) y de nervios periféricos (nervio tibial y nervio pudendo) como un tratamiento para desórdenes del piso pélvico (vejiga hiperactiva e incontinencia urinaria de esfuerzo). La estimulación eléctrica del nervio pudendo puede conducir a la contracción del esfínter uretral y de algunos músculos del piso pélvico como el isquiocarvenoso (Isc) y bulboesponjoso (Be). Sin embargo, no se ha evaluado el beneficio de la estimulación eléctrica de nervios específicos del piso pélvico para desarrollar un tratamiento más efectivo. Por lo tanto, en este estudio se caracterizaron los parámetros de estimulación eléctrica del nervio Isc y Be en conejas jóvenes nullíparas. Para ello, se obtuvieron registros electromiográficos del músculo Isc y Be durante la estimulación eléctrica de sus respectivos nervios. Inicialmente, se aplicaron pulsos únicos cuadrados de corriente (1Hz, 1 ms) al nervio Isc y Be para encontrar su umbral de estimulación. El estímulo se incrementó gradualmente hasta observar una mínima deflexión en el registro electromiográfico del músculo Isc y Be. Una vez determinado este valor se multiplicó hasta 4 veces umbral. La edad promedio de las hembras fue de 11.66 ± 0.33 meses y presentaron un peso promedio de 4.39 ± 0.13 Kg. Los datos mostraron que el valor umbral de corriente eléctrica del nervio Isc es de $1.42 \pm 0.24 \mu\text{A}$ para desencadenar una mínima deflexión en el registro electromiográfico. En cuanto al nervio Be, la respuesta es visible aplicando un mínimo de corriente de $0.41 \pm 0.19 \mu\text{A}$. Los resultados muestran que la estimulación eléctrica al nervio del Isc y del Be es diferencial. Este hallazgo proporciona información útil para desarrollar nuevos tratamientos de estimulación eléctrica en nervios específicos del piso pélvico como una opción terapéutica para desórdenes del piso pélvico.

CONACyT 628536 (CHB)

NIH 1 R01 DK120307-01



CMi-167

Parámetros óptimos de estimulación eléctrica del nervio isquiocavernoso y bulboesponjoso en conejas nulíparas y múltiparas

¹Hernández Bonilla Cecilia (Estudiante de posgrado), ²Romero-Ortega Mario, ³Zempoalteca-Ramírez René, ³Corona-Quintanilla Dora Luz, ^{3,4}Martínez-Gómez Margarita;

¹Doctorado en Ciencias Biológicas, UAT, ²Universidad de Texas, Dallas; ³Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, UAT, ⁴Departamento de Biología Celular y Fisiología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. ceci_hb14@hotmail.com.

La neuromodulación por estimulación eléctrica de raíces espinales sacra (S3) y nervios periféricos (nervio tibial y nervio pudendo) ha sido una opción terapéutica para tratar disfunciones del tracto urinario inferior. Estudios clínicos han demostrado que la estimulación eléctrica del nervio pudendo es una alternativa viable para la neuromodulación, ya que inerva a los músculos del piso pélvico y el esfínter uretral. Sin embargo, no se ha evaluado el beneficio de la estimulación eléctrica de nervios específicos del piso pélvico para lograr un tratamiento más efectivo. Por tal motivo, en este estudio agudo se determinaron los parámetros óptimos de estimulación eléctrica de los nervios isquiocavernoso (Isc) y bulboesponjoso (Be) registrando la presión vaginal en conejas anestesiadas nulíparas (Isc, n=6 y Be, n=6) y múltiparas (Isc, n=6 y Be, n=6). Para ello se registró la presión generada por la musculatura estriada sobre la vagina perineal en respuesta a la estimulación eléctrica de los nervios. De manera inicial, se aplicaron pulsos únicos cuadrados de corriente (1 Hz, 1 ms) para encontrar el valor umbral y se multiplicaron hasta 4 veces umbral. Dichos estímulos se aplicaron a varias frecuencias: 10, 20 y 50 Hz, durante 4 segundos. Los resultados preliminares obtenidos en este estudio muestran los valores a 4 umbral. Para el músculo Isc fue de $4.35 \pm 0.50 \mu\text{A}$ y para el músculo Be fue de $1.25 \pm 0.35 \mu\text{A}$. La amplitud del EMG se alcanzó a $750 \pm 353.55 \text{ mV}$ para el Isc y a $4000 \pm 1414.21 \text{ mV}$ para el Be. Esto sugiere que se requiere mayor corriente para activar al músculo Isc que al Be y podría deberse al tamaño del músculo. Estos resultados podrán contribuir al desarrollo de un tratamiento de estimulación eléctrica en nervios de los músculos del piso pélvico como una opción terapéutica para las disfunciones urinarias.

