

## Modelo de denervación cavernosa experimental en ratas mediante electroablación

### Experimental model of cavernosus denervation using electroablation in rats

Aceptado para publicación Junio 2009.  
Trabajo galardonado con el Premio Mejor Trabajo - Tema Libre. Otorgado en XLV Congreso Argentino de Urología, Mendoza 2008.

Dres. Mazza, Osvaldo N.<sup>1</sup>;  
Sanguinetti, Horacio<sup>1</sup>;  
Becher, Edgardo<sup>1</sup>;  
Brzezinski, Mariano<sup>1</sup>;  
Aguilar, Jorge<sup>1</sup>;  
Jalon, Martin<sup>1</sup>;  
Paglia, Nora<sup>2</sup>.

**Introducción:** Una de las complicaciones más estudiada de la prostatectomía radical es la denervación del tejido cavernoso. La reproducción en un modelo animal permite conocer sus efectos moleculares y evaluar fármacos que permitan paliar el daño o facilitar la reinervación. Las Ratas *Wistar* son los modelos animales más empleados por su bajo costo, fácil manejo y similitud fisiológica. Los modelos de mecánica denervatoria más publicados han sido la sección, electroablación, congelación y fármaco ablación. Exponemos en esta comunicación las bases fisiológicas y técnicas de un modelo experimental simple de electroablación con electrodo monopolar y sin microscopía.

**Materiales y Métodos:** Los estudios se desarrollaron sobre 66 ratas macho *Wistar* de 12 semanas de vida, de aproximadamente 300 g, endocriadas en bioterio con alimentación balanceada, agua *ad libitum*, ciclos de 12 horas de luz oscuridad y sin manipulación farmacológica. Se efectuaron tres experiencias: 1) fase preparatoria N=6 denervadas bilat. 2) experimento 1 N=36 (24 denervadas, 12 bilat., 12 unilat. y 12 sham) y 3) experimento 2 N=24 (16 denervadas bilat. 8 sham). Se efectuó anestesia general con una asociación de ketamina 50 mg/kg y xilacina 7,5 mg/kg por vía intraperitoneal. Se realizó como operación sham una laparotomía en abdomen inferior con cierre en dos planos o se efectuó la exposición de la inervación pélvica con laparotomía, identificación de la vejiga, próstata, uretra membranosa y segmento pre-crural del pene. En la fase preparatoria se denudó también el pene, se identificó mediante lentillas de 3x el ganglio pélvico ubicado en las caras laterales de la próstata. Se procedió a la electroestimulación con electrodo de aguja bipolar en contacto con el tejido neural mediante onda cuadrada de 80 a 100 mAp mediante un generador de potenciales ATI Delphos PE® con una frecuencia de estimulación de 50 pps, logrando la tumescencia del pene. Luego de producida la detumescencia, con un electrobisturí Weros® monopolar, con electrodo de aguja y potencia de 25W se efectuó la electroablación una línea de sección transversal de 3 a 4mm en el tercio inferior de cada cara lateral de la próstata, a fin de comprometer las emergencias ganglionares correspondientes al nervio erector. Luego de un período de reposo se reitera la electroestimulación del ganglio pelviano, no logrando la respuesta tumescente. Se realizó la eutanasia.

**Resultados:** En los experimentos 1 y 2 se efectuaron 36 denervaciones bilaterales, 10 unilaterales y 20 sham. El examen microscópico de los cuerpos cavernosos con técnicas de coloración estándar e inmunohistoquímica evaluada con analizador de imágenes y western blot con caveolina-1, hemoxigenasa-1, alfa actina y colágeno 3, demostró la existencia de alteraciones estructurales y moleculares que se correlacionaban con el grado de denervación (uni o bilateral) evidenciando una diferencia significativa  $p < 0.001$  con los animales sham.

**Conclusión:** El modelo de denervación cavernosa mediante electroablación con electrodo monopolar con la técnica expuesta constituye un método económico y sencillo para acceder a la investigación experimental de la lesión neural cavernosa.

**PALABRAS CLAVE:** Modelo experimental; Denervación; Cuerpos cavernosos.

<sup>1</sup> Hospital de Clínicas "José de San Martín". Servicio de Urología.

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Cardiológicas. Universidad de Buenos Aires, Argentina

**Introduction:** Cavernous smooth muscle denervation is one of the most important complications of radical prostatectomy. The reproduction in an animal model allows assessing the molecular effects and facilitates the evaluation of drugs that might help avoid or minimize the damage. The more widely published denervation models include section, electro-ablation, freezing and drug ablation. We show in this communication the physiological and technical basis of a simple experimental model of electro-ablation with a monopolar electrode and no microscopy.

**Materials and Methods:** 66 male, 12 week-old, Wistar rats of an average weight of 300 g were studied. Three different experiments were conducted under general anesthesia: 1) preparatory phase N=6 bilateral denervation 2) experiment 1 N=36 (12 bilateral, 12 unilateral and 12 sham) and 3) experiment 2 N=24 (16 bilat. 8 sham). Sham operation included an inferior laparotomy. The preparatory phase consisted of electro-stimulation of the pelvic ganglia and assessment of erections followed by electro-ablation. After a period of rest the electro-stimulation of the pelvic ganglia was repeated showing absence of erectile response. Denervation included exposure of the pelvic ganglia, identification of bladder, prostate, urethra and pre-crural segment of the penis followed by electro-ablation. Eutanasia was performed.

**Results:** In experiments 1 and 2, 36 bilateral denervations, 10 unilateral and 20 sham were performed. Microscopic examination of the corpus cavernosum bodies with standard techniques and an image analyzer followed by western blot with caveolin-1, hemoxigenase-1, alpha actin and collagen 3 demonstrated the existence of structural and molecular alterations that were correlated with the degree of denervation (uni or bilateral) demonstrating a significant difference  $p < 0,001$  with the sham animals.

**Conclusions:** The model of cavernous denervation by electro-ablation using a simple monopolar electrode with the described technique constitutes an economic and simple method to achieve experimental investigation of the cavernous neural injury.

**KEY WORDS:** Experimental model; Denervation; Corpus cavernosum.

## OBJETIVO

La lesión de los nervios erectores es una consecuencia posible en toda cirugía cercana al piso pelviano. En la práctica urológica las causas más frecuentes se dan en las prostatectomías radicales por cáncer de próstata, por cáncer de vejiga (cistoprostatectomías) y por adenoma de próstata (resección transuretral). Desde que *Billroth* en 1863 describiera la primera técnica reglada de cirugía ablativa para el cáncer de la próstata y hasta que *P. Walsh & Donker* en 1982<sup>1</sup> comunicaran una técnica adecuada para preservar el paquete neurovascular en la prostatectomía retropubiana, la disfunción eréctil (DE) post operatoria ha sido aceptada como una consecuencia casi inevitable. Actualmente se manejan cifras alentadoras de preservación de la función eréctil post prostatectomía.

Los nervios autonómicos suelen regenerarse ante una lesión, pero ello toma meses o años. Se ha demostrado que la función eréctil puede ser restaurada en las ratas luego de una ablación nerviosa bilateral utilizando un injerto nervioso para unir el defecto del nervio

seccionado (*DM Quinlan*). La recuperación de las lesiones experimentales del ganglio y nervio erector de la rata se ponen en evidencia entre 3 semanas y 6 meses después de la neurotomía<sup>2</sup>.

Estos hechos han conducido al desarrollo de una gran cantidad de estudios experimentales que intentan reproducir en diversos animales de laboratorio la denervación experimentada durante una prostatectomía radical u otra intervención oncológica pelviana en los varones que determine la lesión de los nervios erectores. Múltiples animales de laboratorio fueron objeto de tales estudios, primates, canes, felinos, y roedores como el conejo o la rata. Si bien los primates son los más próximos en la línea evolutiva del humano, su alto costo y baja disponibilidad lo alejan de los estudios que requieren una alta población de animales. Las ratas son las más económicas, ya que requieren menos espacio en los bioterios y la manipulación es más sencilla. Existe una gran variedad de ratas, especies normales como la *Sprague Dawley* o *Wistar Kyoto* que a través de manipulación farmacológica, alimentaria o quirúrgica pueden

representar enfermedades equiparables a las de los humanos u otras, transgénicas, cuyo genotipo permite expresar, al nacer o en la edad adulta, una característica fenotípica coincidente con la enfermedad objeto de estudio (ratas espontáneamente hipertensas SHR, ratas *Zucker* con síndrome metabólico, ratas *knock out*, etc.). En las primeras, se ha intentado mediante una cirugía denervatoria interrumpir el flujo nervioso de los cuerpos cavernosos, ya sea alterando núcleos cerebrales, los centros medulares, los núcleos nerviosos pelvianos o los nervios erectores.

Si bien la rata dista del humano en la escala zoológica, pertenece a una línea evolutiva coherente y su nivel de organización neural es compatible. La mayoría de las estructuras nerviosas del cerebro y médula se reproducen en ambas especies y la fisiología inervatoria, así como los neurotransmisores, tienen idénticas funciones.

Los estudios experimentales que recurren a la denervación del tejido eréctil tienen aplicación en una extensa lista de líneas de investigación que van desde el mejor conocimiento de la fisiología, el estudio de diversas moléculas del tejido eréctil, el conocimiento de la mecánica denervatoria y reinervatoria, a la evaluación de fármacos tendientes a facilitar la erección (iniciar o acelerar la dinámica reinervatoria). Nuestra línea de investigación ha sido orientada a la detección y categorización de moléculas expresadas (en más o en menos) en los procesos denervatorios a fin de que sean utilizadas para monitorizar la magnitud del daño o la recuperación lograda con la terapia. Para la realización de esos trabajos requerimos de animales con denervación cavernosa total (lesión de ambos nervios), parcial (lesión de un solo nervio o unilateral) y de controles indemnes.

Se han descrito varios modelos experimentales para interrumpir el flujo nervioso a través de los nervios erectores, la mayoría de ellos requieren cierta destreza en el manejo de la técnica microquirúrgica. Son algunos de ellos la disección del nervio erector, emergente inferior del ganglio pelviano látero prostático que corre a lo largo del pico de la próstata y la uretra, que requiere de una magnificación microscópica de al menos 8X tal lo publicado por *Quinlan DM* en 1989<sup>3</sup>. *Carrier S. Y Lue T*, en 1995 seccionan totalmente las eferencias apicales del ganglio pelviano empleando una magnificación microscópica de 10X a 40X<sup>4</sup>; otros han empleado técnicas de microdiatermia y microfrizado para provocar la denervación cavernosa.

A los fines de lograr una técnica estándar y rápida de denervación cavernosa, que sirva para intervenir un número importante de animales con el menor requerimiento tecnológico, y que sirva a la vez como una actividad quirúrgica que permita integrar a los residentes

de Urología al laboratorio, desarrollamos un procedimiento que podía lograr igual resultado a métodos más sofisticados sólo con el empleo de una lente de 3X o el ojo desnudo y un electrobisturí monopolar de baja potencia. La presente comunicación describe el desarrollo de una técnica de electroablación del ganglio pelviano que permite una completa denervación de los cuerpos cavernosos, preservando la función inervatoria de la vejiga y del recto.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de este trabajo de investigación se basó en las experiencias aportadas por tres experimentos.

### Experimento preparatorio

Se llevó a cabo en el año 2004, en el Laboratorio de Medicina Experimental del Hospital Alemán. Tuvo como objetivos: a) desarrollar una técnica quirúrgica de electroablación bilateral del tejido cavernoso en ratas de laboratorio especie *Wistar Kyoto* (en lo sucesivo *Wistar*) sin el empleo de microscopio operatorio; b) determinar, a ojo desnudo o con lentillas de 2,5X la precisa anatomía genital de los animales, la ubicación de las estructuras nerviosas correspondientes al plexo pelviano (ganglio pelviano) para prostático; c) corroborar tales estructuras mediante estudio histológico; determinar la ubicación más acertada de la escara de electroablación, así como la intensidad de la diatermia; d) corroborar mediante examen histológico que la escara de la electroablación coincida con las estructuras ganglionares y e) desarrollar un protocolo de electroestimulación del ganglio pelviano para lograr una erección experimental en condiciones de laboratorio.

### Experimento 1

Se efectuó en los años 2006 – 2007 en los Laboratorios de Medicina Experimental de la Cátedra de Urología (Figura 24) donde se realizaron estudios de biología molecular, en el Instituto de Investigaciones Cardiológicas ININCA de la Universidad de Buenos Aires donde asentaba el Bioterio y el quirófano experimental, y el Laboratorio de Medicina Experimental del Hospital Alemán donde se procesaron las muestras para histología e inmunohistoquímica. Consistió en estudiar los efectos de la denervación bilateral y unilateral (con la técnica desarrollada en la fase previa), comparándola con las ratas no denervadas, pero sometidas a operaciones simuladas (sham), investigando en todas, las alteraciones estructurales del tejido cavernoso, en especial la expresión de alfa actina, hemoxigenasa-1 y caveolin-1 (el descenso de su expresión implica cuantitativamente

el grado de deterioro del músculo liso cavernoso como consecuencia del grado de denervación); así como el incremento en la matriz intersticial evaluada con colágeno I y III. El experimento también tuvo como objeto dividir las ratas de cada grupo en: I) denervadas bilateral, II) denervadas unilateral y III) no denervadas; en otros dos grupos con y sin la ingesta sostenida de citrato de sildenafil. La inclusión del sildenafil fue a fin de comprobar si este inhibidor de la fosfodiesterasa de tipo V permitía morigerar el daño provocado en el tejido cavernoso denervado. Los resultados de esta investigación han sido aceptados para su publicación en el *Internacional Journal of Sexual Medicine*, pero los datos puramente quirúrgicos que hacen a esta modalidad de electroablación ganglionar se analizan en la presente comunicación.

### Experimento 2

Se efectuó durante 2008, en el Laboratorio de Medicina Experimental de la Cátedra de Urología UBA y en el ININCA UBA. Expusimos 2 lotes de ratas *Wistar*, mediante la técnica quirúrgica descripta, a denervación bilateral y a una operación simulada (sham). La finalidad es investigar la expresión de proteínas, denominadas chaperonas, como las *heat shock proteins* 20, 70, caldesmon y caveolin-1 y correlacionarlas con el daño neural. Con este experimento (aún inédito) también evaluaremos la técnica de electroablación del ganglio simpático.

### Población estudiada

Experimento preparatorio N=6, ratas *Wistar* de aproximadamente 300 gramos de peso de 80 a 90 días de vida. Las 6 fueron eutanasiadas al finalizar la experiencia. Experimento 1, se emplearon 32 animales de iguales características, 12 electroablaciones bilaterales, 12 electroablaciones unilaterales y 12 operaciones simuladas sham. Experimento 2, se investigaron 24 animales, 16 de ellos con electroablación bilateral y 8

sham. En los experimentos 1 y 2, 12 semanas después de las operaciones fueron eutanasiados todos los animales a fin de estudiar sus tejidos.

### Anatomía quirúrgica

Desde el punto de vista de la técnica quirúrgica empleada, interesa conocer el contenido de la pelvis de las ratas, el que no se diferencia mucho de los humanos. La próstata ventral es un órgano relativamente voluminoso que a diferencia de los humanos se encuentra por encima del borde superior del pubis, por lo que permite su abordaje simple y total exteriorización con una laparotomía inferior suprapubiana. Por encima y un poco por detrás de la próstata se asienta la vejiga que siempre, al momento de la cirugía, se encuentra pletórica; es de paredes finas, debe ser manipulada con instrumental delicado a fin evitar su daño (Dibujo 1).

El pliegue peritoneal se encuentra posterior a la vejiga, por lo que si la incisión es económica (2 a 3 cm) se evita ingresar a la cavidad peritoneal y preservar la exposición del colon sigmoideo (Foto 13). Por detrás de la unión vesicoprostática, se pueden insinuar, a ambos lados, las vesículas seminales. Se debe disecar en forma roma y delicada el pico de la próstata que permite exponer (aún suprapúbico) el segmento proximal de la uretra membranosa, reparo anatómico fundamental de respetar con la electroablación (Figura 11).

El ganglio pelviano es el homónimo del plexo pelviano del humano. Es un conglomerado de cuerpos neuronales y fibras amielínicas (Figura 21) que se ubican adyacentes a la cápsula de la próstata ventral de la rata (Figura 22), cuyas eferencias inferiores inervarán los cuerpos cavernosos (Figura 23), Este centro neural está conectado con el plexo hipogástrico (simpático) y las ramas eferentes póstero laterales de la médula sacra (parasimpático). Se debe efectuar la escara eléctrica sólo en su mitad inferior a fin de respetar neuronas y fibras superiores que inervan la vejiga (Dibujo 2). La incisión

Complicación	Estudio previo	Experimento 1	Experimento 2	Total
Denervación bilateral	6	12	16	34
Denervación unilateral		12		12
Cirugía simulada		12	8	20
Total denervadas				46
Total operadas				66

Tabla 1.

se debe extender hasta el pene, observándose el tallo medio que transcurre bajo la delgada sínfisis del pubis, casi ocultándola. La Figura 19 muestra una macrofotografía del pene disecado en toda su extensión que evidencia tres sectores; el distal que aloja un cuerpo óseo presente en la mayoría de los mamíferos y denominado *baculum*, que no es útil para los estudios histológicos ni moleculares: el segmento medio, libre y grueso es apto para ser estudiado y el crural, que está revestido por la musculatura estriada isquiocavernosa y bulbocavernosa.

### **Técnica quirúrgica de la electroablación del ganglio simpático**

Técnicamente es una electroablación incompleta. Como ya mencionamos, el animal empleado es la rata *Wistar Kyoto* de 12 semanas y 300 mg de peso.

Los animales permanecieron en jaulas individuales con una temperatura constante de  $21 \pm 2$  °C. El ciclo día/noche fue de 12 horas (7.00am-7.00pm). Las ratas fueron separadas en jaulas de hasta 4 especímenes. Durante tres meses recibieron alimento estándar (Cooperación-Argentina) y agua corriente "ad libitum" hasta el momento de la cirugía. Después de los procedimientos se colocaron en jaulas separadas a fin de que no se agredan por el olor a sangre. Aún así un animal en el experimento 1 y otro en el experimento 2 cometieron autofagia de la herida, muriendo uno y pudiendo ser reintervenido el del experimento 2 manteniéndose sano y viable hasta el final de la experiencia.

Para la cirugía de electroablación del ganglio pelviano los animales fueron anestesiados usando una inyección intraperitoneal de ketamina 50 mg/kg y xilacina 7.5 mg/kg (Figuras 5 y 6). Luego de rasurar el hemiabdomen inferior (Figura 7) se practicó una incisión de menos de 3 cm en la línea media abdominal inferior inmediatamente por encima del pene, por donde fueron expuestas la vejiga, la próstata y la uretra.

La neurotomía extensa del plexo para prostático pre-eréctil fue realizada usando cauterio en el aspecto lateral de la próstata sin ampliación óptica en los experimentos 1 y 2 (60 animales) y solo lupas 2.5 X en el experimento preparatorio (6 animales). Luego de la identificación de las estructuras anatómicas, remarcando la importancia de disecar el pico de la próstata para visualizar la uretra membranosa. La neurotomía por electroablación se realizó con diatermia, mediante un trazo horizontal de 4-5 mm para provocar una escara en la mitad podálica de cada cara lateral de la próstata ventral, a fin de provocar la electroablación del extremo inferior del ganglio pelviano (Dibujo 2 y Figuras 14a, 14b y 15). Se empleó un sencillo electrobisturí monopolar, de industria nacional, marca Weros® usando una

potencia de 25W. Se completó la cirugía con la síntesis de la laparotomía, en dos planos, músculos y piel, con ácido poliglicólico de 4/0 (Figura 12).

La operación simulada o sham, comprendió sólo la laparotomía con la exposición prostática y el cierre de la misma. Luego de operados los animales recibieron nalbufina como analgesia post operatoria, 1 mg/kg dos veces al día durante cinco días.

### **Eutanasia**

Al finalizar el experimento, todas las ratas fueron sacrificadas (40mg/kg de pentobarbital intraperitoneal), algunos fueron eutanasiados por paro cardíaco por hipovolemia aguda al ser exsanguinados (bajo anestesia) para muestras de laboratorio mediante punción aórtica (Figura 16). Luego de la eutanasia se extrajo en block la próstata, vejiga, vesículas seminales, uretra y pene preservados para microscopia óptica (MO), para estudios inmunohistoquímicos y para maceración inmediata para estudios de biología molecular (Figuras 17, 18, 19 y 24).

### **Validación de la técnica**

*Prueba n° 1:* A fin de poner a punto y validar la técnica de electroablación del ganglio pelviano y su efecto denervatorio, realizamos un experimento con 6 animales en los que una vez expuesta la próstata, estimulamos el ganglio pelviano (mancha de aspecto perlado Figuras 1 y 13) para lograr tumescencia y semierección peneana (Figuras 1 y 2).

El equipo empleado para la generación de impulsos eléctricos -utilizado también para electro-miografía y análisis de potenciales evocados- fue un ATI Delphos PE® de Larmed Medica. Genera pulsos repetitivos de onda cuadrada de 0.2 a 0.3 mseg de duración, de intensidad variable de 80 a 100 mAmp, con una frecuencia de estimulación de 50 p.p.s (protocolo *Lassalle*) a través de un electrodo en forma de U con dos electrodos -uno activo y otro indiferente- circulando la corriente entre ambos, lo que permite generar las ondas de electro-estimulación.

*Prueba n° 2:* Se realizó tinción de hematoxilina y eosina en el área correspondiente al ganglio pelviano.

*Prueba n° 3:* El término electroablación del ganglio pélvico, si bien permite identificar la técnica, no es del todo correcto, podría ser electrosección del ganglio pelviano, ya que la mayor parte del cuerpo superior, con las aferencias y eferencias hacia vejiga y recto permanecen indemnes. La prueba de esta indemnidad funcional es que los 46 animales denervados, en especial los 34 con lesiones bilaterales permanecieron las 12 semanas de vida restante con una función vesical y defecatoria nor-

mal, falleciendo solo por eutanasia, salvo el que murió en el post operatorio inmediato por autofagia.

*Prueba n° 4:* Los experimentos 2 (finalizado) y 3 (en curso) comprendieron un algoritmo de estudios histológicos, histoquímicas y de biología molecular que si bien no forman parte de esta presentación, se resumirá a modo de ejemplo el primero de ellos a continuación.

### **Experimento 1** (Figuras 24, 25 y 26)

#### **Inmunomarcación y Microscopia óptica**

La Inmunomarcación de las muestras fue realizada con una técnica modificada del complejo del avidin-biotin-peroxidasa. Después de la desparafinización y de la rehidratación, las secciones fueron lavadas en un buffer de solución salina de fosfato (PBS) por 5 minutos. Para neutralizar la actividad endógena de peroxidasa se incubaron las secciones en peróxido de hidrógeno en metanol al 1% por 30 minutos. Después de lavar las secciones en PBS, pH 7,2, por 20 minutos, las secciones fueron incubadas con el suero bloqueante por 20 minutos. Después de eso, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario durante la noche, aclarado en PBS, e incubado con biotín, el anticuerpo universal, por 30 minutos. Después de lavarse en PBS, las secciones fueron incubadas con el reactivo Vectastain® ABC élite (laboratorios Vector, Burlingame, CA, E.E.U.U.) por 40 minutos y expuestas a 0.1% diaminobenzidina (Polyscience, Warrington, PA, E.E.U.U.) y a peróxido de hidrógeno al 0.2% en 50 milímetros de Tris buffer, pH 8, por 5 minutos. La a-SMA fue cuantificada usando el anticuerpo monoclonal antia-SMA de ratón (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, E.E.U.U.), y el caveolín con anticuerpos policlonales IgG anti-caveolín-1 (N-20 SC-896; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, E.E.U.U.) en una dilución de 1:100.

A fin de demostrar la injuria cavernosa mediante la denervación se procedió a cuantificar la expresión de varias proteínas vitales del cuerpo cavernoso de la rata como el caveolín-1 (también presente en humanos).

#### **Análisis morfométrico**

Entre 6 y 8 secciones histológicas transversales del pene de cada animal fueron estudiadas por un analizador de imagen (Imagen-Pro® más, la versión 4, Media-Cybernetics, Inc. Silver Springs, MD, E.E.U.U.). Para comparar los segmentos similares de la recopilación de todas las ratas, las secciones fueron tomadas de la porción central próxima del pene de cada animal. Los análisis morfológicos fueron realizados con el observador ciego al grupo animal, y los datos fueron promediados.

El tejido cavernoso fue delineado por la túnica albugínea. Después una cuantificación del grado de inmunomarcación para los parámetros siguientes fue realizada: (a) capa del músculo liso cavernoso en el espacio cavernoso expresado como el porcentaje de marcación positiva para a-SMA por área, y (b) caveolín-1 expresado como porcentaje del área. Las secciones de control usadas para la determinación de la especificidad del anticuerpo incluyeron, (a) controles positivos del endotelio normal para caveolín-1 y (b) los controles negativos (secciones seriales de cada muestra que omiten el anticuerpo primario). La marcación con caveolín-1 también fue evaluada cualitativamente por la presencia de tinción positiva o negativa. Todos los datos fueron promediados en el resultado final.

#### **Análisis estadístico**

Los valores del análisis estadístico se expresan como mediana  $\pm$  SD. Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando valores absolutos y procesados con el GraphPad prism, versión 2.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, E.E.U.U.). Para los parámetros con la distribución no-Gaussiana, tal como datos histológicos, las comparaciones fueron hechas por el análisis no paramétrico de la prueba múltiple de la variación y de la comparación de Dum's. Un valor de  $P < 0,05$  era considerado significativo.

#### **Conclusiones**

Se encontró diferencia significativa  $P < 0,001$  en la reducción de expresión de caveolín-1 en las ratas denervadas bilateral, con respecto a las denervadas unilateral y con las sham. Similar metodología y resultados se obtuvieron con hemoxigenasa-1, alfa-actina y colágeno-III.

## **RESULTADOS**

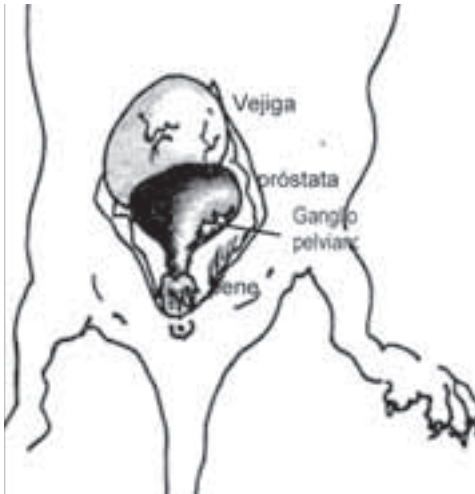
*Prueba n° 1:* A los pocos segundos (20 a 60 seg) de efectuada la electroestimulación, el tallo peniano semi denudado por la disección de sus cubiertas epidérmicas se observó completamente turgente en todos los animales. Con la estimulación de un solo lado se logró similar actividad tumescente que con la estimulación de ambos. Luego de la electroablación del ganglio pelviano, estimulando el plexo por encima de la escara, no se logró reproducir la actividad tumescente.

*Prueba n° 2:* El estudio histológico de los animales sham (sin lesión del nervio) comprobó en las tinciones con hematoxilina eosina a 400X, que la zona estimulada correspondía al ganglio pelviano y sus eferencias inferiores amielínicas correspondientes al nervio erector (Figuras 21, 22, 23). El estudio histológico del área es-

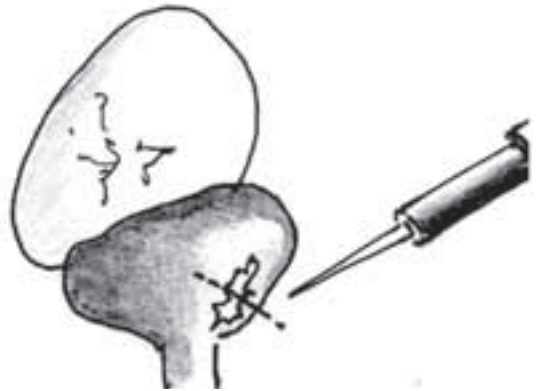
carada luego de 12 semanas sólo mostró fibrosis y zonas de necrosis sin evidencia de tejido neural sano.

*Prueba n°4:* Todos los animales denervados, uni o bilateralmente mediante electroablación presentaron (según la intensidad de la injuria neural) pruebas de alteracio-

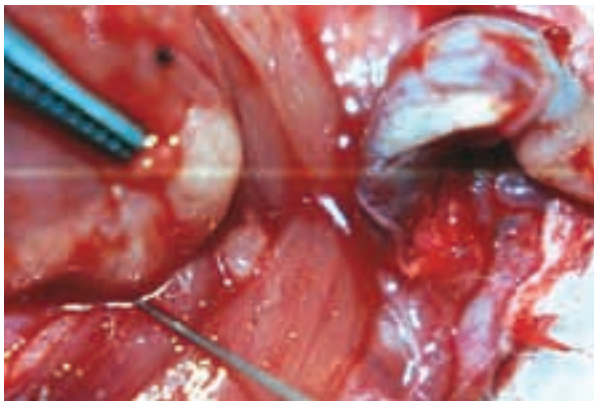
nes tróficas del músculo liso cavernoso, fibrosis cavernosa, y marcada reducción en la expresión de proteínas matriciales con una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los animales no denervados o sham (Figuras 25 y 26).



**Dibujo 1.** Campo quirúrgico obtenido mediante laparotomía en el abdomen inferior. Se debe efectuar una exposición mínima a fin de evitar las complicaciones post operatorias.



**Dibujo 2.** Se efectúa una sección de 3 a 4 mm, transversal en el hemisferio inferior de la cara lateral correspondiente de la próstata ventral. Ello permite interrumpir únicamente las aferencias inferiores del ganglio pelviano que conducen a la inervación de los cuerpos cavernosos, preservando la inervación vesical.



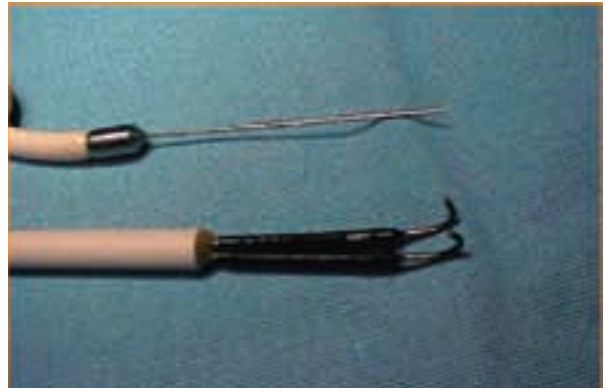
**Figura 1.** El extremo de la pinza de Kocher se apoya en la próstata ventral de la ratona; el electrodo monopolar de aguja apunta al extremo inferior de un área color perlada que corresponde al ganglio pelviano. Se procede a la electrocoagulación, en sentido transversal, en la base de la cara lateral de la próstata evitando las fibras superiores que inervan la vejiga.



**Figura 2.** El pene denudado por la disección de sus cubiertas epidérmicas se encuentra completamente turgente luego de la estimulación eléctrica de los ganglios pelvianos. Con la estimulación de un solo lado se logra la misma actividad tumescente de la estimulación de ambos. Luego de la electroablación del ganglio pelviano no se logra reproducir la actividad tumescente.



**Figura 3.** Equipo empleado para la generación de impulsos eléctricos que se puede emplear también para electro-miografía y análisis de potenciales evocados, fue un ATI Delphos PE®. Genera pulsos repetitivos de onda cuadrada de 0.2 a 0.3 mseg de duración. Se lo empleó en prostatectomía radical en humanos para la detección de las bandeletas neurovasculares.



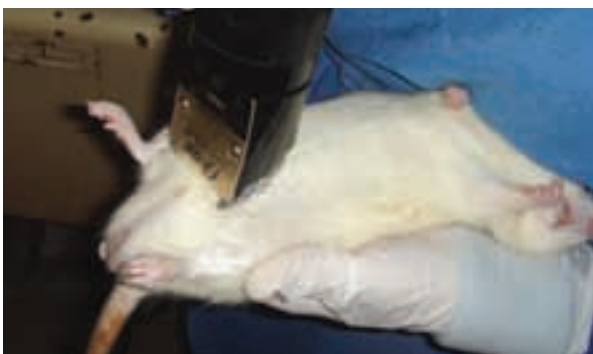
**Figura 4.** El electrodo superior, de aguja, monopolar se empleó para la detección de actividad bioeléctrica. El electrodo inferior, bipolar permite generar las ondas de electro-estimulación. Tiene forma de U con dos electrodos, uno activo y otro indiferente, circulando la corriente entre ambos.



**Figura 5.** En la preparación prequirúrgica los animales se alojan en jaulas comunitarias fuera del ámbito quirúrgico a fin de minimizar los signos de estrés y evitar la percepción olfatoria de la sangre de los animales previamente intervenidos.



**Figura 6.** La anestesia se administra por vía intraperitoneal mediante una aguja 30 G de media pulgada de longitud. Se empleó Ketamina 50 mg/kg y xilacina 7,5 mg/kg por vía intraperitoneal. Esta formulación anestésica permite una intervención con hipnosis y analgesia sin la necesidad de asistencia respiratoria con una buena saturación de oxígeno.

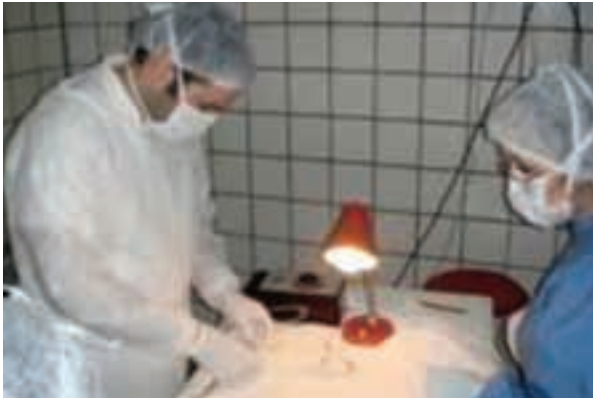


**Figura 7.** Luego de la anestesia se procede al rasurado de la zona quirúrgica.

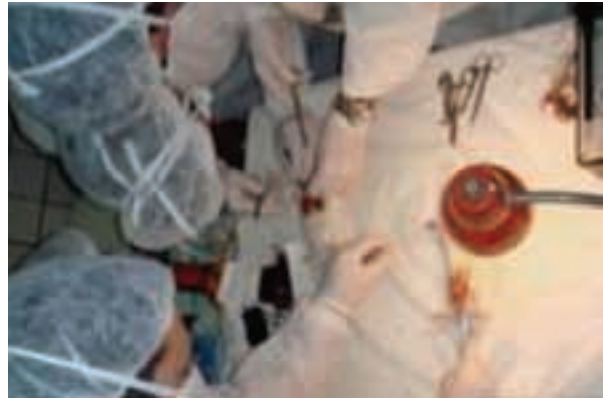


**Figura 8.** Aproximadamente a los 15 minutos de la inducción anestésica el animal se encuentra en el plano adecuado, que se puede comprobar mediante la abolición del reflejo de prensión plantar de las extremidades posteriores.





**Figura 9.** Es una intervención que requiere de al menos un ayudante. Las primeras operaciones conviene realizarlas con lentillas de 2,5 a 4 aumentos. Luego, la familiaridad con una anatomía, que no presenta variantes, permite intervenir a ojo desnudo.



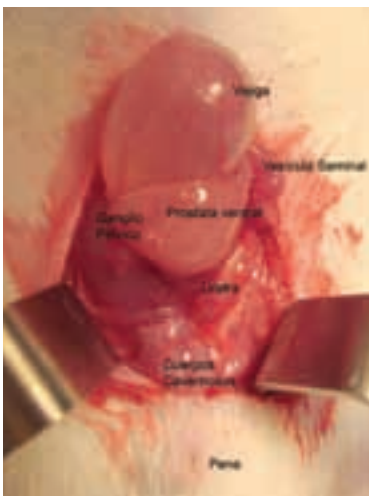
**Figura 10.** Se efectúa una laparotomía mediana de 2 a 3 cm de longitud comenzando por el borde superior del pene. Ella permite exponer el tallo peniano, la próstata y la vejiga. Una herida económica evita exponer al tubo digestivo evitando complicaciones y mortandad post operatoria.



**Figura 11.** La vejiga y la próstata ventral se exponen con facilidad, debiéndose disecar el pico prostático a fin de identificar la uretra membranosa (flecha) que no debe ser lesionada con la diatermia.



**Figura 12.** La síntesis de la herida se efectúa en dos planos, uno muscular y otro epidérmico con poliglicólico de 4/0. Cuando se debe intervenir un lote de animales conviene trabajar con más de un equipo quirúrgico para los tiempos de incisión, electrofulguración y síntesis.



**Figura 13.** Identificación de estructuras anatómicas; es importante disecar el pico de la próstata para visualizar la uretra membranosa.



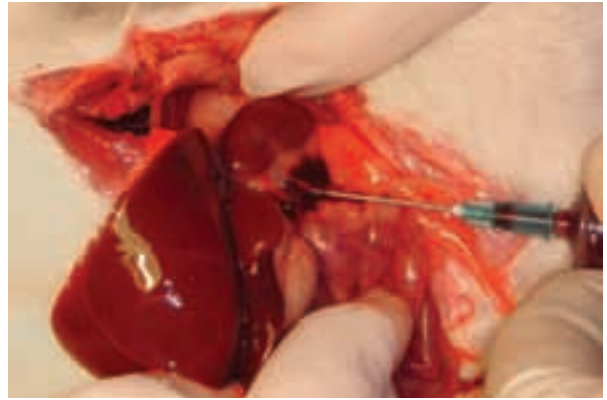
**Figura 14a.** Electroablación del extremo inferior del ganglio pelviano derecho.



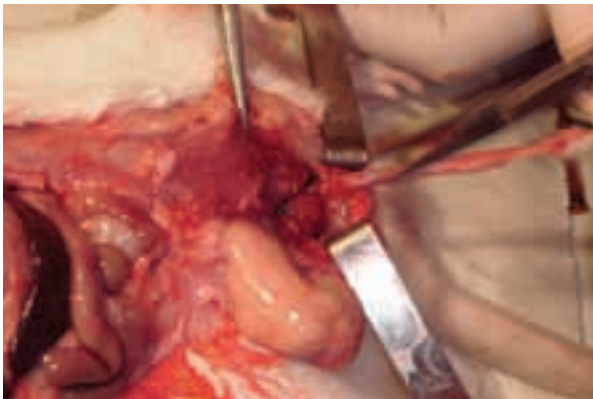
**Figura 14b.** Electroablación del extremo inferior del ganglio pelviano izquierdo.



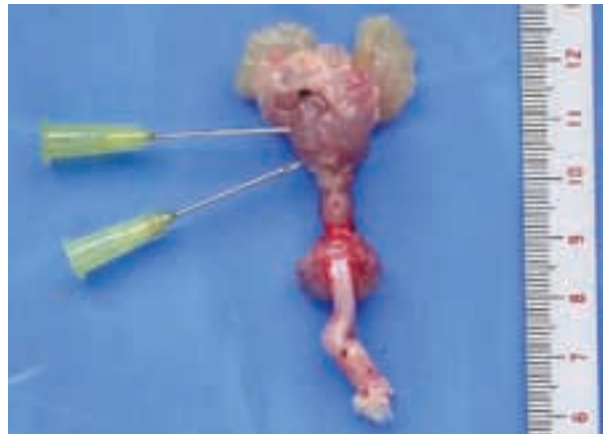
**Figura 15.** Electrobisturí monopolar empleado para la electroablación ganglionar con una potencia de 25W



**Figura 16.** Eutanasia luego de 12 semanas de la electroablación de los ganglios pelvianos se procede a una nueva intervención. Con el animal anestesiado, pero aún vivo, se procede a la extracción de muestras de sangre de la aorta; la exanguineación produce un inmediato paro cardíaco.



**Figura 17.** Posteriormente se procede a la evisceración de la vejiga, próstata, vesículas seminales, pene y uretra en bloque, para lo que se debe realizar una sinfisectomía pubiana.



**Figura 18.** Fotografía del bloque disecado, entre ambas agujas el área electrofulgurada correspondiente a la mitad inferior de la cara lateral de la próstata ventral, la que aloja al ganglio pelviano.

## DISCUSIÓN

Desde el resurgimiento de la prostatectomía radical se han intentado experiencias de electroneuroestimulación experimental en animales, siguiendo los trabajos pioneros de *Eckhard* en 1863. Una variedad de mamíferos (chimpancés, conejos, perros y ratas) se han empleado en protocolos experimentales a fin de lograr: a) un mejor conocimiento de la inervación del tejido cavernoso; b) determinar parámetros que puedan ser extrapolados al humano, y c) lograr una erección no farmacológica con protocolos experimentales<sup>5</sup>. Los mamíferos comparten un esquema similar de inervación pélvica que consiste en un plexo pélvico que recibe aferencias toracolumbares y lumbosacras. La rata ha

sido el animal más utilizado por su menor costo, mejor manipulación y una neuroanatomía accesible. Además, los animales más grandes son cada vez más difíciles de obtener para este tipo de trabajos científicos<sup>3</sup>.

La anatomía pelviana de la rata ha sido descrita con detalle por el grupo de *Walsh*, así como en estudios previos<sup>6</sup>. En este trabajo pionero el abordaje fue realizado a través de la línea media abdominal, efectuaron el denudamiento del pene, su circuncisión y a continuación la retracción de los testículos con su colocación en una posición intraabdominal. Para localizar los nervios utilizaron un microscopio *Zeiss* de 8X. La ablación de los nervios cavernosos fue evaluada de forma inmediata y tardía. Para la evaluación inmediata aplicaron lignocaina al 1% directo sobre el nervio para lograr una

ablación química. Para la tardía realizaron la sección del mismo entre ligaduras<sup>3</sup>.

La anatomía de la rata incluye esencialmente dos ganglios ubicados en ambas caras laterales de la próstata. Son llamados ganglios pelvianos mayores<sup>7</sup>. Se han identificado al menos dos aferencias, una del nervio hipogástrico, llevando fibras del ganglio mesentérico inferior y de la cadena simpática lumbar, y la segunda del nervio pélvico que aporta fibras sacras. Estos ganglios inervan la vejiga, la próstata, las vesículas seminales, el recto, la uretra y el pene. Se comprueba así que las ratas comparten el mismo esquema que otros mamíferos más grandes, pero de una manera más simple, con un solo ganglio pelviano y sólo dos aferencias. Esto constituye una gran ventaja a la hora de lesionar estas estructuras<sup>3</sup>. Estos hallazgos anatómicos son similares a los encontrados en nuestra experiencia.

En nuestro primer experimento realizamos la estimulación del ganglio pelviano previo a la denervación y comprobamos la erección en todos los animales. Este fue un paso muy importante para validar el sitio de la injuria neurológica y comprobar el grado de respuesta luego de la misma. En otros trabajos se han realizado estimulaciones de manera similar, aunque no hay consenso acerca de los protocolos usados en cuanto al tiempo, el amperaje y el voltaje necesario. No obstante, nuestro protocolo se aproximó a otros, tales como el de *El-Sakka* que también utilizó un electrodo bipolar tipo gancho de acero inoxidable con una distancia de solo 1 mm entre cada polo, empleando pulsos monofásicos, también de onda cuadrada de 1.5 mAmp con una frecuencia de 20 Hz y una duración de 0.2 msec durante un tiempo de 50 segundos para cada lado<sup>8</sup>. En algunos trabajos, a la simple observación de la erección lograda se les agregó la medición directa de la Presión Intracavernosa (PIC) mediante la punción en cada cuerpo con una aguja conectada a una delgada guía con solución salina la que se une a un manómetro que registra los incrementos de la PIC desde 3 a 5 cm H<sub>2</sub>O a 35-40 cm H<sub>2</sub>O. Según las experiencias en electroestimulación del ganglio pelviano de la rata, *F. Giuliano* describió como sitio elegido el segmento infragangliar correspondiente a las fibras del nervio erector de la rata (2 a 3 mm por debajo); logró la respuesta eréctil de los cuerpos cavernosos pero no del glande (como en nuestro caso) que se sostenía de 1 a 4 minutos después de una sesión de estimulación con registros superiores medidos en mm Hg de 15 a 90 según el caso<sup>9</sup>. Otros autores como *J. Rehman* utilizando materiales y protocolo similar al nuestro sólo lograron respuestas tumescentes de hasta 35 cm de H<sub>2</sub>O en ratas *Fischer* normales<sup>10</sup>. Si bien no hemos efectuado la medición

de la presión intracavernosa, ya que los animales de la experiencia preparatoria debían ser denervados luego de la estimulación y luego nuevamente estimulados, la duración y la magnitud de la respuesta tumescente lograda y fotografiada sirvió como prueba de la localización del ganglio, del área donde debía ser producida la escara y de los resultados de la electroestimulación post escara. La estimulación bilateral consiguió erecciones más duraderas que la unilateral<sup>3</sup>. En humanos se han realizado experiencias con estimulación intraoperatoria durante la prostatectomía radical para identificar la posición de los nervios ante una difícil disección con resultados importantes<sup>1</sup> aunque su uso no es rutinario ya que habitualmente se puede identificar la anatomía con relativa precisión<sup>11</sup>.

En el trabajo de *Walsh* donde efectuaron la descripción anatómica, a partir de más de 200 disecciones en animales, utilizaron magnificación con microscopio quirúrgico, pero los autores aclaran que tanto el ganglio pélvico mayor como el nervio cavernoso tienen un tamaño que los hace visibles al ojo humano sin magnificación, constituyendo una ventaja de este modelo frente a otros donde es necesaria la visión ampliada<sup>3</sup>.

Siguiendo esta línea de investigación el mismo grupo publicó un trabajo donde realizaron la neurotomía a un grupo de ratas, resecaando 5 mm de nervio y le interpusieron un segmento de nervio genitofemoral. A los 4 meses, en el grupo con la neurotomía sólo se lograron un 10 % de erecciones, mientras que en el grupo con el graft se identificaron un 50 % de erecciones<sup>2</sup>. Posteriormente también han realizado experiencias con factores de crecimiento neurales y otros injertos con resultados alentadores<sup>12</sup>.

Esa técnica de neurotomía fue utilizada también por otros autores con pocas variantes y siempre requiriendo magnificación con microscopio, que podía llegar a 40 X en algún caso<sup>4</sup>. Dicha magnificación lleva a una precisa identificación de los nervios, pero requiere entrenamiento y materiales costosos, como el hilo de sutura utilizado, un Dermalon de 7/0.

La necesidad de seccionar y suturar el nervio depende del tiempo de sobrevida que se pretende alcanzar, ya que en trabajo con menos días de sobrevida postoperatoria realizaron la sección sin ligadura del nervio. En un trabajo con 10 días de seguimiento postoperatorio sólo se seccionaron los nervios, sin ayuda de magnificación<sup>13</sup>.

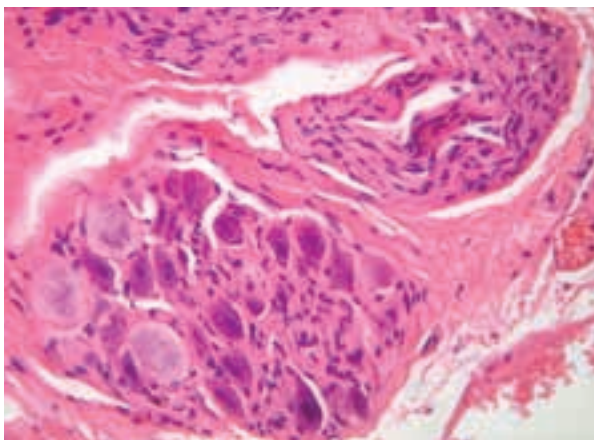
En algunas comunicaciones los testículos fueron resecaados bilateralmente previo a la neurotomía y recolocados en el tejido subcutáneo para evitar fluctuaciones de la testosterona durante la manipulación de los mismos para efectuar la neurotomía. Este grupo utilizó también la magnificación con microscopio<sup>14</sup>. En nues-

tra técnica, debido a la economía de la laparotomía, los testículos quedan contenidos en su cavidad escrotal sin que se proyecten hacia la herida, haciendo dificultosa en tal caso la denervación.

En nuestro modelo se efectúa una neurotomía por electrocauterio. La gran ventaja consiste en que se puede realizar de manera fácil y rápida, sin requerir prolongados tiempos operatorios que ponen en riesgo al animal, ni costosos instrumentos de magnificación, que traen aparejados costosos elementos de trabajo como pinzas, porta agujas e hilos de sutura más finos. La lesión por calor es una causa importante de la lesión neural durante la prostatectomía radical, por lo que el modelo propuesto brinda una aceptable similitud con la realidad.



**Figura 19.** Macrofotografía del pene de la rata, presenta tres sectores; el distal que aloja un cuerpo óseo y no es útil para los estudios histológicos ni moleculares: el medio, apto para ser estudiado y el crural, revestido por la musculatura estriada isquiocavernosa y bulbocavernosa.



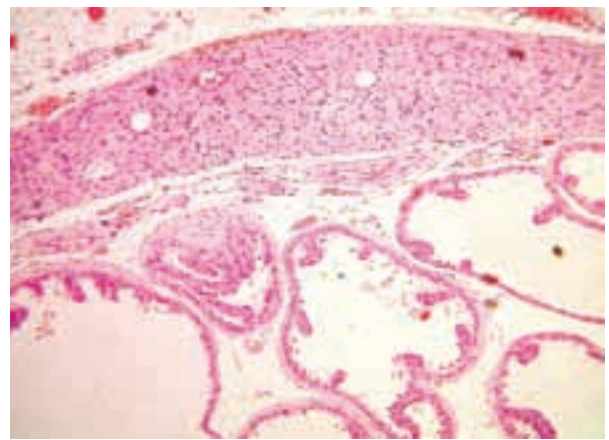
**Figura 21.** Imagen microscópica de 400X teñida con hematoxilina eosina, lo que permite visualizar en la cápsula prostática un filete nervioso (superior) emergiendo de un conglomerado neuronal (inferior).

## CONCLUSIÓN

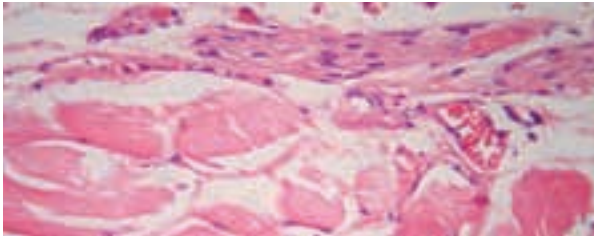
Se describe una técnica quirúrgica experimental simplificada para la denervación unilateral o bilateral de los cuerpos cavernosos en un modelo experimental de ratas *Wistar Kyoto*. Esta técnica acelera el tiempo quirúrgico, ya que a diferencia de la mayoría de las publicadas (que manipulan los filetes nerviosos correspondientes a los nervios erectores), los secciona mediante diatermia sin requerir microscopia óptica, sólo lupas o a ojo desnudo. La certeza de la técnica empleada, así como sus resultados, fueron corroborados con estudios de neuroestimulación *in vivo*, histología de las estructuras lesionadas y evaluaciones histológicas y de biología molecular de la alteración sufrida por el tejido eréctil a causa de la denervación.



**Figura 20.** Pieza fijada en formol donde se ha seccionado el segmento apical de la próstata ventral para visualizar las estructuras neurales del ganglio pelviano que serán sometidas a electroablación.



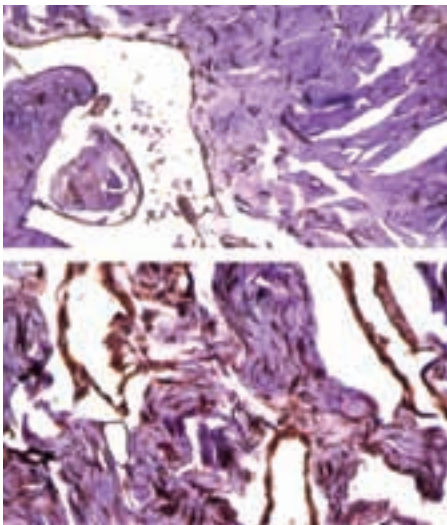
**Figura 22.** Con igual tinción y menor aumento se permite apreciar la estructura neural correspondiente al ganglio pelviano (superior) adyacente a los ácinos de la glándula prostática.



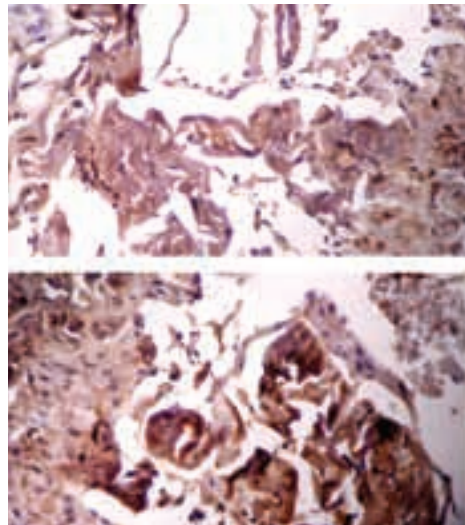
**Figura 23.** Eferencia del ganglio pelviano correspondiente a fibras amielínicas que inervarán los cuerpos cavernosos.



**Figura 24.** Laboratorio de medicina experimental de la Cátedra de Urología donde se procesan las muestras para realizar estudios de microscopía, inmunohistoquímica y biología molecular con Western Blot.



**Figura 25.** Imagen microscópica de tejido cavernoso 400X, teñida con técnica de inmunohistoquímica con peroxidasa y anticuerpo monoclonal para evaluar la expresión de alfa actina. La imagen superior corresponde a un pene de rata luego de 12 semanas de denervado, con escasa expresión de alfa actina (tinción marrón). La imagen inferior corresponde a un cuerpo cavernoso normal, de rata no denervada (sham) con abundante expresión de alfa actina, lo que manifiesta la indemnidad del músculo liso cavernoso.



**Figura 26.** Imagen microscópica de tejido cavernoso 400X, teñida con técnica de inmunohistoquímica con peroxidasa y anticuerpo monoclonal para evaluar la expresión de caveolin-1. La imagen superior corresponde a un pene de rata luego de 12 semanas de denervado, con escasa expresión de caveolin-1 (tinción marrón). La imagen inferior corresponde a un cuerpo cavernoso normal, de rata no denervada (sham) con abundante expresión de caveolin-1, lo que manifiesta la indemnidad del tejido eréctil.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Impotence following radical prostatectomy: insight into etiology and prevention. Walsh P, Donker PJ. 1982, *J Urol*, Vol. 128, pp. 492-497.
2. Cavernous Nerve Grafts Restore Erectile Function in Denervated Rats. Quinlan DM, Nelson RJ, Walsh P. 1991, *J Urol*, Vol. 145, pp. 380-383.
3. The Rat as a Model for the Study of Penile Erection. Quinlan DM, Nelson RJ, Partin A, Mostwin J, Walsh P. 1989, *J Urol*, Vol. 141, pp. 656-661.
4. Regeneration of Nitric Oxide Synthase-Containing Nerves after Cavernous Nerve Neurotomy in the Rat. Carrier S, Zvara P, Nunes L, Kour N, Rehman J, Lue T. 1995, *J Urol*, Vol. 153, pp. 1722-1727.
5. Hemodynamics of the canine corpora cavernosa during erections. Lue T, Takamura T, Umraiya M y cols. 1984, *Urology*, Vol. 24, p. 347.
6. Innervation of the Pelvic Organs of the Rat. Langworthy, O. 1965, *Invest Urol*, Vol. 2, p. 491.
7. The Major Ganglion in the Pelvic Plexus of the Male Rat. Dail W, Evan A, Eason H. 1975, *Cell Tis Res*, Vol. 159, p. 49.

8. Effect of Cavernous Nerve Freezing on Protein and Gene Expression of Nitric Oxide Synthase in the Rat Penis and Pelvic Ganglia. El-Sakka A, Hassan M, Selph C, Parinchery G, Dahiya R, Lue T. 1998, *J Urol*, Vol. 160, p 2245.
9. Neural control of penile erection in the rat. Giuliano F, Rampin O, Bernabé J, Rousseau JP. 1995, *J Auton Nerv Syst*. Vol. 55 (1-2), p 36-44.
10. Intracavernous Pressure Response to Physical and Electrical Stimulation of the Cavernous Nerve in Rats. Rehman J, Christ G, Melman A, Flishman J. 1998, *Urology*, Vol. 51, p 640.
11. Precise Localization of the Autonomic Nerves from the Pelvic Plexus to the Copora Cavernosa: a Detailed Anatomical Study of the Adult Male Pelvis. Lepor H, Gregerman M, Crosby R, Mostofi F, Walsh P. 1965, *J Urol*, Vol. 133, p. 207.
12. Nerve Growth Factor, Nerve Grafts and Amniotic Membrane Grafts Restore Erectile Function in Rats. Burgers J, Nelson RJ, Quinlan DM, Walsh P. 1991, *J Urol*, Vol. 146, p. 463.
13. Effect of sildenafil administration on penile hypoxia induced by cavernous neurotomy in the rat. Vignozzi L, Morelli A, Filippi S y cols. 2008, *Int J Impot Res*, Vol. 20, pp. 60-67.
14. Regulation of Cavernous Nerve Injury-Induced Apoptosis by Sonic Hedgehog. Podlasek C, Meroz C, Tang Y, McKenna K, McVary T. 2007, *Biol Reprod*, Vol. 76, pp. 19-28.