

---

## Efectos de la denervación vegetativa selectiva en la vejiga urinaria en la rata adulta. Consecuencias en la incontinencia urinaria

J. I. Pascual<sup>1</sup>, R. Insausti<sup>2</sup>, L. M. Gonzalo<sup>2</sup>

---

### RESUMEN

Se ha estudiado en el presente trabajo la capacidad plástica del sistema nervioso periférico ante distintas agresiones en 28 ratas de la cepa Wistar, divididos en 4 grupos: 1) neurectomía simpática (n=9); 2) neurectomía parasimpática (n=9); 3) evaluación de la regeneración (n=5); 4) grupo control (n=5). Por medio de un analizador de imágenes se estudió la población de neuronas ganglionares acetilcolinesterasa (AChE) y Tiroxina Hidroxilasa (TH) positivas del ganglio pélvico (GP) así como de los ganglios de la raíz dorsal (GRD) comparados con el grupo control. En el grupo 3 se estudió además la posible plasticidad de los axones transectados mediante el empleo del neurotrazador peroxidasa conjugada a la aglutinina del trigo (WGA-HRP). El estudio estadístico se realizó por medio del análisis de la varianza (ANOVA), test de Fisher y Método Scheffé, considerando significativa una  $p < 0,05$ . Los resultados demuestran el papel predominante del nervio pélvico en la modulación de los cambios plásticos producidos a nivel ganglionar, siendo la influencia del nervio hipogástrico menor. Son precisos estudios complementarios para definir cuál es el papel específico de cada uno de ellos en el acto de la micción.

**Palabras clave:** Denervación vegetativa. Vejiga urinaria. Rata. Incontinencia.

*ANALES Sis San Navarra, 20 (1): 25-32, 1997.*

### ABSTRACT

The present work is a study of the plastic capacity of the peripheral nervous system subjected to different aggressions in the case of 28 rats of the Wistar breed. They were divided into four groups: 1) sympathetic deafness (n=9); 2) parasympathetic deafness (n=9); 3) evaluation of regeneration (n=5); 4) control group (n=5). An image analyser was used to study the acetylcholinesterase (AChE) and Tiroxine Hidroxilase (TH) positive ganglionic neurones of the pelvic ganglion (GP) as well as the dorsal ganglions (GRD) compared with the control group. With group 3 a study was also made of the possible plasticity of the transected axons using a wheat germ agglutinin conjugated-horseradish peroxidase (WGA-HRP) neurotracer. The statistical study was carried out by means of the analysis of variance (ANOVA), Fisher test and Scheffe method, with a  $p < 0.05$  taken as significant. The results show the predominant role of the pelvic nerve in the modulation of the plastic changes produced at the ganglionic level, with a lesser influence of the hypogastric nerve. Further studies are needed in order to define the specific role of each of these in the act of miction.

**Key words:** Vegetative. De-ervation, urinary tract. Rat. Incontinence.

- 
- 1 Servicio de Urología, Hospital de Navarra.  
2 Departamento de Anatomía, Universidad de Navarra.

Este trabajo ha sido realizado con una Ayuda a la Investigación del Departamento de Salud del Gobierno de Navarra del año 1991.

Aceptado para su publicación el 28 de febrero de 1997.

**Correspondencia:**  
José Ignacio Pascual  
Servicio de Urología  
Hospital de Navarra  
Irunlarrea, 3.  
31008 Pamplona  
Tfno. (948) 422100-422225

## INTRODUCCIÓN

La existencia de fibras adrenérgicas y colinérgicas que alcanzan la vejiga urinaria es conocida desde hace unos veinte años<sup>1</sup>. El origen de la inervación simpática ha sido sustancialmente aclarado en la última década por medio de estudios de transporte axonal, así como la terminación central de las aferencias sensitivas que caminan con los nervios simpáticos y parasimpáticos<sup>2,3</sup>. La distribución de las fibras postganglionares tanto adrenérgicas como colinérgicas no está tan estudiada. Por otra parte, la capacidad del sistema nervioso periférico de regenerar ante una lesión nerviosa es también conocida desde los trabajos pioneros de Ramón y Cajal. No existen antecedentes, sin embargo, de estudios en los que se haya tratado de poner de manifiesto la capacidad regenerativa del sistema nervioso autónomo, a pesar de su considerable interés. En efecto, pueden ser múltiples las causas de una disfunción autonómica tales como lesiones o malformaciones congénitas espinales. En estas circunstancias la víscera queda parcialmente denervada, y por lo tanto las fibras nerviosas restantes pueden crecer y ocupar los espacios sinápticos vacantes. La exploración de estos fenómenos en el animal de experimentación como la rata se puede llevar a cabo gracias al conocimiento de la inervación vesical que hemos conseguido en los últimos años. El desarrollo de técnicas histo e inmunohistoquímicas permite realizar una evaluación directa de las fibras nerviosas que contienen AChE como marcador colinérgico<sup>4</sup>, o de las fibras y somas neuronales inmunoreactivos para el enzima TH como marcador adrenérgico. El conjunto de estas técnicas hoy asequibles, así como el de la evaluación directa de la inervación por el transporte axonal retrógrado de WGA-HRP, permiten conocer los cambios plásticos del sistema nervioso autónomo ante lesiones nerviosas periféricas.

En el presente estudio tratamos de analizar, desde el punto de vista neuroanatómico, la inervación vesical en su doble vertiente (simpática y parasimpática), así

como los cambios plásticos que se producirían en las fibras nerviosas que inervan la vejiga tras la sección selectiva de los distintos troncos nerviosos responsables de la inervación simpática y parasimpática de la vejiga urinaria.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han empleado un total de 28 ratas macho de la cepa Wistar, procedentes del animalario del Hospital de Navarra, con un peso entre 248 y 680 g (promedio de 440 g).

La metodología del estudio se ha distribuido en los siguientes grupos:

1. Denervación Simpática: realizando neurectomía del nervio hipogástrico. En unos animales se seccionaba dicho nervio por encima del ganglio pélvico (denervación postganglionar). Otro grupo lo constituían animales en los que se aisló el ganglio mesentérico inferior de la inervación preganglionar (denervación simpática preganglionar).

2. Denervación Parasimpática: realizando secciones de las fibras nerviosas que parten del ganglio pélvico hacia la vejiga urinaria (denervación postganglionar), o alternativamente la inyección de un tóxico (ácido iboténico) en el ganglio pélvico, que destruye las neuronas ganglionares, dejando intactas las fibras de paso (adrenérgicas entre otras). La sección del nervio pélvico próximo a su origen espinal deja sin inervación preganglionar el ganglio pélvico (denervación parasimpática preganglionar).

3. Evaluación de la regeneración: por medio de técnicas de AChE se examinaba la inervación colinérgica vesical, y por medio de anticuerpos monoclonales contra el enzima TH se examinaba la inervación adrenérgica. Se analizaron varios casos de cada subgrupo experimental, dos semanas después de la intervención. Tras el mismo período, se inyectó el trazador axonal WGA-HRP en los casos de cada subgrupo, a fin de determinar la eficacia de la denervación en comparación con casos normales.

Según la neurectomía realizada, se ha dividido el estudio en 4 grupos: 1) Neurectomía simpática (9 casos); 2) Neurectomía parasimpática (9 casos); 3) Evaluación de la regeneración (5 casos); 4) Grupo control (5 casos). Bajo anestesia con Ketamina (7 mg/Kg i.m.) y Pentobarbital sódico (Nembutal<sup>®</sup>, 30 mg/Kg ip), con la ayuda de un microscopio quirúrgico (ZEISS, Mod. OMP-1) se realizó una laparotomía infraumbilical exponiendo el nervio pélvico o hipogástrico (según el grupo), procediendo a la neurectomía bilateral, previa referencia del extremo proximal del nervio, con un punto monofilamento de 9/0. Tras el cierre de la herida quirúrgica, se reintegraba al animal en su jaula hasta el momento de la inyección de los distintos neurotrazadores. De forma profiláctica se administró Amoxicilina (15 mg/Kg x PO) disuelta en el recipiente de agua.

Transcurrido el tiempo de supervivencia apropiado (14 días de promedio), se procedió al depósito de los diferentes marcadores, comprobando en los casos de neurectomía pélvica el desarrollo de una vejiga neurógena átona. Las inyecciones se realizaron con una microjeringa Hamilton de 10 µl de capacidad, con ayuda de un micromanipulador, de una cantidad variable de WGA-HRP al 1% en la pared lateral izda. vesical (5 a 10 µl), procediendo al cierre de la herida quirúrgica y reintegrando al animal en su jaula hasta el momento de la perfusión. Esta se hizo transcardíacamente en todos los animales según técnica descrita<sup>3</sup>.

Extraído el material a estudiar se procedió a su sección con un microtomo de congelación (Histolide 2000, Reichter-Jung) a un grosor de 30 µm, procesándolo según técnica de Mesulam<sup>5</sup> (WGA-HRP), técnica de Karnovsky-Roots<sup>6</sup> (AChE) o técnica inmunohistoquímica con anticuerpo específico (monoclonal de ratón, Incstar Corp., Stillwater MN, USA) y secundario biotinado (caballo anti-ratón, Vector) para la TH. El análisis del material se efectuó con un microscopio NIKON LABOPHOT y NIKON OPTIPHOT, dotados de campo oscuro y campo claro. El estu-

dio morfométrico se realizó con un analizador de imágenes MIP (Microm Image Processing).

El estudio estadístico se realizó por medio del análisis de la varianza (ANOVA), utilizando el test de Fisher (ANOVA monovariable) y el test de igualdad de medias para comparación entre grupos (Método de Scheffé), considerando significativa una  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

El diseño del modelo experimental empleado ha sido efectivo. La realización de las neurectomías no planteó problemas, salvo el grupo de neurectomías pélvicas, que presentaron una elevada tasa de mortalidad (30%), atribuida a la presencia en todos los casos de una vejiga neurógena átona que favorecía la presencia de infecciones, a pesar del tratamiento antibiótico profiláctico instaurado en estos casos.

Con el objeto de ver las diferencias morfométricas que pudieran existir entre neuronas marcadas con WGA-HRP con y sin neurectomía pélvica o hipogástrica, se realizó el análisis morfométrico de las neuronas del ganglio pélvico en 7 casos previamente recogidos en los que las inyecciones del trazador se realizaron respectivamente en fondo, cuerpo y base vesical (Figs. 1 y 2).

La neurectomía hipogástrica no produjo cambios cuantitativos significativos en la población de neuronas AChE positivas del GP, comparados con los casos controles. El patrón de inervación colinérgica en la vejiga urinaria y otras vísceras pélvicas tras neurectomía hipogástrica, no mostró cambios significativos en la densidad de fibras colinérgicas, comparados con los casos control.

El análisis morfométrico de la población TH positiva tras neurectomía hipogástrica, comparada con los controles, fue altamente significativo ( $p = 0,002$ ), lo que implica un papel modulador del nervio hipogástrico en la inervación noradrenérgica de la vejiga urinaria.

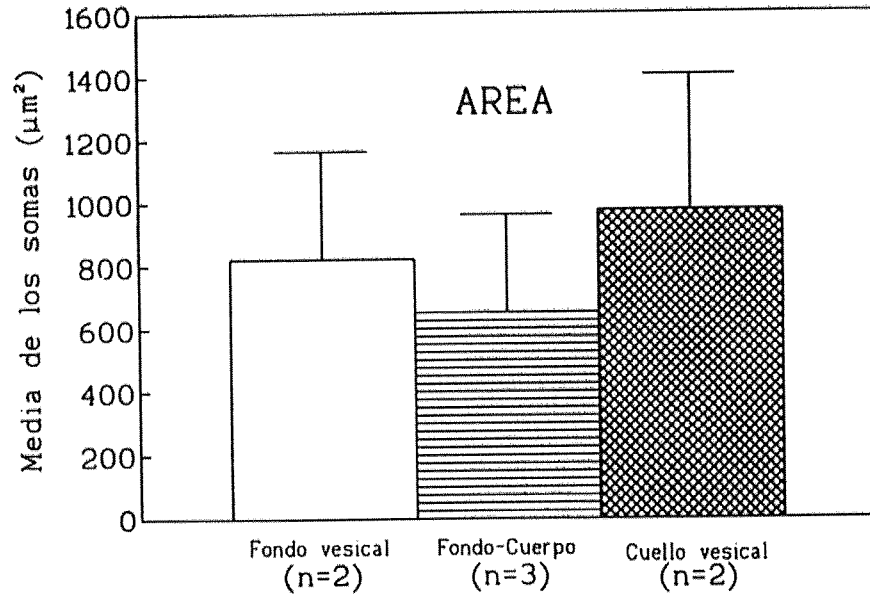


Figura 1. Morfometría de neuronas marcadas con WGA-HRP en GP de animales control.

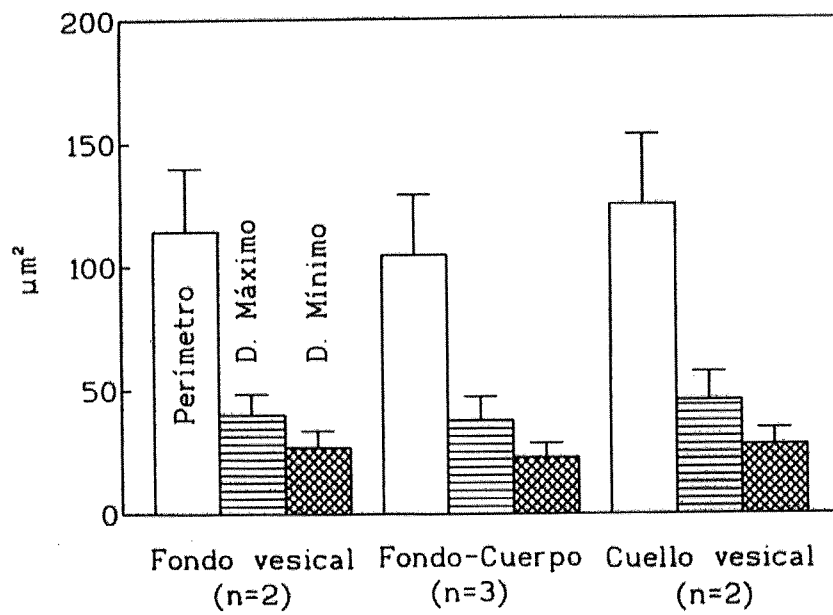


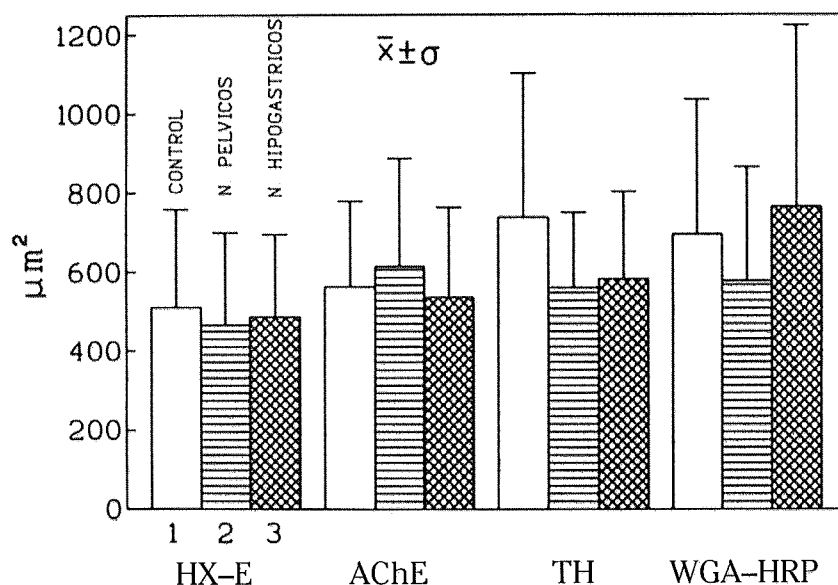
Figura 2. Morfometría de neuronas marcadas con WGA-HRP en GP de animales control.

La neurectomía pélvica mostró una diferencia altamente significativa ( $p=0$ ) en el volumen y peso de la vejiga urinaria, comparada con los casos controles. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre el análisis morfométrico de las neuronas AChE positivas del GP tras neurectomía, comparadas con los controles. Sí pudo apreciarse por el contrario una diferencia cualitativa en el número de somas AChE positivos en ambos casos, apreciando una disminución tras neurectomía pélvica, aunque estos datos no los hemos cuantificado ya que los resultados en el conteo neuronal son referidos a números absolutos, sin haber hecho

correcciones para una determinación real. El estudio de las fibras AChE positivas tras neurectomía pélvica mostraba una mayor disminución en el patrón de inervación colinérgica vesical tras neurectomía pélvica, comparada con casos control.

El análisis morfométrico de las neuronas TH positivas tras neurectomía pélvica mostró una diferencia significativa ( $p=0,018$ ), comparada con los casos control.

Cuando se realizó el depósito del marcador neuronal WGA-HRP en la pared vesical tras neurectomía pélvica o hipogástrica, se apreciaron cambios significativos, comparados con los casos controles (Fig. 3).



**Figura 3.** Promedios del análisis morfométrico en los distintos grupos. (HX-E= Hematoxilina-Eosina; AChE= Acetilcolinesterasa; TH= Tirosina Hidroxilasa; HRP= Peroxidasa conjugada a la aglutinina de trigo).

Tras neurectomía hipogástrica se pudo apreciar una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,009$ ) en el análisis morfométrico de las neuronas del GRD del nivel L2, comparado con los casos control, lo que concuerda con el nivel máximo de las aferencias del nervio hipogástrico, produ-

ciendo cambios plásticos en las neuronas ganglionares simpáticas relacionadas con su órgano diana.

La neurectomía pélvica mostró ausencia de marcaje ganglionar en los niveles sacros (S1-S3), lo cual confirma la efectividad del método al seccionar las aferencias

vesicales. A nivel lumbar existía una diferencia significativa ( $p=0,03$ ) entre el número de neuronas ganglionares del GRD de L1-L2 tras neurectomía pélvica, comparado con los casos control, lo que confirma la presencia de fibras simpáticas caminando en el nervio pélvico.

La proyección transganglionar de las aferencias vesicales en asta posterior tras neurectomía hipogástrica no sufrió cambios cualitativos apreciables, en cuanto a densidad de marcaje comparado con los casos control, por lo que la neurectomía hipogástrica no tiene un papel relevante en las vías del reflejo miccional. Cuando se realizó una neurectomía pélvica, se produjo ausencia de proyección transganglionar a nivel del asta posterior de la médula lumbosacra, lo que confirma el papel predominante del nervio pélvico en la regulación de las vísceras pélvicas.

## DISCUSIÓN

En este trabajo hemos analizado los cambios plásticos que se producen en las neuronas postganglionares simpáticas y parasimpáticas que inervan la vejiga urinaria y otros órganos pélvicos, así como las alteraciones en las aferencias simpáticas y parasimpáticas de la vejiga urinaria cuando se realiza una denervación vegetativa selectiva.

La inervación adrenérgica del aparato urinario inferior en el hombre es escasa y reducida en su distribución a la unión vesico-uretral<sup>7</sup>. El detrusor y el músculo trigonal presentan una inervación noradrenérgica escasa. En la rata, las fibras simpáticas caminan reunidas en el nervio hipogástrico; este nervio proporciona la inervación simpática aferente y eferente a las vísceras pélvicas y conduce la información sensitiva normal y nociceptiva de esos órganos<sup>8</sup>. Recientemente se ha demostrado que los axones de neuronas distales al nervio hipogástrico, que se sitúan en ganglios de la raíz dorsal y ganglios de la cadena simpática, alcanzan el nervio más probablemente a través del nervio pélvico. Un número indeterminado de esos axones surgen de las neuronas post-ganglionares en el GP, cuya función hasta el presente es

desconocida<sup>2</sup>. De forma similar, estudios sobre la inervación del aparato reproductor del gato muestran que sus aferencias llevan un doble camino: vía nervio pudendo y vía nervio pélvico<sup>9</sup>.

En nuestros experimentos de neurectomía hipogástrica bilateral, comprobamos que existía una disminución en el número de somas en los GRD de L1-L2, significativa en L2 ( $p<0,009$ ), que concuerda con el nivel máximo de las aferencias del nervio hipogástrico. No se produjo ausencia de marcaje en neuronas de los GRD lumbares tras neurectomía hipogástrica, lo que sugiere la existencia de otras vías complementarias que conducen la inervación simpática. Tras neurectomía pélvica, el análisis estadístico de las neuronas de los GRD lumbares mostraba una diferencia significativa con respecto a los controles ( $p<0,03$ ), lo que apoya la existencia de una red simpática que camina por distintas vías: nervio hipogástrico, cadena ganglionar simpática y nervio pélvico.

La inervación parasimpática de la vejiga urinaria se realiza a través de las células ganglionares autónomas del plexo pélvico, el cual recibe la información de los axones preganglionares sacros por medio del nervio pélvico<sup>10-13</sup>. La distribución de fibras colinérgicas en la vejiga urinaria es similar en el hombre y otros mamíferos. La mayor proporción se localiza en el cuerpo y fondo vesical, siendo menor a nivel del cuello vesical y uretra<sup>1</sup>. La neurectomía pélvica produce una denervación parasimpática al interrumpir las fibras aferentes y eferentes preganglionares desde el NPS<sup>14</sup>. El nervio pélvico lleva además de fibras parasimpáticas una proporción de fibras simpáticas, habiéndose demostrado mediante estudios electrofisiológicos que esta proyección simpática tiene como órganos diana la vejiga urinaria y el intestino grueso.

En nuestros experimentos se objetivó ausencia de marcaje ganglionar en GRD L6-S2, encontrando una diferencia estadísticamente significativa ( $p<0,03$ ) en las neuronas ganglionares de L1-L2, comparado con los controles, lo que confirma la presencia de fibras simpáticas en el nervio pélvico,

cuyo origen se situaría a nivel de la cadena ganglionar simpática lumbar.

Uno de nuestros objetivos a la hora de realizar el trabajo fue el determinar la posible plasticidad del Sistema Nervioso Periférico sometido a diversas agresiones. El análisis morfométrico de las neuronas del GP y su posterior estudio estadístico muestra que existen cambios plásticos significativos. Se observó una diferencia significativa ( $p=0,054$ ) en neuronas AChE positivas entre neurectomía pélvica e hipogástrica, lo cual confirma que la inervación parasimpática está influenciada en mayor medida por la neurectomía pélvica, produciendo cambios plásticos en las neuronas ganglionares del GP. En cuanto a neuronas TH positivas, se encontraron diferencias significativas entre neurectomía pélvica y control ( $p=0,018$ ) y neurectomía hipogástrica y control ( $p=0,002$ ), confirmando los cambios producidos en los somas neuronales noradrenérgicos del GP, mayores cuando se realiza neurectomía hipogástrica. En los casos inyectados con WGA-HRP, comparando neurectomía pélvica e hipogástrica, la diferencia fue altamente significativa ( $p=0,005$ ), lo que implica un papel predominante del nervio pélvico en la modulación de los cambios plásticos en los somas neuronales del GP, comparados con el nervio hipogástrico.

#### *Aspectos Clínicos.*

El progresivo avance en el conocimiento de las vías nerviosas implicadas en el acto de la micción, su neurofarmacología, así como los recientes avances en las técnicas Urodinámicas, permiten hoy en día abordar el tratamiento de la vejiga neurógena de una forma más completa. La Neurourología, que hoy en día se perfila como una subespecialidad dentro de la Urología, trata de estudiar y agrupar todos estos conocimientos para conseguir un tratamiento integral del paciente afecto de vejiga neurógena.

Las vías del reflejo miccional son conocidas básicamente, aunque quedan todavía muchos puntos por concretar. La interacción entre Sistema Autónomo Simpático y Parasimpático y Somático en el acto de la

micción, ha sido demostrada en diversos trabajos, quedando todavía por determinar cuál es el papel específico de cada uno de ellos en el acto de la micción. El paciente lesionado medular es un buen modelo para estudiar, mediante técnicas electrofisiológicas y urodinámicas, el papel que juegan las aferencias y eferencias del Sistema Nervioso Autónomo en la dinámica miccional.

La electromicción (estimulación eléctrica de las raíces sacras anteriores para conseguir el vaciamiento vesical) es un hecho desde 1972. Posteriormente se han diseñado dispositivos internos (a modo de marcapasos) que combinando la estimulación eléctrica de las raíces sacras anteriores con la rizotomía sacra de las raíces posteriores, consigue mejorar sensiblemente los síntomas de muchos pacientes con problemas de vejiga neurógena, fundamentalmente los derivados de las alteraciones de la continencia. En estas técnicas de neuroestimulación y otras que aparecerán en el futuro del tratamiento en el paciente con lesiones medulares. Trabajos como el expuesto aquí, creemos que contribuyen a un mejor conocimiento de los mecanismos nerviosos implicados en la regulación de las vísceras pélvicas.

#### **CONCLUSIONES**

1. La neurectomía hipogástrica no produce cambios plásticos, estadísticamente significativos, en la proporción de fibras colinérgicas de la vejiga urinaria ni en la población de neuronas AChE positivas del GP comparado con los casos control.
2. La neurectomía hipogástrica produce cambios plásticos, estadísticamente significativos, en la población de neuronas TH positivas del GP comparado con los casos control.
3. La neurectomía pélvica produce una diferencia altamente significativa en el volumen y peso de la vejiga urinaria comparada con los casos control.
4. Existe una disminución significativa en el número de fibras AChE positivas tras neurectomía pélvica, comparado con los casos control.

5. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre neuronas AChE positivas tras neurectomía pélvica y casos control, aunque sí se apreció una diferencia cualitativa en la intensidad de marcaje de somas AChE positivos en ambos casos.

6. La neurectomía pélvica produce cambios plásticos, estadísticamente significativos, en la población de neuronas TH positivas comparadas con los casos control.

7. El nervio pélvico presenta un papel predominante en la modulación de los cambios plásticos producidos en los somas de las neuronas del GP en comparación con el nervio hipogástrico.

*Agradecimientos:* Queremos expresar nuestro agradecimiento al personal de la Unidad de investigación del Servicio Navarro de Salud por la cesión y cuidado de las ratas empleadas en este trabajo de investigación y al Dr. Andériz por el trabajo de análisis estadístico.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. ELBADAWI A, SCHENK EA. A new theory of the innervation of bladder musculature. Part Postganglionic synapses in utero-vesicourethral autonomic pathways. *J Urol* 1971; 105: 372-374.
2. NADELHAFT I, VERA PL. Conduction velocity distribution of afferent fibers in the female rat hypogastric nerve. *Brain Res* 1991; 539: 228-232.
3. PASCUAL JJ, INSAUSTI R, GONZALO LM. The pelvic innervation in the rat: different spinal origin and projections in Sprague-Dawley and Wistar rats. *Brain Res* 1989; 480: 397-402.
4. ALM P, EKSTROM J. Outgrowth of cholinergic nerves in the rat urinary bladder either partially denervated or partially denervated and decentralized. *Acta Physiol Scand* 1981; 112: 179-183.
5. MESULAM MM. Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neuro-histochemistry. A non-carcinogenic blue reaction-product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J Histochem Cytochem* 1978; 26:106-117.
6. KARNOWSKY MJ, ROOTS L. A direct coloring thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem Cytochem* 1964; 12:219.
7. NORLDING J, CHRISTENSEN B. Human sympathetic bladder innervation. A morphological investigation. *Urol Int* 1978; 33: 359-365.
8. JÄNIG W, McLACHLAN EM. Organization of lumbar spinal outflow to distal colon and pelvic organs. *Physiol Rev* 1987; 67: 1332-1404.
9. KAWATANI M, TAKESHIGE C, DE GROAT WC. Central distribution of afferent pathways from the uterus of the cat. *J Comp Neurol* 1990; 302: 294-304.
10. KEAST JR, BOOTH AM, DE GROAT WC. Distribution of neurons in the major pelvic ganglion of the rat which supply the bladder, colon or penis. *Cell Tissue Res* 1989; 256: 105-112.
11. KEAST JR, DE GROAT WC. Immunohistochemical characterization of pelvic neurons which project to the bladder, colon or penis in rats. *J Comp Neurol* 1989; 288: 387-400.
12. PASCUAL JJ, INSAUSTI R, GONZALO LM. Pudendal nerve topography in the rat spinal cord projection studied with the axonal tracer wheat germ agglutinin conjugated-horseradish peroxidase. *J Urol* 1992; 147: 718-722.
13. PASCUAL JJ, INSAUSTI R, GONZALO LM. Urinary bladder innervation in male rat: Termination of primary afferents in the spinal cord as determined by transganglionic transport of WGA-HRP. *J Urol* 1993; 150:500.
14. DAIL WG Jr, EVAN AP Jr, EASON HR. The major ganglion in the pelvic plexus of the male rat. A histochemical and ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 1975; 159 : 49-62.