



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA Y BIOFÍSICA

**ENFERMEDAD DE PARKINSON Y SÍNTOMAS URINARIOS:
ESTUDIO CLÍNICO Y EN MODELOS ANIMALES**

**Tesis presentada para optar al
Grado de Doctor por
Rafael Barrero Candau**

Sevilla, junio de 2008

D. JUAN JOSE TOLEDO ARAL, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA Y BIOFÍSICA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA, Y **D. JOSE M^a PENA OUTERIÑO**, PROFESOR DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA, certifican:

Que D. Rafael Barrero Candau ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado “Enfermedad de Parkinson y síntomas urinrios: estudio clínico y en modelos animales”, que presenta para optar al grado de Doctor.

Fdo. Prof. Juan J. Toledo Aral

Fdo: Prof. José M^a Pena Outeiriño

Sevilla, junio de 2008

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Juan José Toledo Aral y al Prof. José M^a Pena Outeriño, por su apoyo en el trabajo diario, su estímulo constante como directores en la elaboración de este trabajo y por todo lo que me han enseñado a lo largo de estos años de formación como investigador.

Al Profesor López Barneo, director del Laboratorio de Investigaciones Biomédicas y a todo su grupo, especialmente a los Drs. Simón Méndez y Javier Villadiego, por su paciencia y dedicación en mi aprendizaje de las técnicas de lesión estereotaxica y de inmunohistoquímica. Al Dr. Pablo Mir por su inestimable colaboración en la parte clínica de este trabajo.

Al Profesor Karl Eric Andersson y a todo su equipo de la Universidad de Lund (Suecia), por la generosidad y claridad en la enseñanza y práctica de las técnicas de urodinámica en la rata y el ratón.

A D. Juan Carlos del Chica y D. Pedro Rodríguez del Servicio de Electromedicina, por su apoyo en la obtención de todo el material y puesta a punto necesarios para la realización de los estudios urodinámicos.

A D. José Leal Arenas, por los dibujos realizados para ilustrar la exposición del material y método de éste trabajo, y al Dr. Aurelio Cayuela, por su ayuda en el análisis estadístico de los datos obtenidos en este estudio.

A mis compañeros del Servicio de Urología y especialmente a mis compañeros de residencia (Belén, Enrique, Maripaz y Javier) que me han permitido, con cambios de guardias y multitud de favores, sacar el tiempo necesario para la

realización de este trabajo. A mis actuales compañeros de la Unidad de Gestión de Cirugía Pediátrica por su aliento en la fase final de la tesis.

Al Departamento de Ingeniería Electrónica de la Escuela Superior de Telecomunicaciones de la Universidad de Sevilla, por su colaboración en la digitalización de la señal analógica con la que trabajamos inicialmente.

A Maria José Escobar por la colaboración en la realización de los estudios urodinámicos en humanos y a Blanca de la consulta de Parkinson por su colaboración.

A la fundación para la Investigación en Urología por haber financiado este trabajo.

A María, mi esposa y a mis padres ... por todo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

1. Anatomía y fisiología de la micción

- 1.1. Morfología vesicouretral
- 1.2. Inervación vesicouretral
 - 1.2.1. Eferencias vesicouretrales
 - 1.2.2. Aferencias vesicouretrales
 - 1.2.3. Núcleos y vías del SNC que regulan la micción
- 1.3. Fisiología de la micción.
- 1.4. Estudio urodinámico

2. Alteraciones de la función vesicouretral

- 2.1. Hiperactividad del detrusor (HDD)
- 2.2. Tratamiento de la HDD

3. Enfermedad de Parkinson (EP) y síntomas urinarios

- 3.1. Enfermedad de Parkinson
- 3.2. Sintomatología urinaria e HDD en la EP
- 3.3. Tratamientos utilizados para la HDD en la EP
- 3.4. Etiología de la HDD en la EP y dificultad para su estudio

4. Estudio urodinámico en animales de experimentación

5. Modelos animales de parkinsonismo

6. Estudios urodinámicos en animales parkinsonianos

II. OBJETIVOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Etapa clínica

- 1.1. Pacientes incluidos y estudios realizados
- 1.2. Criterios de diagnóstico urodinámico
- 1.3. Análisis de los resultados del estudio clínico

2. Etapa experimental

- 2.1. Animales de experimentación
- 2.2. Técnica quirúrgica de implantación de los catéteres vesical y peritoneal
- 2.3. Modelo urodinámico animal
 - 2.3.1. Adaptación y calibración del equipo experimental
 - 2.3.2. Registro del estudio urodinámico en ratas
 - 2.3.3. Digitalización de la señal
 - 2.3.4. Variables de estudio
- 2.4. Método utilizado para producir parkinsonismo central bilateral
- 2.5. Estudio histológico
- 2.6. Análisis de los resultados histológicos
- 2.7. Análisis de los resultados urodinámicos

IV. RESULTADOS

1. Resultados de la investigación clínica

- 1.1. Correlación entre síntomas urinarios y neurológicos en la EP
- 1.2. Alteraciones urodinámicas observadas
- 1.3. Respuesta al tratamiento con tolterodina y causas de HDD identificadas

2. Resultados de la experimentación animal

- 2.1. Desarrollo y puesta a punto del estudio urodinámico en ratas
 - 2.1.1. Artefactos, errores controlados y ajustes realizados
 - 2.1.2. Resultados del estudio urodinámico en ratas controles
- 2.2. Comprobación de la localización esterotáxica del tercer ventrículo
- 2.3. Resultados de la inyección intraventricular de suero salino
 - 2.3.1. Estudios urodinámicos
 - 2.3.2. Análisis inmunohistoquímico
- 2.4. Resultados del parkinsonismo central bilateral
 - 2.4.1. Resultados urodinámicos
 - 2.4.2. Análisis inmunohistoquímico
- 2.5. Validación farmacológica del modelo de HDD secundario a lesión dopaminérgica bilateral

V. DISCUSIÓN

1. Sintomatología urinaria en la EP
2. Tratamientos de los síntomas urinarios en la EP
3. Aproximación a la etiología de la sintomatología urinaria en la EP
4. Modelos urodinámicos en animales de experimentación
5. Validez del modelo urodinámico desarrollado
6. Modelo animal de parkinsonismo utilizado
7. Lesión dopaminérgica producida
8. Variaciones observadas en ratas con lesión dopaminérgica bilateral
9. Aportaciones del modelo al conocimiento de la etiología de la HDD en la EP
10. Acción de L-dopa sobre la función vesical de los pacientes con EP
11. Variaciones en el circuito de control neurológico de la micción en la EP

VI. CONCLUSIONES

VII. ANEXOS

VIII. BIBLIOGRAFÍA

I. INTRODUCCIÓN

Los pacientes con Enfermedad de Parkinson (EP) presentan un mayor porcentaje de síntomas urinarios e incontinencia que la población general de su misma edad. Esta mayor frecuencia de síntomas urinarios es secundaria a contracciones involuntarias de la musculatura lisa vesical, y se denomina hiperactividad del detrusor (HDD) (Murnaghan, 1961; Berger, 1987; Martínez Agulló, 1992; Stocchi, 1997; Lemack, 2000; Araki 2000). La HDD en la EP puede deberse a la propia EP o a la suma de diversas circunstancias que concurren en la EP y que son por sí solas causas de HDD, como son: la ancianidad, la obstrucción al flujo de salida que produce la hiperplasia benigna de próstata, y el tratamiento farmacológico de la propia EP.

En una etapa inicial en pacientes con EP y síntomas urinarios, se realizó cuestionarios de síntomas (motores y urinarios), estudio urodinámico y análisis de las posibles causas de HDD. Los resultados de este estudio muestran como en humanos resulta prácticamente imposible obtener un grupo homogéneo de enfermos parkinsonianos, en el que se eviten estas causas de HDD que se dan en la EP y que invalidarían el estudio para conocer si la propia EP es causa de HDD.

La posibilidad de desarrollar en el Hospital Universitario Virgen del Rocío los modelos animales de parkinsonismo con el que se evitan estas otras causas de HDD y la puesta a punto de los estudios urodinámicos en ratas, ha permitido observar las alteraciones urodinámicas que produce la lesión dopaminérgica central bilateral, que es la lesión característica de la EP. Este trabajo muestra como la investigación básica ayuda a profundizar en cuestiones difíciles de responder desde la investigación clínica. Además este modelo animal puede ser de utilidad en el ensayo de fármacos dirigidos al tratamiento de la HDD asociada a la EP y otras enfermedades neurológicas.

1. Anatomía y fisiología de la micción

1.1. Morfología vesicouretral

El tracto urinario inferior se compone de vejiga, esfínter uretral y uretra. Estas estructuras más la musculatura del suelo pélvico se comportan como una unidad funcional que permite una micción coordinada. La vejiga es un órgano muscular hueco, con una capacidad de almacenamiento de aproximadamente 350 - 400 ml. Se puede dividir en tres partes: cuerpo vesical, trigono y cuello vesical o esfínter interno (figura 1).

El cuerpo vesical está compuesto por un vértice o cúpula, una cara anterior y dos caras posterolaterales. Estructuralmente la pared muestra: i) la mucosa, constituida por un epitelio transicional, ii) la submucosa, tejido laxo que facilita la formación de pliegues cuando la vejiga está vacía y el almacenamiento de grandes volúmenes a baja presión y iii) el músculo liso detrusor que se contrae durante la micción (Latarget, 1982; Gosling, 1990).

En la base vesical se distinguen tres regiones: unión uretero-vesical, trigono y cuello vesical. La unión ureterovesical es el segmento yuxtavesical de los uréteres y se encuentra rodeado por un manguito fibromuscular incompleto, denominado vaina de Waldeyer (Wordburn, 1964; Tanagho, 1988; Gosling, 1990). El trigono es un área de morfología triangular situada en la cara pósteroinferior de la vejiga y delimitada por los orificios ureterales y el meato uretral interno. El músculo liso existente en esta área se divide en dos capas, denominadas superficial y profunda (Tanagho, 1988; Gosling, 1990). En ambos sexos este músculo trigonal se continúa con el músculo liso de la uretra posterior. En el hombre se extiende a lo largo de la cresta uretral hasta la apertura de los conductos eyaculadores, mientras que en la mujer parece mezclarse con el músculo longitudinal de la uretra posterior. Si bien, los haces del músculo trigonal están dispuestos anárquicamente entremezclándose

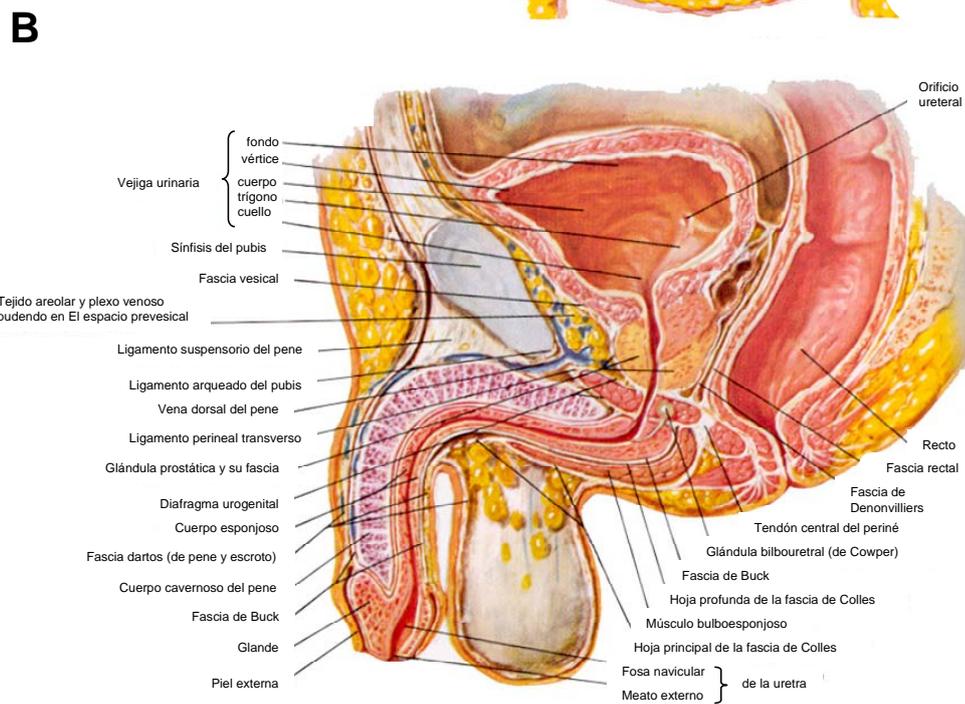
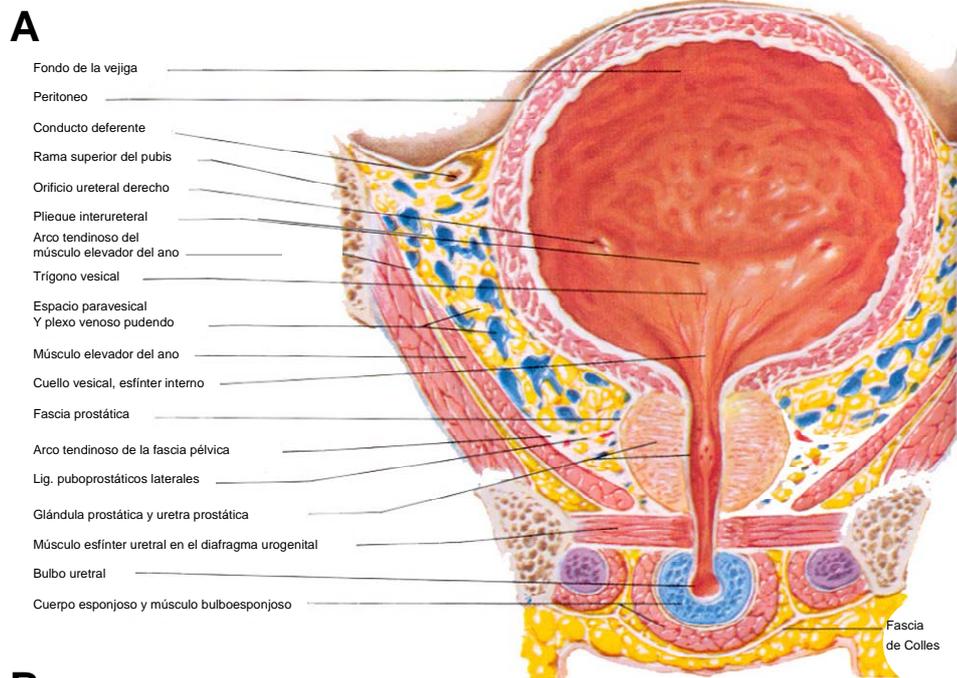
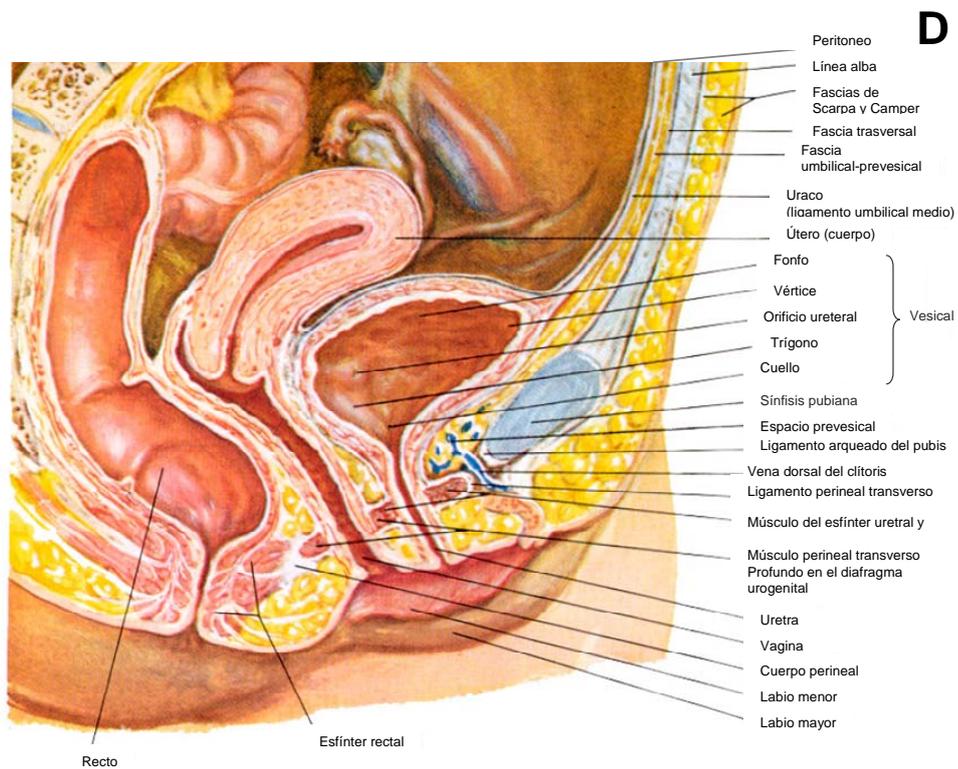
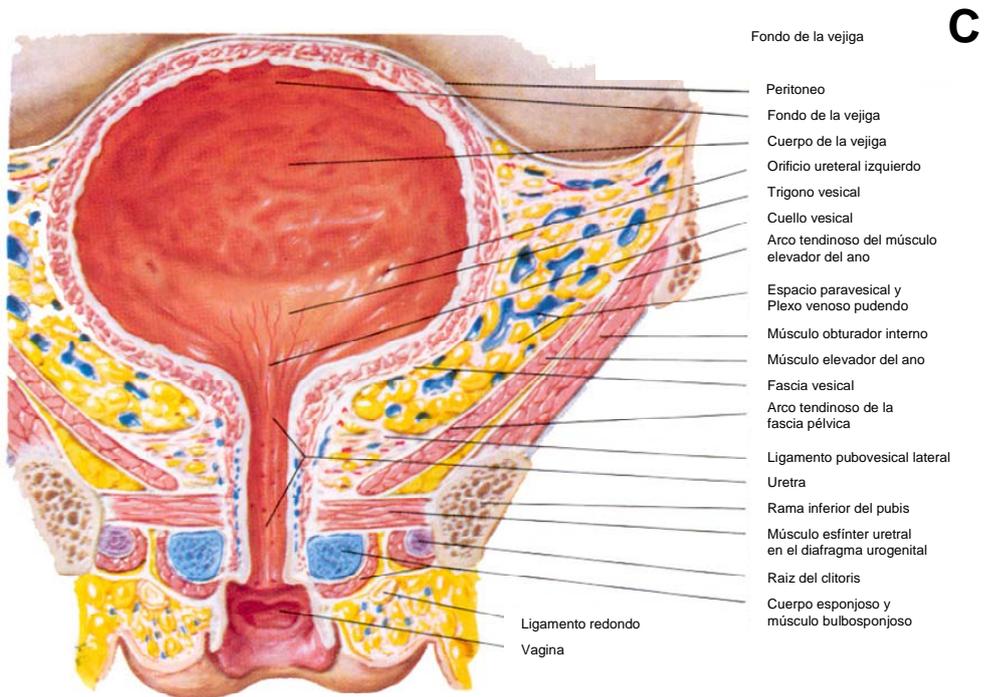


Figura 1: Anatomía del tracto urinario inferior masculino (A-B) y femenino (C-D). (Modificadas de Netter 2000)



entre sí y no formando capas bien definidas, a medida que nos acercamos al cuello vesical hay una tendencia a organizarse en dos capas longitudinales (externa e interna) y una capa circular media (Tanagho, 1988). El músculo liso del cuello vesical es histológica y farmacológicamente distinto al músculo detrusor (Gosling, 1990).

La uretra, último segmento de las vías urinarias, es un conducto a través del cual la orina es expulsada al exterior. Difiere considerablemente en el hombre y en la mujer. La uretra masculina tiene una longitud de 15 a 20 cm que se extiende desde el cuello vesical hasta la extremidad libre del pene. Presenta tres porciones según sus relaciones anatómicas: uretra prostática, uretra membranosa y uretra esponjosa. La uretra prostática o posterior inmediata al cuello vesical presenta un esfínter interno de fibras lisas, rico en fibras noradrenérgicas, que se contraen en el momento de la eyaculación, de modo que impiden junto con la contracción del cuello vesical, el flujo retrógrado de semen hacia la vejiga. Posteriormente se ensancha el conducto y atraviesa la próstata, donde distalmente posee una capa de fibras musculares dispuestas circularmente que se continúan con el esfínter uretral externo, situado en la pared de la uretra membranosa, porción mas corta y angosta de la uretra. El esfínter externo presenta una capa interna de músculo liso y una capa externa de músculo estriado intrínseco. Cuando la uretra atraviesa el suelo pelviano, su pared se rodea de fibras estriadas procedentes de los músculos del mismo. Así en el esfínter externo se distinguen tres elementos: músculo liso uretral de inervación noradrenérgica (plexo hipogástrico); músculo estriado intrínseco uretral de inervación colinérgica (plexo pelviano); y músculo estriado extrínseco o periuretral, innervado por el nervio pudendo (Elbadawi, 1982). La mayoría de las fibras del esfínter uretral externo son de contracción lenta contribuyendo al tono uretral que permite la continencia. Las fibras de contracción rápida facilitan la continencia en situaciones de aumento de la presión intravesical (Gosling, 1979). La uretra esponjosa, incluida en el cuerpo esponjoso del pene, desemboca en el meato externo.

La uretra femenina de sólo 4 cm de longitud, consta de una túnica mucosa interna y una capa muscular externa que a su vez se compone de una capa interna de músculo liso y otra externa de músculo estriado. Estas fibras son de contracción lenta y ejercen un tono constante sobre la luz uretral. La zona periuretral del elevador del ano está formada por fibras de musculatura estriada de contracción rápida que permite el cierre uretral cuando aumenta la presión intravesical (Gosling, 1979).

Los músculos del suelo pélvico pueden repartirse en dos grupos: el músculo diafragmático (diafragma urogenital), que soporta las vísceras pélvicas y forma realmente el suelo de la pelvis, y los haces musculares puborectal y pubouretral, que ayudan al control esfinteriano de las respectivas estructuras (Mundy, 1987). Los músculos del suelo pélvico y los ligamentos pubouretrales sujetan el tracto urinario inferior. Los músculos pelvianos elevan y alargan la uretra, fortaleciendo el mecanismo esfinteriano y en situaciones de estrés ayudan a la continencia urinaria, y como tal, se consideran parte del mecanismo esfinteriano uretral. De este modo, el conjunto de los músculos del suelo pélvico, la musculatura vesical y uretral descritas, forman una sola unidad funcional.

1.2. Inervación vesicouretral

Desde un punto de vista anatómico, el sistema nervioso periférico encargado de la inervación de la unidad funcional ya descrita, se compone de aferencias y eferencias vesicouretrales. Las vías centrales que a su vez controlan esta unidad funcional, se dividen en medulares y supraespinales.

1.2.1. Eferencias vesicouretrales

Hacia la unidad funcional vesicouretral proyectan por un lado, las fibras simpáticas y parasimpáticas del sistema nervioso autónomo, y por otro, las fibras del sistema nervioso somático, que median el control voluntario de la micción.

Ambas comparten, en ocasiones, vías anatómicas como son los nervios pélvicos, hipogástricos y pudendos (figura 2).

Parasimpática

Las fibras preganglionares parasimpáticas parten del asta intermediolateral de la sustancia gris medular a nivel sacro, metámeras S2 a S4, (De Groat, 1984 y 1988). Abandonan la médula por las raíces ventrales, constituyendo el nervio pélvico y hacen sinapsis en los ganglios periféricos del plexo pélvico y los ganglios intramurales, íntimamente ligados a los órganos pélvicos que inervan (Gilpin, 1983; Crowe, 1988) (figura 2).

El neurotransmisor preganglionar es la acetilcolina (Ach), que activa receptores nicotínicos en los ganglios periféricos. La Ach es también el neurotransmisor postganglionar a través de receptores muscarínicos (M2 y M3) del músculo liso del detrusor, provocando su contracción (Strees, 1998). La eferencia parasimpática produce, en general un estímulo excitatorio sobre el detrusor e inhibitorio sobre el esfínter uretral interno.

Simpática

Las vías simpáticas eferentes nacen en el asta intermediolateral toracolumbar, D10-L2, accediendo por las raíces ventrales al ganglio mesentérico inferior o a la cadena ganglionar lumbosacra, donde realizan sinapsis para luego confluir en el plexo presacro, sobre la superficie de los grandes vasos, de donde parten ambos nervios hipogástricos hacia el plexo pélvico (Strees, 1998) (figura 2).

El neurotransmisor preganglionar es la Ach, que actúa sobre receptores nicotínicos. La adrenalina es el neurotransmisor postganglionar más importante y actúa sobre receptores α y β adrenérgicos. La eferencia simpática ejerce un efecto inhibitorio de la actividad detrusoriana (mediado por receptores β) y facilitador del tono del esfínter uretral interno (mediado por receptores α) en la fase de llenado (Jänig, 1987).

Somática

Las eferencias somáticas emergen de las neuronas del asta anterior de la médula sacra, segmentos S2-S4. Estas neuronas componen el núcleo de Onuff, que está interconectado con el núcleo parasimpático del mismo nivel medular (De Groat, 1986). Los axones de las motoneuronas entran en la pelvis formando el nervio pudendo que inerva el esfínter estriado externo y la musculatura del suelo pélvico. Sin embargo, también hay evidencias de inervación del esfínter externo a través del nervio pélvico (Andersson, 1982; De Groat, 1986) (figura 2).

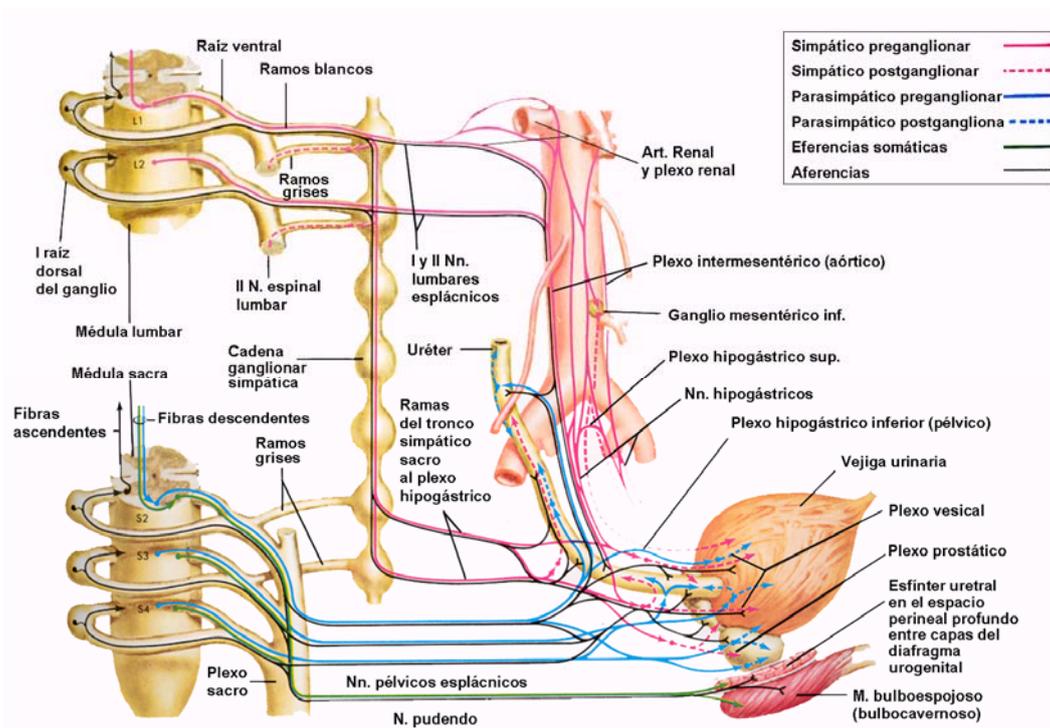


Figura 2. Estructuras que participan en la inervación simpática, parasimpática y somática del tracto urinario. (Modificada de Netter 2000)

Además de los neurotransmisores ya comentados la persistencia de contracción del músculo detrusor a pesar del bloqueo adrenérgico y colinérgico, sugiere que además de NA y Ach, otros neurotransmisores están implicados en el funcionamiento vesical, sin que se sepa claramente por que vías nerviosas actúan (Deplanne, 1998). Entre estos neurotransmisores están la sustancia P, el péptido intestinal vasoactivo, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (Maggi, 1988), el óxido nítrico (Smeth, 1996) y el ATP (Tong, 1997).

1.2.2. Aferencias vesicouretrales

La información sensorial del aparato urinario, imprescindible para su correcto funcionamiento es recogida principalmente por el nervio pélvico, que se dirige hacia los ganglios dorsales de la región lumbosacra. Las aferencias más importantes implicadas en el inicio de la micción son las fibras A-delta (mielínicas) y las fibras C (amielínicas). Ambas se activan con los cambios de tensión de la pared vesical (De Groat, 1985). Las fibras C se modulan también con distintos mediadores inflamatorios y la capsaicina (tabla. 1). La importancia de la aferencia se refleja en la utilidad clínica de la estimulación periférica para la inhibición de la actividad del detrusor, o la de “modulación” del funcionamiento vesicouretral mediante la estimulación de raíces sacras (Smith, 1991).

Tabla 1: Propiedades de las aferencias vesicales.

Tipo de fibra	Localización	Función normal	Efecto de mediadores inflamatorios
Fibras A- delta (axones mielinizados)	Músculo liso	Responden a la tensión en la pared muscular vesical	Incrementan su actividad durante la distensión y disminuyen la presión umbral.
Fibras - C (axones amielínicos)	Mucosa	Responden al estrechamiento de la mucosa (sensores de volumen vesical)	Incrementan su actividad durante la distensión y disminuyen la presión umbral.
Fibras - C (axones amielínicos)	Mucosa	Insensibles a la distensión vesical normal (aferencias “silenciosas”)	Aferencias se comportan como mecanosensitivas y se convierten en una nueva aferencia en la inflamación
Fibras - C (axones amielínicos)	Mucosa? Muscular? Serosa?	Sensibles a la sobredistensión (nociceptores)	sensible a algunos irritantes?

(Modificada de Morrison 2002)

1.2.3. Núcleos y vías del SNC que regulan la micción

Las estructuras del sistema nervioso central que participan en el reflejo miccional y de almacenamiento de orina (los reflejos se explican posteriormente con detalle en el punto 1.3), pueden dividirse desde un punto de vista anatómico en espinales y supraespinales. Pero desde un punto de vista funcional se dividen en estructuras que forman parte del reflejo miccional y de almacenamiento o estructuras secundarias que modulan estos reflejos (figura 3).

Espinales

Las eferencias procedentes de núcleos superiores descienden por los haces retículo-espinales en los cordones laterales de la médula. Dichos haces se decusan antes de llegar a la metámera correspondiente, interconectando con los centros medulares simpático (núcleo simpático intermediolateral), parasimpático (núcleo sacro parasimpático) y somático (núcleo de Onuf) de la médula.

Las aferencias propioceptivas vesicouretrales, están mediadas por fibras A-delta que se dirigen hacia el asta posterior de la médula y realizan sinapsis con motoneuronas del asta ventral, cerrando así el arco reflejo sacro. Además proyectan sus axones, a través de los cordones posteriores espinales, a la región pontina. La aferencia esteroceptiva (dolorosa y térmica) transportada por las fibras C, asciende por el haz espinotalámico hacia el tálamo (Bradley, 1982).

Supraespinales.

Los estímulos propioceptivos vesicales que van por los cordones posteriores medulares son recogidos en la formación reticular pontomesencefálica, concretamente por el centro dorso medial de Barrington o centro miccional pontino (CMP) (Barrington, 1921). Dicho centro, origen de las motoneuronas vesicales, se localiza en la región anterior del puente y es facilitador de la actividad detrusoriana (Bradley, 1968, 1974 y 1982), a la vez que disminuye la contracción de la musculatura estriada periuretral (Carlsson, 1978), consiguiendo la micción coordinada. Para ello, está interconectado con otras estructuras corticales y subcorticales: cerebelo, ganglios basales, tálamo y corteza cerebral. La desconexión experimental del CMP de las estructuras superiores del SNC causa hiperactividad del detrusor (Espey, 1995).

Lateralmente al CMP, se sitúa el centro de almacenamiento o región “L” (lateral), que contiene neuronas que proyectan fundamentalmente a las motoneuronas del esfínter uretral externo (núcleo de Onuf). Participa en el reflejo de almacenamiento y su lesión bilateral en el animal de experimentación produce hipertonia del esfínter uretral externo (Holstege, 1996). Estudios del tronco encefálico mediante PET han puesto de manifiesto la activación del CMP y de la

región “L” durante las fases de vaciado y almacenamiento vesical, respectivamente (Blok, 1997)

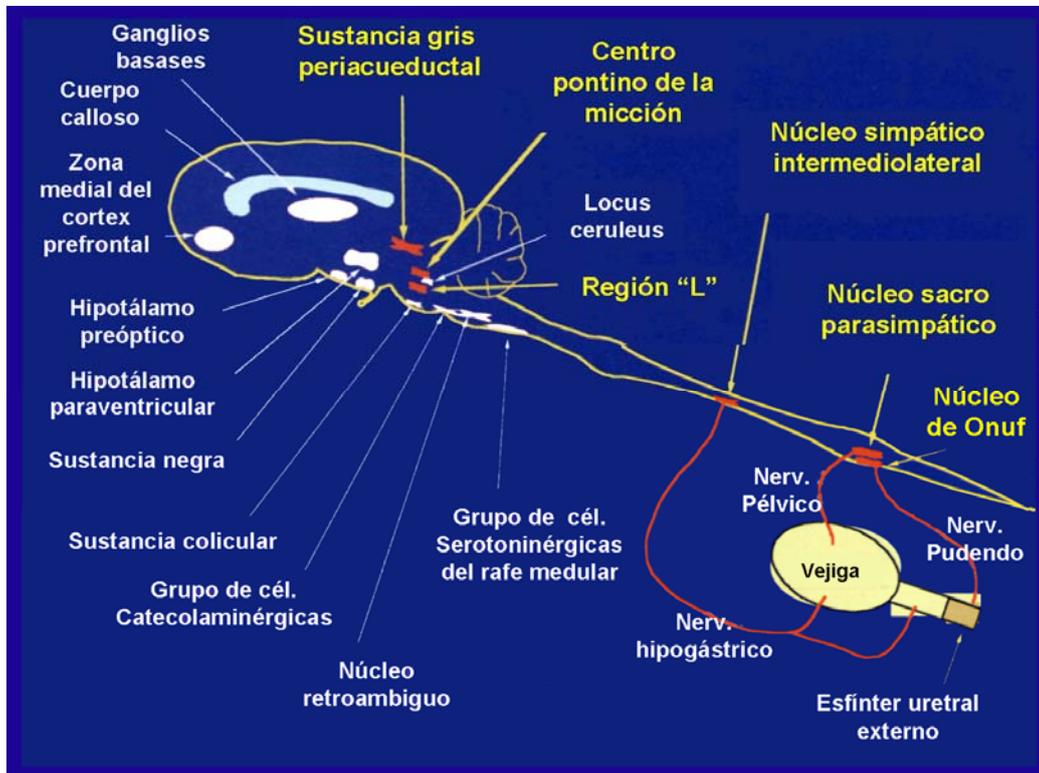


Figura 3. Esquema simplificado de los núcleos y vías nerviosas implicadas en la regulación nerviosa del tracto urinario inferior. En rojo las principales estructuras que participan en los reflejos miccionales y de almacenamiento de orina. En blanco las estructuras secundarias o moduladoras de dichos reflejos (Modificada de Morrison., 2002).

Núcleos y vías del SNC que modulan el reflejo miccional

Estudios morfológicos de las proyecciones axonales en combinación con estudios neurofisiológicos han identificado muchas zonas del cerebro que pueden modular la función vesical, como son: el locus ceruleus, las células serotoninérgicas del rafe medio, el núcleo retroambiguo, las células catecolaminérgicas del tronco del encéfalo (región A5), las células dopaminérgicas de la sustancia negra, los colículos, los núcleos preóptico y paraventricular del hipotálamo, el cortex medial prefrontal, el cuerpo caloso y los ganglios de la base (figura 3).

Sobre la acción moduladora de algunas de estas zonas, se sabe que: el asta posterior de la médula, el núcleo parasimpático sacro y el núcleo de Onuf están densamente inervados por terminaciones nerviosas con inmunoreactividad serotoninérgica y también exhiben alta concentración de receptores serotoninérgicos (Kojima, 1983; Rajaofreta, 1992; Ramírez, 1994). La mayoría, de las neuronas serotoninérgicas que proyectan a la médula se localizan en los núcleos del rafe (figura 3) (Willis, 1997). Así tras la inyección de un trazador trans-sináptico retrógrado como es el pseudovirus de la rabia en vejiga o en el esfínter uretral externo, se marcan numerosas neuronas serotoninérgicas localizadas en los núcleos del rafe (Vizzard y col., 1995; Nadelhaft, 1996; Araki, 1997) (figura 4).

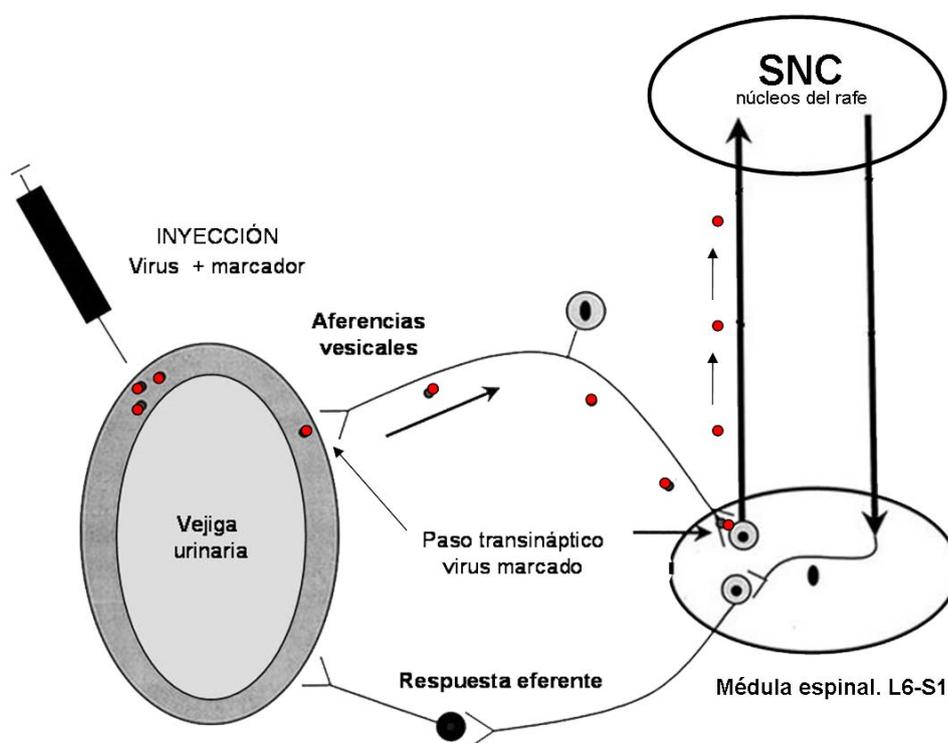


Figura 4: Esquema que muestra el desplazamiento retrogrado del pseudovirus de la rabia portador de un marcador inmunoreactivo (en rojo) que permite posteriormente estudiar histológicamente, donde proyectan las aferencias vesicales. (Modificada de Yoshimura y Chancellor, 2002)

Estudios de proyecciones serotoninérgicas anterógradas, muestran que las neuronas del rafe proyectan al núcleo de Onuf (Holstege, 1987). Además estudios electrofisiológicos muestran que las neuronas del rafe alteran su frecuencia de

disparo durante la distensión vesical (De Groat, 1993). Estos núcleos coexpresan transmisores inhibitorios, GABA y encefalinas (Ramírez, 1994). Por otro lado la estimulación química y eléctrica de los núcleos del rafe inhiben la actividad refleja de la vejiga (De Groat, 1993; Chen, 1993; Espey, 1998).

El sistema noradrenérgico del tronco del encéfalo también ha sido implicado en el control de la función del tracto urinario inferior (De Groat, 1993; Sasa y Yoshimura, 1994; Yoshimura, 1997). Estudios de terminaciones neuronales con marcadores transinápticos como el pseudovirus de la rabia marcado, muestran proyecciones adrenérgicas en la región A5 y la porción ventral del locus ceruleus (De Groat, 1969; Rajaofetra, 1992). Estudios electrofisiológicos muestran que la distensión vesical activa las neuronas adrenérgicas del locus ceruleus. También se han comunicado proyecciones al centro miccional pontino así como a los centros medulares autonómicos (Valentino, 1995).

El conjunto de estructuras agrupadas con criterio fisiológico que engloba a regiones de distinta localización, como son los núcleos telencefálicos subcorticales, y algunos que quedan fuera de las estructuras mesencefálicas como la sustancia negra, forman los ganglios de la base, que tienen una actividad moduladora sobre el detrusor; tanto en experimentación animal, como en la clínica (Morrison, 2002).

Otra estructura que participa en la modulación del reflujo miccional es el tálamo lugar donde realizan sinapsis gran parte de las aferencias vesicouretrales, que son moduladas por éste en su camino a la corteza sensitiva, en especial el núcleo dorsomedial, pero sus rutas son aún mal conocidas. De igual forma existen evidencias de la implicación del hipotálamo en el funcionamiento vesicouretral, quizá mediado por el sistema autonómico, pero aún desconocido. El sistema límbico situado en el lóbulo temporal se supone centro de conexión autonómica, pero las lesiones selectivas de los núcleos que lo forman, amígdala, hipocampo y língula, producen modificaciones contrarias de la actividad del detrusor.

Las estructuras de la corteza cerebral implicadas en el control de la función vesical son la porción superomedial del lóbulo frontal y la rodilla del cuerpo caloso (Blaivas, 1982; Bahita, 1983) (figura 3). La actividad de éstas es inhibitoria de forma neta sobre el detrusor (su anulación funcional produce hiperactividad del detrusor), de igual forma se ha observado experimentalmente e inferido por la clínica de pacientes con desconexión del SNC. Los axones de estos grupos neuronales, pasan a través de los ganglios basales a la formación reticular mesencefálica.

Otros neurotransmisores

A nivel supraespinal y de tronco del encéfalo se han implicado otros neurotransmisores que se indican a continuación: El glutamato tiene un efecto neurotransmisor excitatorio facilitando la HDD. En el locus ceruleus del animal de experimentación, las microinyecciones de este neurotransmisor producen efectos similares a la estimulación eléctrica de esa localización (Sillen, 1981; O'Donnell, 1990). La inyección de glutamato en los núcleos serotoninérgicos del rafe, que tiene función inhibitoria, produce inhibición de la micción (Chen, 1993). También se ha propuesto que la hiperactividad secundaria a la oclusión de la arteria cerebral media en ratas conscientes es debida a la acción del glutamato, ya que ésta desaparece al tratarla con antagonistas de los receptores de glutamato (Yokohama, 1999).

El ácido gamma aminobutírico (GABA) o los agonista GABA, aparentemente median una actividad tónica inhibitoria sobre el reflejo miccional a nivel supraespinal (Chen, 1993; Yokohama, 1997), ya que suprimen actividad vesical refleja e incrementan el volumen premiccional o volumen umbral para la inducción de la micción. En otros trabajos en los que se utilizaron antagonistas GABA a este mismo nivel, se produjo estimulación de la actividad vesical y disminución del volumen umbral (Malory, 1991; Igawa, 1993; Andersson, 2002).

El interés del papel de la dopamina en el control supraespinal de la función vesical, viene de la observación de hiperactividad del detrusor en los pacientes con EP, enfermedad que se caracteriza por la degeneración de neuronas dopaminérgicas

del tronco del encéfalo (De Groat, 1993; Yoshimura, 1997). No obstante existe controversia pues estos estudios farmacológicos muestran que la dopamina y los agonista dopaminérgicos tienen efectos mixtos (unas veces excitatorio del reflejo miccional y otras inhibitorio). La inyección de péptidos opioides (como la morfina) en el CMP bloquea las contracciones vesicales isovolumétricas, mientras que sus antagonistas (naloxona) incrementan la frecuencia y amplitud de estas contracciones (Dray, 1984; Hisamitsu, 1984). La administración intraventricular de purinas como el ATP, muestra que al actuar sobre los receptores purinérgicos P2X3 del tronco del encéfalo se facilita la micción (Rocha, 2001).

En conclusión, el glutamato puede ser un transmisor excitatorio del circuito supraespinal que regula la función vesical, y puede ser un mediador de hiperactividad tras la lesión neurológica. También parece claro que diversas sustancias pueden ejercer un efecto modulador significativo en este circuito. Los receptores de estas sustancias son posibles zonas para la intervención terapéutica.

1.3. Fisiología de la micción.

Existen dos teorías, ya clásicas, de la coordinación de la micción: i) por un lado la teoría de los “Loops” o circuitos de Bradley, que aunque resulta útil para la comprensión del control neurológico de la micción, hoy día está en desuso (Bradley, 1968, 1974 y 1982), ii) y por otro, la teoría de De Groat que es la que mas consenso genera en la comunidad científica. Esta teoría propone que estructuras supraespinales, ya comentadas en el punto 1.3, controlan el reflejo miccional y de almacenamiento (figura 5). Durante el llenado vesical (reflejo de almacenamiento) se produce un estiramiento progresivo de los mecanoreceptores vesicales y uretrales que generan impulsos de frecuencia creciente conforme aumenta el llenado vesical. Estos impulsos son conducidos por las fibras mielínicas A-delta al CMP, al tálamo y al cortex, donde se hace consciente el llenado vesical. Además durante el almacenamiento no hay actividad parasimpática espinal que pueda contraer la vejiga, y la estimulación simpática del músculo liso uretral y somática del músculo estriado del suelo pélvico y del esfínter mantienen cerrada la zona de vaciado (figura 5A).

En el reflejo miccional intervienen las vías supraespinales, que están bajo control voluntario. El CMP inicia la micción de forma coordinada a través de las eferencias parasimpáticas, simpática y somática. Las eferencias espinales parasimpáticas, permiten la contracción vesical. Simultáneamente las eferencias simpáticas del músculo liso uretral y somáticas del músculo estriado uretral y del suelo pélvico se inhiben, y la zona de salida se relaja permitiendo la evacuación de orina (figura 5B).

Según De Groat el reflejo sacro, mediado por fibras C (amielínicas) tiene un papel secundario cuando el sistema nervioso está intacto, tomando preponderancia en el lesionado medular. Éstas explican la HDD de la desconexión suprasacra que sufren estos enfermos. (Mahoney, 1977; De Groat, 1985).

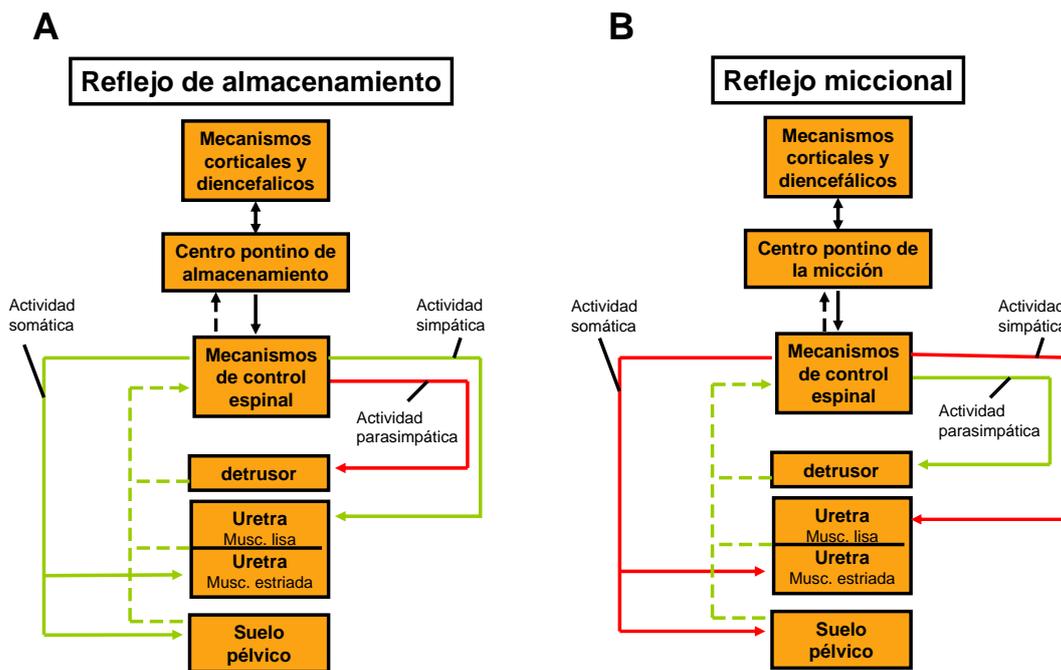


Figura 5. Actividad de las aferencias y las eferencias simpática, parasimpática y somática durante el reflejo de almacenamiento (A) y el reflejo miccional (B). En rectángulos naranjas se muestran las estructuras que participan en estos reflejos. En líneas verdes discontinuas se muestra la actividad aferente de la musculatura vesical, uretral y del suelo pélvico a medida que aumenta el llenado vesical. En líneas verdes continuas las vías eferentes activas durante cada reflejo, y en líneas rojas continuas las vías eferentes inactivas durante cada reflejo. (Modificada de Andersson, 2004).

La regulación nerviosa de la micción, expuesta en el esquema anterior, experimenta cambios importantes en su desarrollo desde la infancia a la edad adulta, que además se ven afectados por el envejecimiento y por distintas condiciones patológicas. Por ejemplo en el niño menor de 2 años la micción es refleja. Después de la maduración (aproximadamente a los 2 años cuando el niño suele controlar esfínteres), las estructuras nerviosas que participan en el reflejo miccional, son controladas voluntariamente por los centros cerebrales superiores ya comentados en el punto 1.3. Defectos en esta maduración nerviosa hacen que persistan circuitos miccionales reflejos. El envejecimiento y el daño neurológico pueden afectar a las vías nerviosas centrales de control voluntario de la micción, mientras que enfermedades vesicouretrales como la hiperplasia benigna de próstata pueden condicionar la aparición de nuevos circuitos reflejos (figura 6).

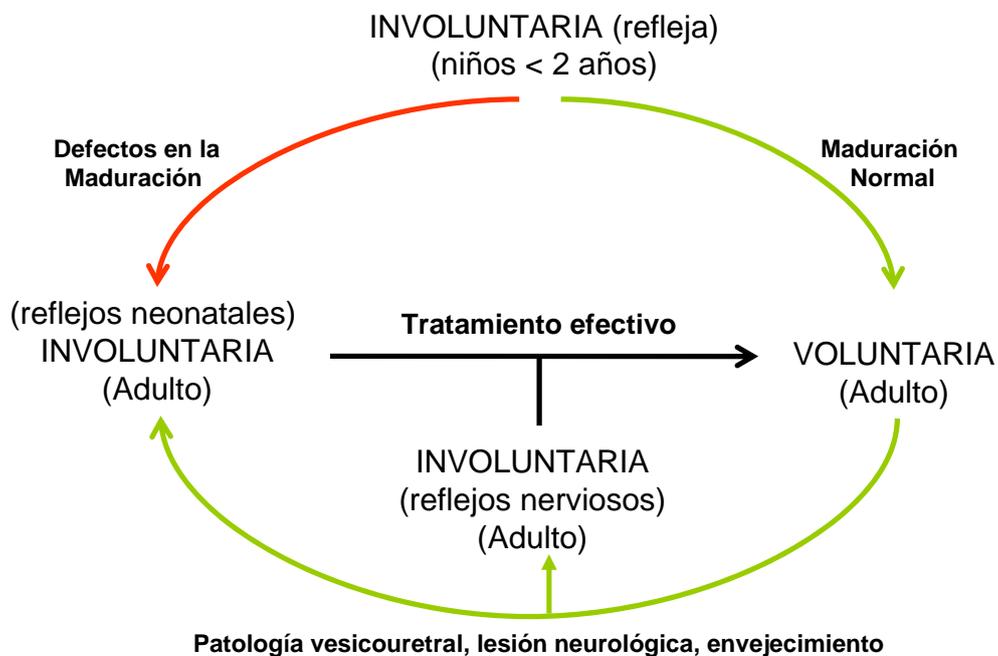


Figura. 6. Tipos de micción en las distintas etapas de la vida (en mayúsculas) y condiciones por las que pueden cambiar (en negrita) (Modificada de Yoshimura, 2002).

1.4. Estudio urodinámico.

Como ya se ha comentado anteriormente la unidad funcional formada por vejiga, uretra y musculatura del suelo pélvico, tiene dos cometidos: el almacenamiento de orina y la evacuación puntual de ésta. Antes de exponer en que consiste el estudio urodinámico y para un mejor entendimiento de éste se exponen someramente las propiedades físicas de esta unidad funcional durante las fases de llenado y vaciado vesical.

Durante la fase de llenado de una vejiga normal se produce un aumento del volumen vesical sin incremento proporcional de la presión intravesical. La relación entre el incremento de volumen y el de presión se denomina distensibilidad, acomodación o complianza vesical. La vejiga normal posee una alta acomodación gracias a la capacidad de la vejiga de plegarse y desplegarse sobre si misma (Salinas, 1992; Abrams, 1998). Este plegamiento de la pared vesical depende a su vez de:

- La composición de la pared vesical, es decir el porcentaje de fibras de elastina y de la proporción de los distintos tipos de colágeno que la forman.
- El tono muscular de la pared vesical, que varía a lo largo del día, ante estímulos físicos como el frío, ante procesos de inflamación local y con distintos fármacos como los antagonistas del calcio (Ursillo, 1961).
- El ritmo de llenado vesical (menor acomodación cuanto mayor es el ritmo de llenado vesical).
- La edad. Se sabe que con la edad, disminuye el porcentaje de fibras de elastina y aumenta el de fibras de colágeno, además de disminuir el efecto tónico inhibitorio del SNC.

Durante la fase de vaciado vesical, y en relación con sus propiedades físicas, la contracción del detrusor provoca un incremento de la presión intravesical a la vez que se produce un descenso de la resistencia uretral, creando así un gradiente de presión que genera flujo de orina hacia la uretra (Griffiths, 1977).

El estudio urodinámico es la medición de las presiones, volúmenes y flujos de orina que se producen durante las fases de llenado y vaciado vesical. Desde el punto de vista técnico el estudio se realiza habitualmente con el paciente despierto, sin ningún tipo de anestesia o sedación y habiendo retirado previamente aquellos fármacos que puedan modificar la función vesical. Cualquier variación en ellos debe ser especificada: vía de acceso intravesical (transuretral o percutánea), posición del paciente, líquido infundido, ritmo de infusión y temperatura del mismo. Este estudio de presión-flujo (figura 7) comienza pidiendo al paciente que orine y sondándolo después para evacuar y medir el volumen residual de orina postmiccional. Durante la fase de llenado se mide, entre otras variables: la relación entre el volumen y la presión vesical, la capacidad vesical y la presencia de contracciones espontáneas del detrusor. Tras ordenarle al paciente que orine,

es decir durante la fase miccional, se registran las presiones necesarias para evacuar y el flujo urinario que estas consiguen. Las variables que habitualmente se miden son:

- *Presión intravesical*: es la presión que existe dentro de la vejiga.
- *Presión abdominal*: es la presión que existe alrededor de la vejiga, en la práctica habitual se obtiene midiendo la presión rectal.
- *Presión de detrusor*: es el componente de presión intravesical generado por el propio detrusor y se obtiene de la diferencia entre la presión intravesical y la presión abdominal.
- *Sensación vesical*: es un parámetro de carácter subjetivo difícil de medir, se determinan las presiones a las que aparece la sensación de llenado inicial, deseo miccional normal, y el deseo miccional fuerte cuando refiere urgencia miccional y dolor.
- *Capacidad máxima*: volumen de llenado ante el cual el paciente siente que no puede retrasar más la micción.
- *Acomodación o complianza*: indica los cambios de volumen de llenado en relación a los cambios de presión. Se calcula dividiendo el incremento de volumen por el incremento de presión.
- *Volumen miccional*: es el volumen de orina evacuado en cada micción.
- *Volumen residual*: es el volumen que queda en la vejiga después de la micción.
- *Flujo máximo*: es el máximo valor de flujo alcanzado.
- *Tiempo de flujo*: es el tiempo durante el cual se puede medir el flujo.
- *Flujo medio*: es el volumen vaciado partido por el tiempo de flujo. Es útil únicamente si el flujo es continuo y sin goteo terminal.
- *El tiempo de flujo máximo* es el tiempo transcurrido hasta alcanzar el flujo máximo.

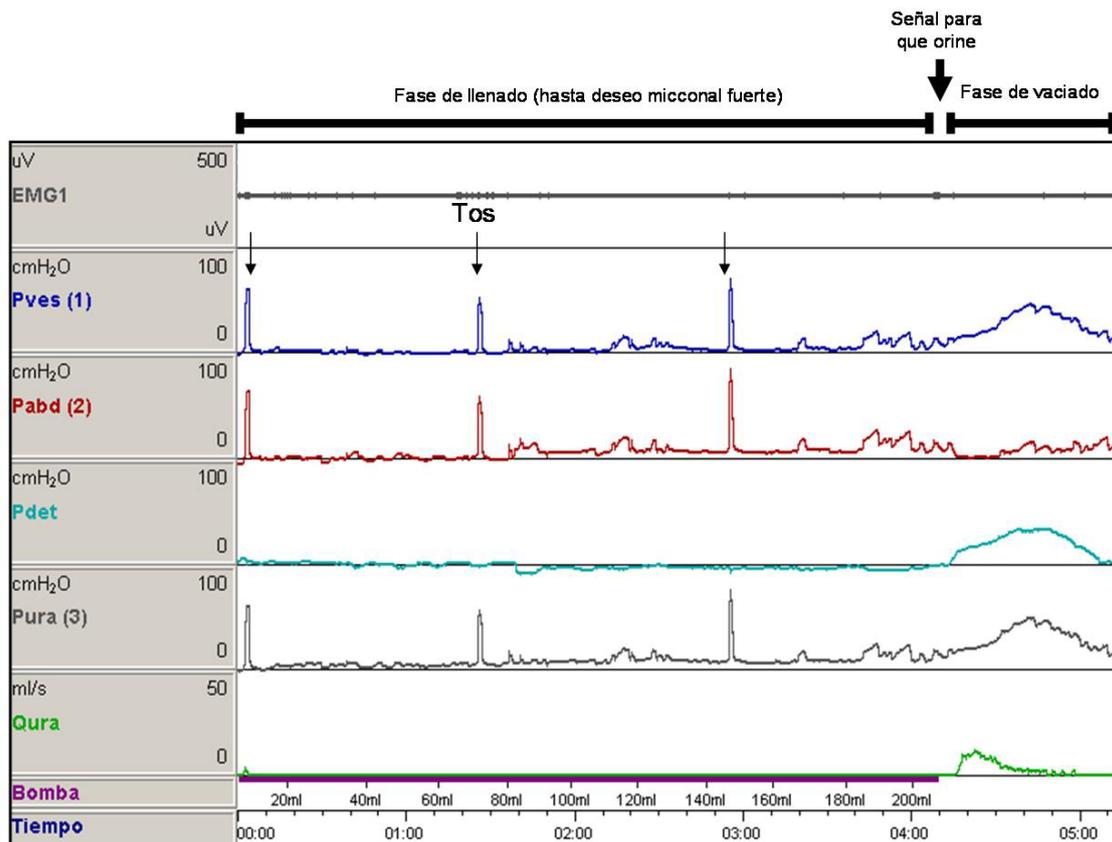


Figura 7. Estudio presión – flujo en varón normal. No muestra aumentos de la presión de detrusor (por contracciones del detrusor) durante la fase de llenado vesical. EMG1= Electromiograma de la musculatura abdominal; Pves= Presión intravesical; Pabd= presión abdominal; Pdet= presión de detrusor; Pura= presión uretral; Qura= flujo urinario; Bomba= líquido infundido en ml; Tiempo= en minutos.

2. Alteraciones de la función vesical

Atendiendo a las fases de la micción podemos clasificar las alteraciones de la función vesical en alteraciones de la fase miccional o de vaciado y alteraciones de la fase de almacenamiento o llenado vesical. Dentro de este último se incluye la HDD que es la alteración más frecuente del almacenamiento, mientras que la disfunción de vaciado ya sea secundaria a obstrucción o no, es la alteración más frecuente de la micción.

2.1. Hiperactividad del detrusor (HDD)

La HDD es un término urodinámico y se define como la presencia de contracciones involuntarias del detrusor, superiores a 15 cm. de agua, durante la fase de llenado vesical de un estudio urodinámico (figura 8) (Abrams, 1998 y 2003).

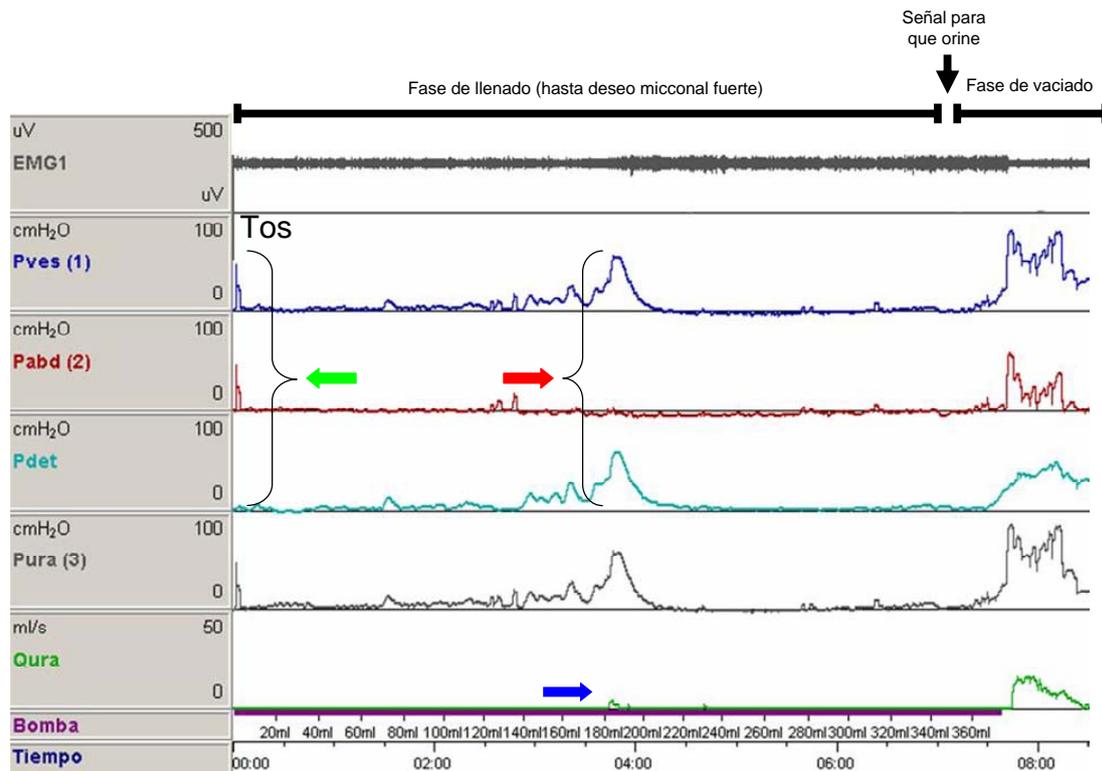


Figura 8. Estudio de presión-flujo de un paciente con HDD (comparar con el estudio normal de la figura 7). Aumento de la presión vesical y abdominal sin que se produzca incremento de la presión de detrusor con la tos (flecha verde). Aumento de la presión de detrusor durante la fase de llenado, mayor de 15 cm. de agua, que no se acompaña de incremento de la presión abdominal (flecha roja) y que produce un escape de orina o incontinencia de urgencia (flecha azul). EMG1= Electromiograma de la musculatura abdominal; Pves= Presión intravesical; Pabd= presión abdominal; Pdet= presión de detrusor; Pura= presión uretral; Qura= flujo urinario; Bomba= líquido infundido en ml; Tiempo= en minutos.

Se especifican que sean ondas mayores de 15 cm. de agua para diferenciarlas de las ondas autónomas que generan las propias fibras musculares lisas del detrusor, producidas por su tendencia natural a contraerse (autoexcitabilidad). Regulando esta actividad espontánea están los centros superiores del S.N.C. que tienen fundamentalmente un efecto tónico inhibitorio. Cuando fracasan éstos pueden producirse contracciones involuntarias del detrusor que elevan transitoriamente la presión intravesical (onda de HDD) y que se perciben como síntomas de urgencia y frecuencia miccional. Cuando estas contracciones producen incrementos de presión mayores que la presión de cierre uretral, se desencadena la incontinencia de urgencia (Stephenson, 1984). Al conjunto de estos síntomas en ausencia de otras causas de HDD, (como son las infecciones urinarias, litiasis vesical, carcinoma in situ o la obstrucción al flujo de salida vesical) se les llama síndrome de HDD (Andersson, 2003).

En cuanto a la etiología de la HDD, se ha descrito que puede estar producida por lesión neurológica (como ocurre en la enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple o hemiplejía [Motola, 1988]) o no acompañarse de lesión neurológica alguna. Históricamente a la HDD secundaria a lesión neurológica se la llamaba hiperreflexia del detrusor y cuando no era secundaria a ésta se la llamaba inestabilidad del detrusor. Esta terminología para la diferenciación de un mismo proceso con diferentes etiologías, actualmente ha caído en desuso, aunque persiste la controversia en la literatura (Abrams, 1998 y 2003).

La HDD es igual de frecuente en hombre que en mujeres y aumenta con la edad por el propio proceso de envejecimiento. La HDD de origen neurogénico se debe a la disminución del efecto tónico inhibitorio del SNC sobre el reflejo miccional. En estos casos la disminución del tono inhibitor favorece la acción del reflejo miccional, aumentando la actividad de la musculatura vesical, lo que disminuye la distensibilidad o complianza vesical. En el estudio urodinámico estos pacientes además de la disminución de la acomodación presentan una disminución de la capacidad vesical y del volumen miccional.

2.2. Tratamiento actual de la hiperactividad del detrusor.

Como se ha comentado anteriormente las patologías de la función vesical se clasifican bien en alteraciones del almacenamiento, o en alteraciones del vaciado vesical (Wein, 2003). Las disfunciones en el almacenamiento de orina teóricamente pueden mejorarse mediante agentes que, disminuyan la actividad del detrusor, incrementando la capacidad vesical o bien mediante sustancias que aumenten la resistencia al flujo de salida (Wein, 2003). Se han utilizado muchos fármacos que frecuentemente tienen malos resultados, por la pobre eficacia terapéutica de éstos o por sus efectos secundarios (Esteban, 1999; De Groat, 1999; Andersson, 2004). El desarrollo de fármacos para la incontinencia de urgencia por HDD ha sido lento, y el uso de algunos que corrientemente se utilizan, están basados más en la tradición que en ensayos clínicos controlados. Tras revisar las recomendaciones de la Segunda Reunión de Consenso Internacional sobre Incontinencia y la información más relevante publicada desde entonces, en la tabla 2 se expone un breve resumen sobre el tratamiento actual de la HDD.

Tabla 2. Fármacos usados en el tratamiento de la HDD. Niveles de evidencia y grados de recomendación según la Universidad de Oxford (Modificada de Andersson, 2002)

Fármaco	Nivel de evidencia clínica	Grado de Recomendación
<i>Antimuscarínicos</i>		
Atropina, Hioscinamina	2	D
Propantelina	2	B
Emepronio	2	B
Trospio	1	A
Tolterodina	1	A
Darifenacino	2	B
Solifenacilo	2	B
<i>Acción mixta</i>		
Oxibutina	1	A
Diciclomida	4	C
Propioverina	1	A
Flavoxato	4	D
<i>Antagonistas receptores alfa adrenérgicas</i>		
Alfuzosina	4	D
Doxazosina	4	D
Prazosín	4	D
Terazosina	4	D
Tamsulosina	4	D
<i>Agonistas receptores beta</i>		
Terbutalina	4	D
Clembuterol	4	D
Salbutamol	4	D
<i>Antidepresivos</i>		
Imipramina	2	C*
<i>Inhibidores de la síntesis de prostaglandinas</i>		
Indometacina	4	C
Flubiprofeno	4	C
<i>Análogos de la vasopresina.</i>		
Desmopresina	1	A
<i>Otros</i>		
Baclofen	2	C**
Capsaicina	3	C**
Resiniferotoxina	En investigación	

* Debería utilizarse con precaución, ** uso intratecal. Niveles de evidencia 1 el máximo y 5 el mínimo. Grado de recomendación A el máximo y E el mínimo

Los fármacos con utilidad clínica avalados por estudios de mayor nivel de evidencia clínica y por tanto con mayor grado de recomendación son los anticolinérgicos (muscarínicos) periféricos, que son el tratamiento de elección de la HDD. Así la oxibutina que entre otros efectos tiene actividad anticolinérgica (Appell, 1997; Inselin, 1997) tiene una eficacia demostrada, pero presenta un mayor índice de efectos secundarios que tolterodina (Mardesbacher, 1995; Abrams, 1997) y cloruro de trospio (Rosario, 1995), mientras que estos dos tienen una eficacia similar a oxibutina, lo que se traduce en una mayor tolerancia y seguimiento del tratamiento con estos últimos. En resumen la tolterodina es el anticolinérgico periférico con mayor grado de recomendación, aunque recientemente se han introducido otros anticolinérgicos selectivos de receptores M3 (presentes en el músculo detrusor y poco frecuentes en otras localizaciones) (Richter, 1997) como son darifenacilo y solifenacilo que pueden llegar a desplazar a tolterodina como tratamiento de elección, si confirman la mayor eficacia y el menor índice de efectos secundarios que se le atribuye, gracias a su mayor selectividad vesical. Otro fármaco recomendado para su uso en

clínica es la propioverina que tiene un efecto terapéutico documentado en la vejiga hiperactiva y un perfil de efectos secundarios aceptable (Diokno, 1972). Por último se han descrito efectos beneficiosos con varios antidepresivos en la vejiga hiperactiva, pero sólo imipramina se ha usado ampliamente en la clínica (Longhurdt, 1995), demostrándose eficaz en combinación con la propantelina (antimuscarínico).

Otros tratamientos para la HDD en investigación son: la inyección en el detrusor de toxina botulínica A (Dykstra, 1988; Petit, 1998; Shurch, 2000), la terapia génica con preproencefalina o factor de crecimiento nervioso vehiculizado por virus herpes simple (Franks 2001; Sasaki, 2001), y trasplante de células madres musculares en el tracto urinario inferior de pacientes con disfunción vesical (Atala, 1999; Pruchnic, 2001; Yokohama, 2001; Strasser, 2007; Mitterberger, 2007).

3. Enfermedad de Parkinson (EP) y síntomas urinarios.

3.1 Enfermedad de Parkinson.

La EP es un proceso neurodegenerativo que se caracteriza fundamentalmente por la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra que proyectan al estriado. La pérdida de la vía nigroestriatal explica la mayor parte de los síntomas motores típicos de la EP, que son temblor de reposo, bradicinesia, y rigidez muscular. La causa de la muerte de las neuronas dopaminérgicas sigue sin conocerse, aunque se han propuesto como posibles mecanismos entre otros, una predisposición genética, estrés oxidativo inherente al metabolismo de la dopamina, tóxicos ambientales e infecciones virales (Lang, 1998). Además de en la EP idiopática los síntomas parkinsonianos descritos pueden estar presentes en otros procesos, denominados parkinsonismos secundario a fármacos (ej: neurolépticos), tóxicos (ej: manganeso, MPTP [Langston 1983]), etc. Actualmente en la EP idiopática no existen marcadores clínicos ni analíticos que sirvan para el diagnóstico de certeza de la enfermedad, el examen anatomopatológico postmortem sigue siendo el único diagnóstico definitivo (Lang, 1998; Sandmann-Keil, 2005). Los hallazgos característicos son la pérdida neuronal de la sustancia negra compacta y la aparición de los llamados cuerpos de Lewy que son depósitos intracelulares de sinucleína, ubiquitina y otras sustancias. (Rajput y Rozdilsky, 1991; Micieli, 2003). Además de la afectación de la pars compacta de la sustancia negra y del cuerpo estriado, se ha descrito afectación de otros grupos neuronales y regiones del SNC y periférico que se muestran en la figura 9.

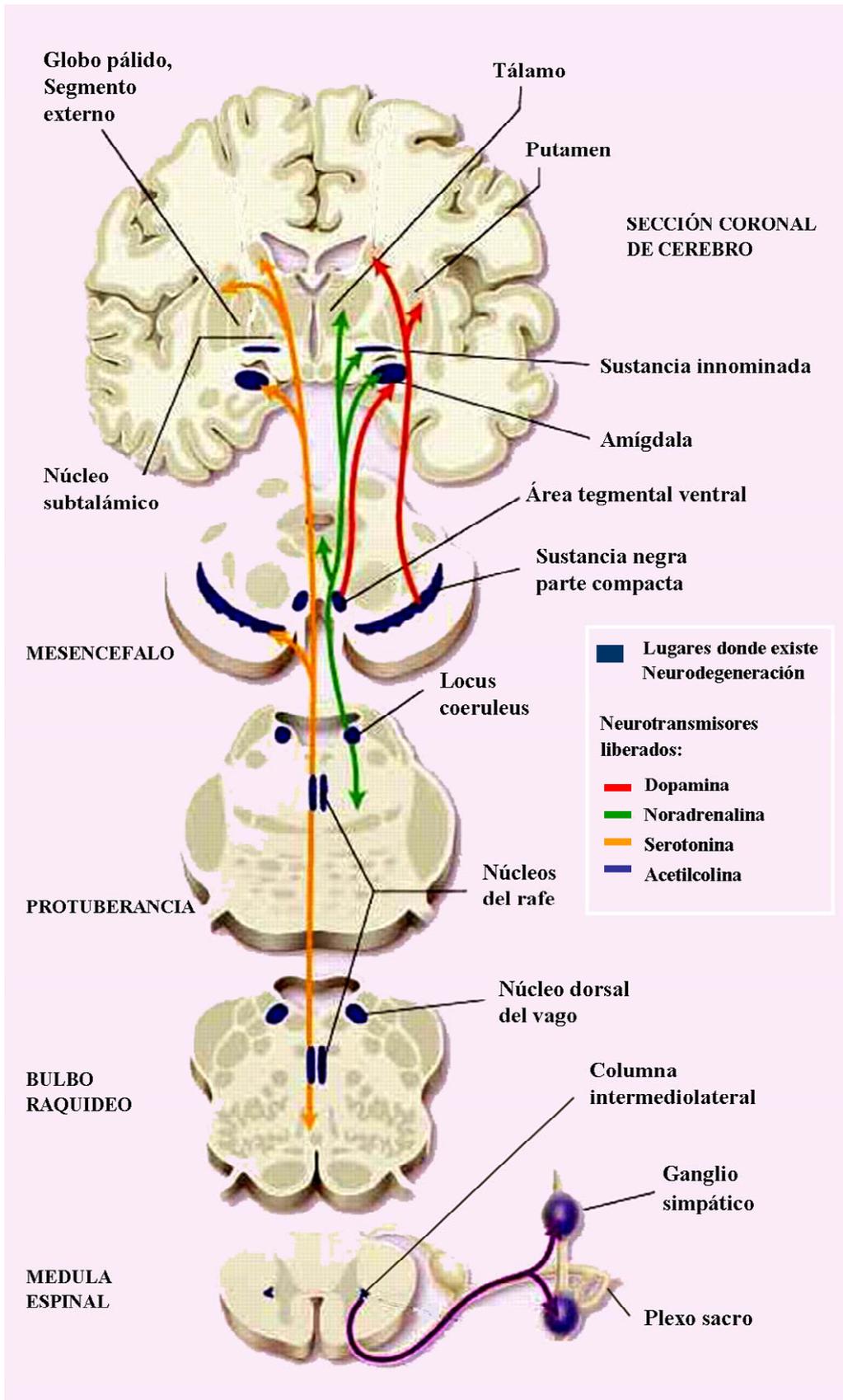


Figura 9. Principales regiones y vías del sistema nervioso central y periférico afectadas en la EP (modificada de Lang y Lozano, 1998).

3.2. Sintomatología urinaria y la HDD en la EP.

Además de los síntomas motores ya comentados anteriormente, los pacientes con EP avanzada suelen presentar también síntomas urinarios. Entre ellos los más frecuentemente referidos son la mayor frecuencia miccional, la urgencia por orinar y cuando esta urgencia no se controla la incontinencia urinaria, agravada ésta última por la limitación para desplazarse que sufren estos pacientes. Los síntomas urinarios en la EP suelen empezar a presentarse varios años después del diagnóstico de la enfermedad (Stocchi, 1997).

Al realizar estudios urodinámicos para valorar la función vesical de pacientes con EP, se ha encontrado que entre el 36 y el 90% de ellos (Lemack, 2000) tienen una función vesical patológica. Así en nuestro país Martínez Agulló encontró un 50% de enfermos de Parkinson con disfunción vesical (Martínez Agulló, 1992). Los trastornos encontrados en la mayoría de los casos son HDD durante la fase de llenado y en algunos casos relajación incompleta de la musculatura del suelo pélvico y del esfínter durante la fase miccional (Murnaghan, 1961; Berger, 1987; Lemack, 2000; Araki, 2000; Defreitas, 2003). Con menos frecuencia se produce en los pacientes con EP hiporreflexia del detrusor (Aranda, 1993). Algunos autores (Diokno, 1988; Gray, 1995) sugieren que los trastornos urodinámicos encontrados en la EP se deben a la alteración de la función vesical que aparece con la edad, pero la mayoría de los grupos refieren que estos trastornos están aumentados en pacientes con EP.

La incapacidad para controlar la micción en público, es un síntoma vergonzante, que aumenta el aislamiento social de estos pacientes y la dependencia de otras personas para su cuidado (Resnick, 1985), además de generar ansiedad y depresión. Como ya se ha visto, la frecuencia de incontinencia y otros síntomas urinarios en la EP es alta y aumenta a medida que avanza la enfermedad. Esto último, unido al aumento de la esperanza de vida y a que la EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente (Estudio Europarkinson; de Rijk, 1997), hacen que la incontinencia de estos pacientes sea un serio problema de salud pública, que genera un costo económico importante (Damián, 1998; Wagner, 1998; Hu, 2003).

3.3. Tratamientos utilizados para la HDD en la EP.

Los tratamientos farmacológicos ya descritos para la HDD son menos eficaces cuando ésta es secundaria a enfermedades neurológicas (Esteban, 1999; Andersson, 2002). Como ya comentamos entre los fármacos con alto grado de recomendación clínica para el tratamiento de la HDD (tabla 2), los de elección son los anticolinérgicos periféricos (que no pasan barrera hematoencefálica), y dentro de ellos la tolterodina es el de mayor eficacia y mejor tolerancia. La tolterodina produce en la población general una reducción de la sintomatología de urgencia y frecuencia miccional en un 65% (Appell, 1997, 2001), pero no está bien documentado en que medida reducen la sintomatología urinaria en los pacientes con EP. Por otro lado, los anticolinérgicos que pasan la barrera hematoencefálica (con efecto central y periférico) mejoran la sintomatología urinaria cuando los pacientes reciben este tratamiento por otros motivos (ejemplo: Trihexifenidil y Biperiden utilizados en pacientes jóvenes con EP y predominio del temblor de reposo), sin embargo no es razonable utilizarlos como tratamiento de la HDD en todos los pacientes con EP y síntomas urinarios, porque para conseguir efecto terapéutico son necesarias dosis que producen efectos secundarios importantes (Anderson, 2002).

Además de los anticolinérgicos, otros tratamientos farmacológicos descritos para la sintomatología urinaria de la EP han sido: los antidepresivos tricíclicos, desmopresina, la L-dopa y la apomorfina. Los antidepresivos tricíclicos (de amplia utilización en estos enfermos por el alto porcentaje de depresión que sufren) han sido beneficiosos en el control de la sintomatología urinaria de algunos pacientes (Hunsballe, 2001). Otros autores sugieren que la desmopresina (análogo sintético de la vasopresina) puede ser útil en el control de la nicturia que padecen algunos de estos pacientes (Suchowersky, 1995), pero también llaman la atención sobre la posible hiponatremia dilucional en pacientes que por su edad tienen dificultad en el manejo de líquidos. Finalmente Aranda y colaboradores en 1993, estudiaron a 12 pacientes con EP y sintomatología urinaria, observando que pacientes con HDD tenían una mejoría parcial con apomorfina y en menor medida con L-Dopa. La brevedad de estas series unida a la falta de homogeneidad de los pacientes no permite evaluar con claridad la eficacia de estos fármacos en el control de la sintomatología urinaria de la EP.

3.4. Etiología de la HDD en la EP y la dificultad para su estudio.

Existen varias hipótesis sobre la causa del mayor porcentaje de HDD en los pacientes con EP. Algunos autores atribuyen esta HDD a la mayor edad de estos pacientes, pues existe HDD asociada a la ancianidad (Benson, 1990; Gray, 1995; Resnick, 1989), otros sin embargo la asocian a la HDD secundaria a la obstrucción que produce la hiperplasia benigna de próstata (Andersen, 1978; Staskin, 1988; Jones, 1985; Thomas, 2000). También se ha atribuido este mayor porcentaje de HDD a los tratamientos farmacológicos que realizan los pacientes mayores con EP (Resnick, 1989) (tabla 3). Sin embargo otros grupos consideran que la HDD está producida por la propia EP (Aranda 1993; Araki, 1997; Lemack, 2000).

Tabla 3: Medicación empleada frecuentemente en ancianos con EP que pueden afectar la continencia

Tipo de medicación	Ejemplos	Posibles efectos sobre la continencia
Diuréticos potentes	Furosemida	Polaquiuria, frecuencia, urgencia
Antisicóticos	Haloperidol, tioridazida	Acción anticolinérgica, sedación
Antidepresivos	Amitriptilina	Acción anticolinérgica, sedación
Antiparkinsonianos	Trihexifenidilo, mesilato de benzotropina	Acción anticolinérgica, sedación
Sedantes/hipnóticos	Diazepan, fluracepan	Sedación, inmovilidad

Adaptada de: Resnick NM, 1989.

Tampoco está claro que lesión neurológica de las que se producen en la EP (figura 9) sería la responsable de la sintomatología urinaria de EP. En humanos hay trabajos que describen mejoría de la HDD de la EP, cuando reciben tratamiento con agonistas dopaminérgicos (Aranda, 1993), lo que sugiere la lesión dopaminérgica como causa de la HDD. También hay estudios realizados con tomografía por emisión de positrones (PET) que tratan de correlacionar los niveles de dopamina con las alteraciones urodinámicas observadas (Sakakibara, 2001), aunque otro grupo también en estudios con PET sugieren una lesión cortical difusa mas que una lesión dopaminérgica (Koike 1997). Otras estructuras no dopaminérgicas afectas en la EP y cuya lesión podría afectar el control neurológico de la micción y por tanto producir la aparición de HDD son el plexo pélvico, distintas estructuras del sistema nervioso autónomo, y el locus ceruleus (Rajput y Rozdilsky, 1991; Micieli, 2003) (figura 9).

Resulta complicado evaluar en humanos en que medida la propia EP contribuye a ocasionar los síntomas urológicos que padecen estos enfermos, ya que es muy difícil

conseguir un grupo homogéneo de pacientes con EP y síntomas urinarios, en el que se eviten otras causas de HDD que concurren en la EP. Esto se debe a que la mayoría de los enfermos de Parkinson son pacientes de edad avanzada que podrían padecer una HDD asociada al envejecimiento. Muchos de estos pacientes son varones mayores con altas probabilidades de hiperplasia benigna de próstata y de padecer una HDD que se asocia a la obstrucción que ésta produce. Y prácticamente todos los pacientes con EP toman fármacos que pueden favorecer o enmascarar una HDD ya que la respuesta al tratamiento es uno de los criterios diagnósticos de la enfermedad. Otro aspecto que dificulta aclarar la etiología de este proceso en humanos es el hecho de que estudios de autopsias han revelado un diagnóstico incorrecto en el 24% de los supuestos casos de EP (Hughes, 1993). Sin embargo existen modelos animales de parkinsonismo que a la vez que evitan las causas de HDD que concurren en la EP, permiten estudiar las regiones neuronales que podrían ser responsables de esta HDD.

4. Modelos animales de estudio urodinámico

Como ya se ha comentado anteriormente el estudio urodinámico nos permite evaluar la función vesical de un paciente mediante la medición de una serie de valores. En animales los estudios de presión-flujo nos permiten evaluar la función vesical y los cambios de ésta según las condiciones experimentales a las que se le someta. A lo largo de los últimos años se han utilizado una gran variedad de animales de experimentación para el estudio urodinámico, entre los que se encuentran entre otros monos, cerdos, perros, gatos, marmotas, ratas y ratones (Klevmark 1974; Mattiasson, 1982; Yaksh, 1986; Lundbeck, 1989). Por su costo económico, accesibilidad, mantenimiento y manejo, los animales habitualmente utilizados para estos experimentos son ratas. Los ratones a pesar de reunir estas condiciones, son menos utilizados por orinar pequeños volúmenes en cada micción, lo que hace extremadamente difícil el registro de esta señal. El modelo urodinámico de ratas es habitualmente el más utilizado y en el que están establecidos los valores de infusión intravesical, ritmo circadiano del tono muscular de la vejiga, etc. (Mattiasson, 1982; Yaksh, 1986; Maggi, 1986; Malmgren, 1987).

Dentro de los estudios urodinámicos en ratas hay autores que realizan el estudio de presión-flujo bajo sedación, para facilitar el manejo del animal. Sin embargo otros autores prefieren hacer el estudio con el animal despierto para evitar las alteraciones que puedan

producir los anestésicos habitualmente empleados en experimentación animal (Andersson, 1987; Seki, 2001).

5. Modelos animales de parkinsonismo.

Existen distintos modelos animales de parkinsonismo que nos permiten estudiar la EP como causa de la HDD, evitando otras posibles causas de HDD ya comentadas, (envejecimiento, la obstrucción al flujo de salida del vaciado vesical y determinados fármacos que pueden producir o enmascarar la HDD). Son muchos los modelos parkinsonianos descritos en la literatura (tabla 4), unos utilizan sustancias que producen disminución de la liberación de dopamina en el estriado sin provocar la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y otros producen la muerte de éstas. También se han descrito alteraciones genéticas que favorecerían la muerte de las células dopaminérgicas.

Tabla 4. Principales modelos animales de parkinsonismo.

Modelo (sustancia)	Mecanismo de acción
Reserpina	Disminuye los niveles de dopamina, no muerte cel. dopaminérgicas
Metanfetamina	Disminuye los niveles de dopamina, no muerte cel. dopaminérgicas
6 hidroxidopamina	Muerte de neuronas dopaminérgicas por estrés oxidativo ?
MPTP	Muerte de neuronas dopaminérgicas por estrés oxidativo (inhibición complejo I)
Paracuato	Muerte de neuronas dopaminérgicas por estrés oxidativo ?
Rotenona	Muerte de neuronas dopaminérgicas por estrés oxidativo (inhibición complejo I)
Transgénicos	No aclarado

modificada de De Betarbet y col., 2002

Se expone con detalle el modelo de lesión dopaminérgica central bilateral inducido por 6-OHDA que es el que se utilizará en la experimentación. Esta sustancia es un neurotóxico de acción específica sobre las neuronas catecolaminérgicas, esta sustancia no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que debe ser inyectada intratecalmente (Ungerstedt, 1968). La 6-OHDA actúa dañando la vía dopaminérgica nigro-estriatal tras ser inyectada de forma esterotáxica en la sustancia negra, el tracto nigro-estriatal, el estriado, o bien en el interior del tercer ventrículo cerebral (Blum, 2001; Rodríguez, 2001). Su estructura es muy similar a la de las catecolaminas, lo que permite su entrada en la célula a través de los mismos transportadores. El daño es selectivo para las neuronas dopaminérgicas

si se combina la inyección de 6-OHDA con la administración sistémica de desipramina, que inhibe la acción de la 6-OHDA en los terminales noradrenérgicos al bloquear el transportador de noradrenalina, previniendo así el daño oxidativo de las neuronas noradrenérgicas, como es el caso del locus ceruleus. Como ya hemos comentado esta región está también afectada en la EP y participa en el control neurológico de la micción (Sasa y Yoshimura, 1994). Numerosos trabajos indican que 6-OHDA ejerce toxicidad al generar estrés oxidativo intracelular (Blum, 2001). Tras un proceso de desaminación, catalizado por la monoaminoxidasa, y también como consecuencia de su autooxidación, 6-OHDA produce radicales libres, como H_2O_2 , OH y O_2^- , que inducen peroxidación de lípidos, mutaciones, roturas del DNA y la desorganización del citoesqueleto (Kumar, 1995). Además inhibe la actividad de enzimas antioxidantes, como glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa (Perumal, 1992) que producen la degeneración de los terminales dopaminérgicos y la consecuente denervación del estriado que preceden a la pérdida neuronal en la sustancia negra (Zuch, 2000).

El motivo principal por el que utilizamos el modelo de 6-OHDA es por ser un modelo agudo (que produce la lesión dopaminérgica de la sustancia negra en poco tiempo) sin dañar otras regiones cerebrales que pueden estar lesionadas en los pacientes con EP (figura 9).

6. Estudios urodinámicos en animales parkinsonianos

Se ha comunicado la realización de estudios urodinámicos en tres modelos distintos de animales parkinsonianos. En monos lesionados con MPTP, en ratones con déficit de receptor de dopamina D2 y por último en ratas hemiparkinsonianas inyectadas con 6-OHDA intratecal. Los resultados obtenidos por estos modelos han sido dispares y en algunos puntos contradictorios. Así algunos autores sugieren que los receptores dopaminérgicos D2 facilitan el reflejo miccional, y eventualmente produce hiperactividad del detrusor (Kontani, 1990; Seki, 2001), mientras que otros encuentran exactamente lo contrario, al realizar estudios urodinámicos en ratones con déficit de receptores D2, sugiriendo que la falta de activación de los receptores dopaminérgicos D2 contribuye al desarrollo de los síntomas de la enfermedad de Parkinson (Baik, 1995).

Los estudios urodinámicos en monos con parkinsonismo inducido por MPTP, sugieren que la pérdida del equilibrio de la actividad de los receptores D1 frente a los receptores D2, pueden ser la causa de la disfunción vesical de la enfermedad de Parkinson (Yoshimura, 1992, 1993, 1998). No obstante otros autores piensan que la anestesia durante el estudio urodinámico (Seki, 2001) y el efecto sistémico del propio MPTP (Wilson, 1991; Alkadhi y Hogan, 1992) puede afectar la validez de muchos de estos estudio. El último modelo publicado durante la realización de este trabajo produce un hemiparkinsonismo secundario a la inyección intraparenquimatoso de 6-OHDA en la sustancia negra de un lado. Este modelo encuentra fundamentalmente una reducción de la capacidad vesical y un aumento de la frecuencia miccional (Yoshimura, 2003).

Las diferencias entre los tres modelos pueden deberse a la distinta metodología empleada en cada uno de ellos, entre lo que cabe destacar: la utilización o no de anestesia durante el estudio urodinámico, que la lesión sea uni o bilateral (en la SN) y al efecto sistémico que produce MPTP. En este trabajo se ha decidido usar el modelo de 6-OHDA por su especificidad (afectar solamente la SN) y ser bilataeral.

II. OBJETIVOS

El **objetivo general** de este trabajo de investigación es profundizar en el conocimiento de los síntomas urinarios asociados a la enfermedad de Parkinson y en su etiología.

Los **objetivos de la fase clínica** fueron:

1. Analizar la correlación entre los síntomas urinarios y neurológicos de la enfermedad de Parkinson.
2. Analizar la correlación entre los síntomas urinarios que manifiestan los pacientes con enfermedad de Parkinson y las alteraciones observadas en el estudio urodinámico.
3. Revisar la sistemática utilizada para la selección de pacientes, con enfermedad de Parkinson y síntomas urinarios, y analizar la respuesta de los síntomas urinarios al tratamiento con tolterodina, en los pacientes que lo realizaron.
4. Analizar las posibles causas de hiperactividad del detrusor que presentan los pacientes con EP.

Los **objetivos de la fase de experimentación animal** fueron:

5. Realizar estudios urodinámicos en ratas y determinar los valores urodinámicos normales en el modelo desarrollado.
6. Determinar cuales son los valores urodinámicos de la rata tras inyección de cloruro sódico intraventricular al 0.9%.
7. Conseguir un modelo de parkinsonismo central bilateral resultante de la inyección de 6-OHDA en el tercer ventrículo cerebral.
8. Determinar cuales son los valores urodinámicos de la rata con lesión dopaminérgica central bilateral y aclarar si estos valores varían con los agonistas dopaminérgicos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

En primer lugar se describe la metodología seguida para la consecución de los objetivos de la fase clínica inicial y posteriormente el material y método de la experimentación animal realizada para dar respuesta al resto de los objetivos planteados.

1. Etapa clínica

1.1. Pacientes incluidos y estudios realizados

En un periodo de 6 meses consecutivos a todos los pacientes con EP idiopática (según criterios diagnósticos del banco de cerebros de la Sociedad de Parkinson del Reino Unido [Hughes, 1993]) que acudieron a la consulta de Parkinson del Servicio de Neurología del Hospital Universitario Virgen del Rocío, se les realizó un cuestionario de síntomas urinarios autoadministrado. Se realizó IPSS [International Prostate Symptom Score] en los varones e IU4 [Incontinencia Urinaria 4] en las mujeres (para ver los cuestionarios completos ver los anexos 1 y 2).

Se incluyeron en el estudio aquellos pacientes con EP idiopática con puntuaciones en los cuestionarios de síntomas urinarios superiores a 7 en el varón y 5 en la mujer, y que no presentaran ninguno de los criterios de exclusión (tabla 5).

Tabla 5: Criterios de exclusión

- Parkinsonismo secundario y otros cuadros de parkinson que no correspondan a enfermedad de parkinson idiopática.
- Pacientes con intervenciones quirúrgicas que actúen sobre columna lumbar, próstata o vejiga.
- Pacientes con infecciones urinarias de repetición, litiasis vesical, tumor vesical u otras causas que puedan producir vejiga inestable.
- Pacientes con vejiga neurógena.
- Incapacidad mental para rellenar los cuestionarios.
- No aceptación de inclusión en el estudio.

A los pacientes seleccionados se les realizó los cuestionarios de síntomas neurológicos UPDRS y de Hoen-Yahr (Anexo 3 y 4) y el estudio de presión-flujo (Equipo de urodinámica UD-2000 Medical Measurement Systems). En el caso de los varones, el estudio se completó con tacto rectal y ecografía abdominal para valorar signos de hiperplasia benigna de próstata (Leopard 2001, BK Medical) (figura. 10). Los datos recogidos (Anexo 5) en la primera evaluación fueron: las causas posibles de HDD que presentara el paciente, las puntuaciones de las escalas de síntomas urinarios y neurológicos,

los valores del diario miccional (Anexo 6) y del estudio urodinámico. A los tres meses se evaluaron las modificaciones en la escala de síntomas urológicos, el diario miccional del último mes, si se hizo tratamiento con tolterodina, y si presentó alguna reacción adversa o complicación secundaria a este tratamiento (figura 11).



Figura 10: Ecógrafo (izquierda) y equipo de urodinámica (derecha) utilizados durante el estudio.

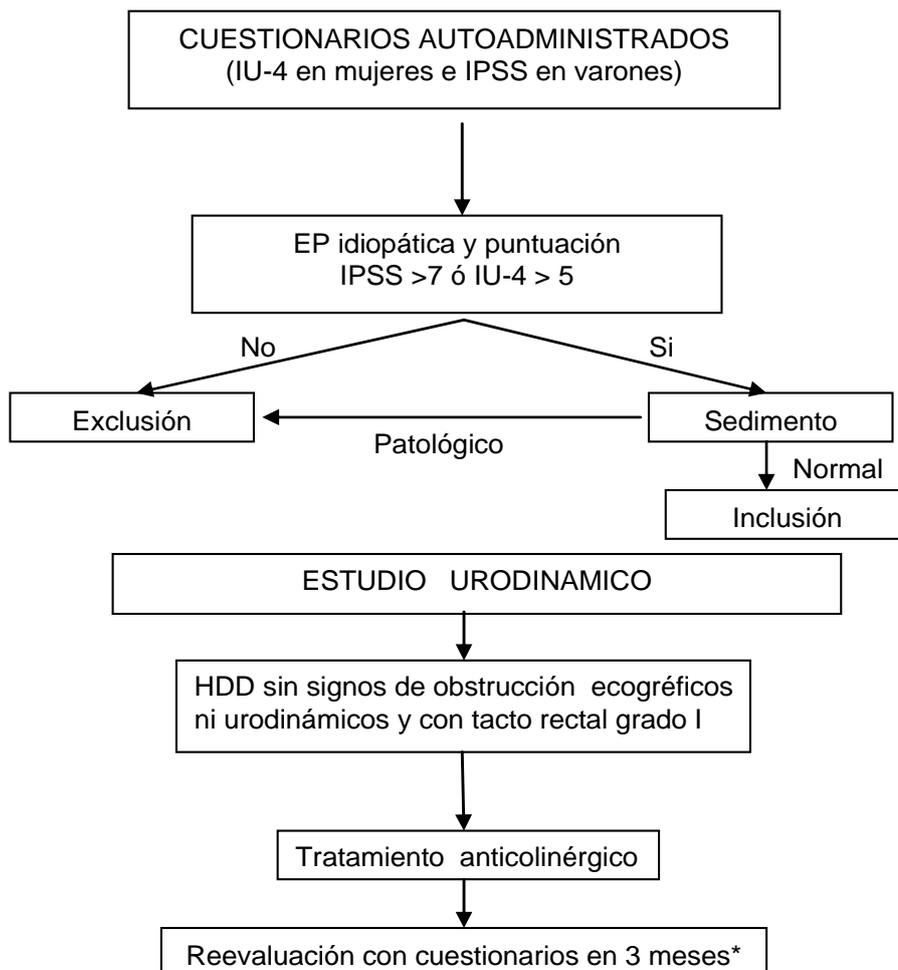


Figura 11: Esquema que muestra los criterios de selección de los pacientes del estudio.
 HBP: hiperplasia benigna de próstata. HDD: hiperactividad del detrusor. IPSS: International Prostate Symptom Score. IU-4: cuestionario de Incontinencia Urinaria en mujeres.

La ecografía abdominal y el tacto rectal se realizó a los hombres con EP para valorar posible patología prostática que pudiera producir HDD secundaria a obstrucción, ya que estos pacientes no se benefician del tratamiento con anticolinérgicos orales. Los signos de obstrucción evaluados fueron: el residuo postmiccional, la presencia o no de divertículos vesicales o litiasis vesical y los diámetros prostáticos.

El estudio urodinámico se hizo solamente en aquellos pacientes sin indicios de infección urinaria (sedimento normal) y sin otras causas conocidas de HDD. Tras la micción se realizó sondaje vesical para vaciar completamente la vejiga (residuo miccional) y posteriormente se introdujo un transductor de presión intrauretral realizando estudio urodinámico completo, valorando las fases de llenado y vaciado vesical. Además se registraron presión abdominal y electromiografía del suelo pélvico. Los parámetros urodinámicos incluidos fueron capacidad vesical máxima, presencia de HDD, volumen al que se produjo la primera onda de HDD (Vol. HDD), amplitud de la mayor contracción involuntaria del detrusor (amp. HDD), flujo miccional máximo (Q max), presión de detrusor en el pico de flujo (Pdet Qmax) y volumen de residuo postmiccional (VRP). Se consideró incontinencia de urgencia cualquier escape de orina asociado a urgencia miccional o HDD durante el llenado vesical.

1.2. Criterios de diagnóstico urodinámico

A los pacientes se les asignó un diagnóstico urodinámico según los siguientes criterios. La HDD se definió como contracciones involuntarias del detrusor mayores de 15 cm H₂O. La obstrucción al flujo urinario se definió como Q max menor de 12 ml/s y Pdet Qmax mayor de 45 cm H₂O en el varón. En la mujer no se asignó el diagnóstico de obstrucción al flujo urinario ya que todavía no hay consenso en los valores de corte (Lemack, 2000). La hipocontractilidad se definió como Q max menor de 12 ml/s y Pdet Qmax menor de 30 cm H₂O en el varón y 11 cm H₂O en la mujer (Badia, 1998 y 1999). La arreflexia se definió como la incapacidad para generar contracciones voluntarias del detrusor. Todas las demás definiciones de términos urodinámicos también estuvieron de acuerdo con la guía de la Sociedad Internacional de Continencia (Abrams; 2002).

1.3. Análisis de los resultados del estudio clínico

El análisis estadístico utilizado para valorar la correlación de los síntomas urinarios con los neurológicos fue la Rho de Spearman. La comparación de los parámetros urodinámicos entre los tres subgrupos de pacientes con EP (varones obstruidos/ varones no obstruidos/ mujeres), se realizó mediante el test de Kruskal-Wallis mientras que la comparación entre 2 de estos grupos se realizó mediante la U de Mann-Whitney. Finalmente la variación en la puntuación de los cuestionarios de síntomas urinarios tras el tratamiento anticolinérgico se hizo con la prueba de Wilcoxon. En todas estas comparaciones se consideró estadísticamente significativo cuando $p < 0,05$ y correlación positiva cuando $C > 0,8$.

2. Etapa experimental

2.1. Animales de experimentación utilizados

Se utilizaron un total de 122 animales, (10 ratones y 112 ratas). Todos los animales se mantuvieron a temperatura constante ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) en un ciclo alternante de luz-oscuridad cada 12 horas, con libre acceso al agua y al alimento. Los 10 ratones C57BL/6 se utilizaron para evaluar la fiabilidad del estudio urodinámico en estos animales. Para determinar la reproducibilidad del estudio urodinámico en ratas y el resto de experimentos posteriores se utilizaron un total de 112 ratas wistar hembras, de 250-350 g de peso. Las condiciones de cuidado y experimentación animal fueron aprobadas por el Comité para la Investigación animal del Hospital Virgen del Rocío, y se realizaron todos los experimentos conforme a las normas de la Unión Europea (86/609/EEC).

Para evitar el sufrimiento de los animales, tanto la implantación de los catéteres vesical y peritoneal, como la manipulación esterotáxica se realizaron bajo anestesia general. El anestésico utilizado fue hidrato de cloral (Panreac, España) intraperitoneal, a una concentración de 70 mg/ml de ClNa^+ 0.9%, inyectando intraperitonealmente 350 mg/Kg de peso. Para prevenir posibles infecciones de orina (durante la colocación del catéter vesical) y del sistema nervioso central (durante la inyección esterotáxica) se realizó inyección intramuscular de 40.000 U de penicilina en cada procedimiento.

2.2. Técnica quirúrgica de implantación de los catéteres vesical y peritoneal

La implantación del catéter vesical (figura 12), se realizó bajo las condiciones de anestesia y profilaxis antibiótica ya comentadas. Tras rasurado del abdomen y lavado de la zona infraumbilical con povidona yodada (Betadine, Francia) se realizó incisión media infraumbilical, abriendo la pared abdominal por planos hasta entrar en cavidad peritoneal. Se identificó y exteriorizó la vejiga. Cuando la vejiga no estaba replecionada, se rellenó inyectando suero fisiológico con aguja de insulina 25G (Nissho Nitro Europe, Bélgica). Realizamos sutura en bolsa de tabaco con prolene 6/0 (Ethicon, EE.UU.) en la zona avascular de la cúpula vesical. Posteriormente se seccionó la pared vesical en el centro de la sutura con tijera oftalmológica, y se introdujo el extremo evertido del catéter de polietileno P-50, (Becton Dickinson, Inglaterra) purgado previamente con cloruro sódico 0.9%. Posteriormente se realizó fijación del catéter, comprobando la estanqueidad de la sutura y la permeabilidad uretral. Después se hizo tunelización subcutánea dorsal y exteriorización del catéter en la línea imaginaria entre ambos pabellones auriculares, para evitar que el animal pudiera manipularlo. Finalmente se fijaba a piel y se hacía nueva comprobación de la permeabilidad del sistema observando la emisión de orina por uretra, tras la que se sellaba por calentamiento el catéter hasta el día del estudio urodinámico.

En los animales en los que se programó la inyección de L-dopa + carbidopa intraperitoneal, el catéter peritoneal se colocó en el mismo acto quirúrgico que el catéter vesical. Una vez lavado y purgado el catéter peritoneal primero con etanol 70% y después con suero fisiológico, se introdujo a través de la misma incisión infraumbilical, fijando el extremo evertido al peritoneo con prolene 6/0 (Ethicon, EE.UU.). Este catéter se tunelizó subcutáneo por el lado contrario al que se hizo la tunelización del catéter vesical, para evitar la posible lesión accidental del mismo. Finalmente para no confundir los catéteres, el peritoneal se marco con esparadrapo de tela y el vesical con rotulador indeleble. El cierre de la pared abdominal se realizó con puntos sueltos de seda del 3/0 en dos planos uno englobando peritoneo, músculo y fascia; y el otro cerrando piel.

En el caso de los ratones el catéter utilizado fue de las mismas características pero de menor diámetro P-10, (Becton Dickinson, Inglaterra), mientras que la técnica quirúrgica utilizada fue la misma que en ratas.

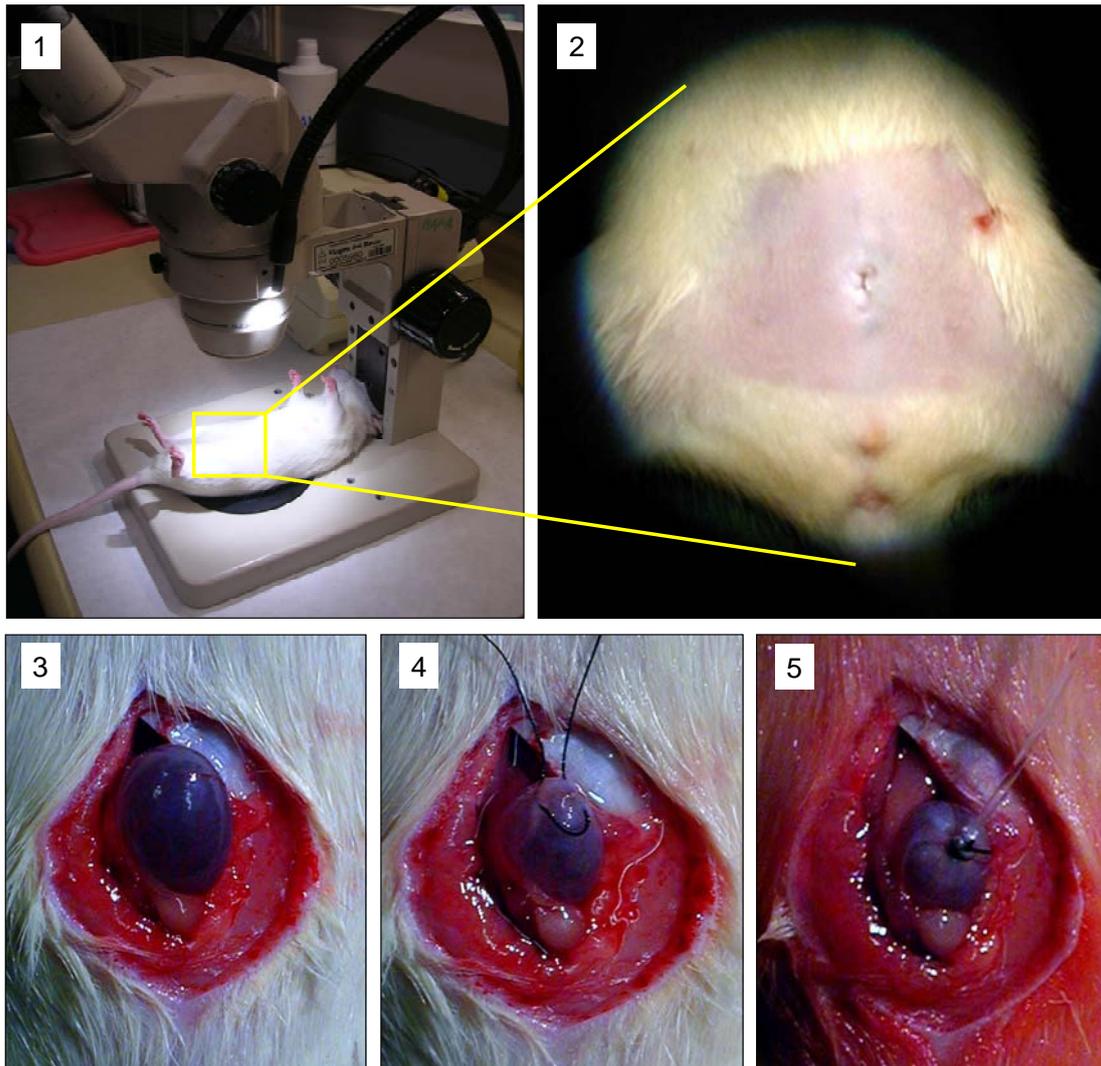


Figura 12. Posición de la rata durante la colocación del catéter (1), zona que se rasura (2), incisión media infraumbilical, exteriorización de la zona avascular de la cúpula vesical (3), punto en bolsa de tabaco (4), incisión de la vejiga y fijación del catéter (5).

2.3. Modelo urodinámico animal

2.3.1. Adaptación y calibración del equipo experimental

Para la realización del estudio urodinámico en el animal de experimentación se realizó adaptación y puesta a punto de un polígrafo HP que se utilizaba para manometrías en humanos. Así el transductor piezoeléctricos (H-P 7758D), destinado a detectar el volumen de orina de cada micción se adaptó para transformarlo en un flujómetro de peso clásico. Fijando el transductor en posición totalmente horizontal colocamos una pieza de silicona plástica, no deformable de 15 mm de diámetro, sobre la zona de medición del

transductor, y sobre ésta un recipiente de 30 ml de capacidad, con las medidas de volumen marcadas. El transductor con el recipiente acoplado se colocó bajo el embudo de la jaula metabólica (Gazzada Buguggiatate, Italia). Sin embargo, este mismo transductor al utilizarlo para el registro de presiones intravesicales no precisó modificación alguna, simplemente se intercalaron en el sistema de infusión continua.

La calibración de los transductores de volumen se realizó con pipeta automática (P-1000), de forma que el peso de un mililitro de suero fisiológico produjera en el registro un ascenso de 1 mV, facilitando así los cálculos posteriores del volumen miccional. La calibración del transductor de presión intravesical se hizo con la bomba de infusión continua al ritmo que se utilizara, según fueran ratas o ratones, colocando el extremo distal del catéter a nivel de la rejilla de la jaula metabólica y asignando a ese valor de presión 0 cm de H₂O. Posteriormente ascendiendo el catéter sobre una regla métrica se fueron asignando el resto de valores hasta los 100 cm de H₂O. Ambas calibraciones se comprobaban siempre antes de cada estudio urodinámico. Los sistemas de suero se cambiaron periódicamente para evitar el depósito de sales en éstos.

2.3.2. Registro del estudio urodinámico en ratas.

Los estudios urodinámicos se realizaron sin anestesia alguna 2 días después de la implantación del catéter vesical, para evitar así las alteraciones de la función vesical descritas con los anestésicos e implantación del catéter vesical (Mattiasson y Uvelius, 1982; Yaksh, 1986; Malmgren, 1987). Una vez seccionado el extremo sellado del catéter vesical que se había exteriorizado entre los dos pabellones auriculares, se vaciaba la vejiga a través de éste y después se conectaba al catéter de infusión continua (diámetro externo 0,85 mm, diámetro interno 0,45 mm, Braun, Alemania). El embudo de esta jaula permitió recoger y medir el volumen miccional que caía sobre el recipiente de 30 ml, acoplado al transductor de presión (H-P 7758D).

Mediante una bomba de microperfusión (Alaris, Ivac P1000) se infundió suero fisiológico a temperatura ambiente ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), a un ritmo de llenado vesical de 0,1 ml/min en las ratas (Mattiasson, 1982; Malmgren, 1987) y 0,01 ml/min en los ratones (Yaksh y col., 1986, Lundbeck y col., 1989). La presión intravesical y el volumen miccional eran

registrados de forma continua en un polígrafo Hewlett-Packard (Polígrafo H-P 7758D) a una velocidad de registro de 10 mm/min (figuras 13 y 14).

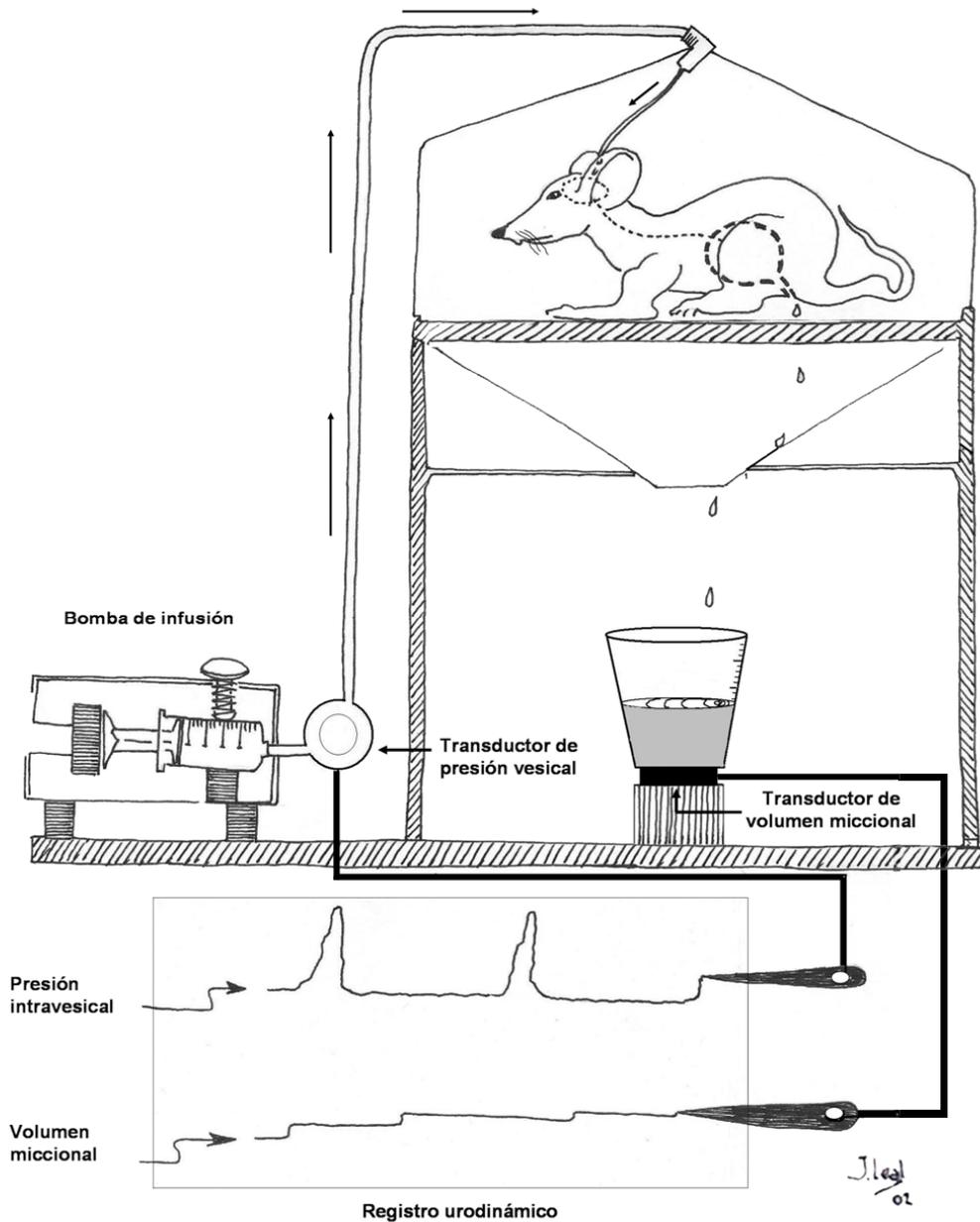


Figura 13. Esquema que muestra la disposición y función de los distintos componentes del equipo de urodinámica. El suero fisiológico inyectado por la bomba de perfusión continua, pasa a través de la membrana situada sobre el transductor de presión intravesical en su camino hacia el catéter vesical que asoma entre los pabellones auriculares (seguir flechas). Este catéter discurre subcutáneo hasta alcanzar la cúpula vesical. El suero que llega a vejiga la distiende hasta desencadenar la micción, el incremento de presión intravesical se trasmite de forma retrógrada hacia el transductor. La orina recogida por el embudo de la jaula metabólica se desliza hasta el vaso colocado sobre el transductor de presión que registra el volumen emitido.

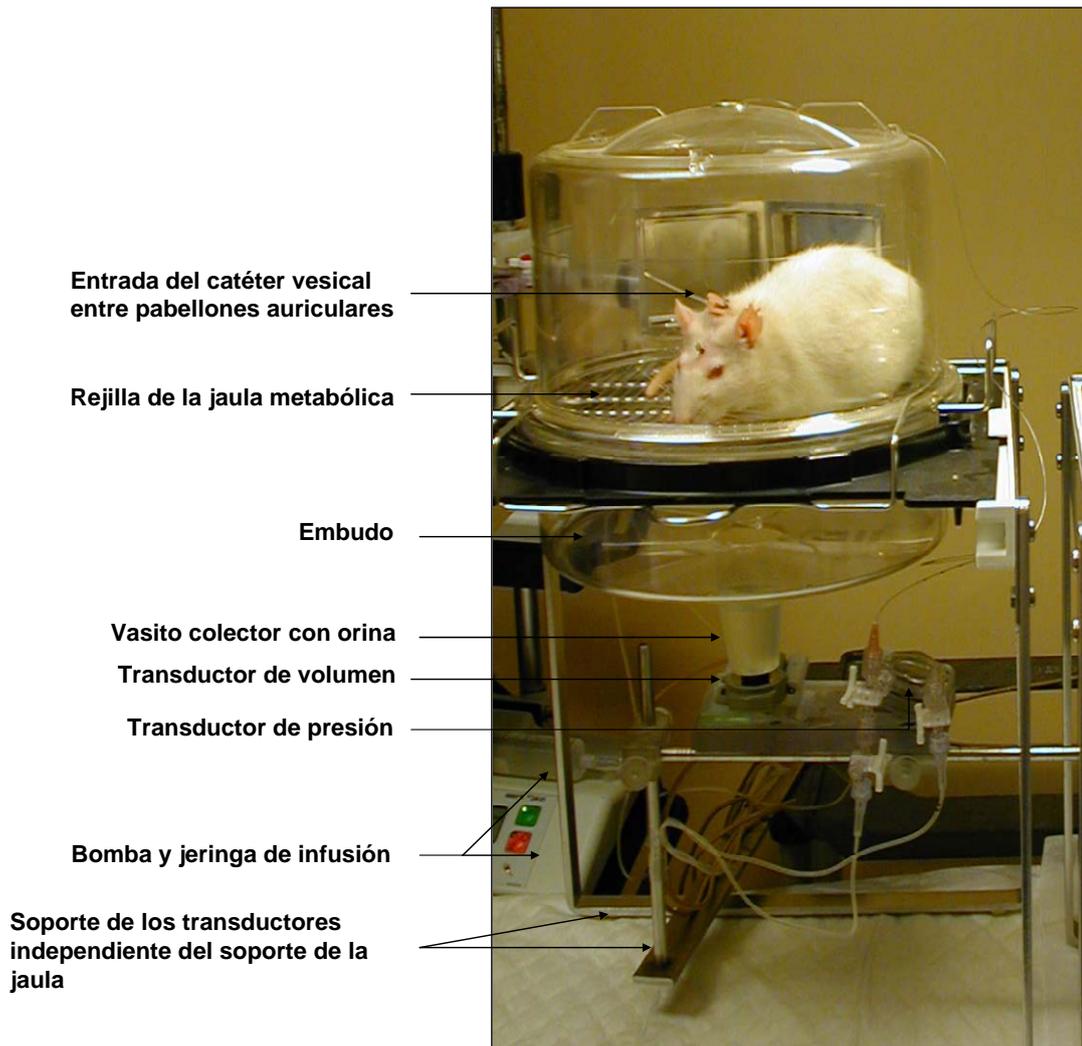


Figura 14. Fotografía que muestra los distintos componentes del modelo de urodinámica animal desarrollado, además de identificarse todos los componentes comentados en la figura 21, se puede observar como los transductores están colocados sobre un soporte independiente para disminuir en el registro el ruido que genera el movimiento de las ratas.

Los estudios se realizaron entre las 11 a.m. y las 5 p.m. (fase diurna de un ritmo cíclico de 12 horas luz, 12 horas oscuridad, en el que el ciclo de luz comenzaba a las 8 a.m.) para evitar las variaciones diurnas que han sido descritas (Yaksh, 1986.). Se utilizó silicona líquida (Alesil, España) para disminuir la tensión superficial de la orina sobre la pared del embudo colector y así minimizar cualquier pérdida de volumen. A todos los animales se les mantuvo un periodo de adaptación de 60 a 80 minutos, para conseguir un patrón miccional estable, con ciclos miccionales reproducibles. Periodos estables de 30 minutos fueron utilizados para calcular las diferentes variables urodinámicas del estudio.

Al final del estudio urodinámico algunos animales fueron inyectados intraperitonealmente con una dilución de L-dopa (Sigma, EE.UU.) y carbidopa (Sigma, EE.UU.) en proporción 4:1 (como se utiliza habitualmente en humanos), inyectando 7,5 mg/kg de un stock de 2 mg/ml en suero fisiológico. Para evitar manipular el animal una vez que el registro era estable, se conectó el catéter peritoneal a la jeringa con la dilución de L-dopa-carbidopa desde el inicio del estudio urodinámico y tras obtener un registro basal estable y regular de al menos 30 minutos se realizó la inyección. Tras ésta se mantuvo el registro urodinámico durante 60 minutos más. La solución de L-dopa y carbidopa se preparó siempre 30 minutos antes de cada estudio urodinámico.

2.3.3. Digitalización de la señal

Los primeros estudios urodinámicos se realizaron con un polígrafo analógico y se registraron sobre papel, a una velocidad de 10 mm/min. Posteriormente para facilitar el cálculo de las variables de estudio que veremos a continuación se amplificó y digitalizó la señal analógica (de presión). Se utilizó un conversor analógico digital (National Instruments NI-DAQCard-6024E), compatible con el ordenador portátil utilizado (Pentium 4, Airis). Aparte de este hardware fue necesario la elaboración de un programa para el manejo de la señal digitalizada, que se hizo con un software de programación gráfica (Labview, National Instruments, EE.UU.). Posteriormente se realizó estudio y acoplamiento de la señal. Este trabajo se realizó en colaboración con el Departamento de Electrónica de la facultad de Telecomunicaciones de la Universidad de Sevilla y fue motivo de un proyecto fin de carrera. Esta digitalización de la señal permitió el ajuste de la línea de base de forma automática, la mayor exactitud de las medidas registradas y la exportación automática de los valores de presión y volumen a una hoja de cálculo Excel. Esto último permitió agilizar el cálculo del valor medio de las variables y obtener unas graficas más claras.

2.3.4. Variables de estudio

Las variables de estudio fueron la presión miccional (máxima presión durante la micción), la presión basal (la presión vesical más baja registrada), la presión umbral (presión vesical inmediatamente antes de la onda de contracción vesical), la capacidad vesical (volumen infundido entre una micción y la siguiente), el volumen miccional

(volumen de orina excretado), el volumen umbral (volumen infundido inmediatamente antes del inicio de la onda de contracción vesical), la frecuencia y amplitud de los cambios espontáneos de presión intravesical (> 5 cm H₂O y sin micción acompañante) y el tiempo intermiccional (figura 15 y tabla 6). Todas las variables se obtuvieron de la zona más estable y reproducible del registro, haciendo la media de al menos tres valores de cada parámetro.

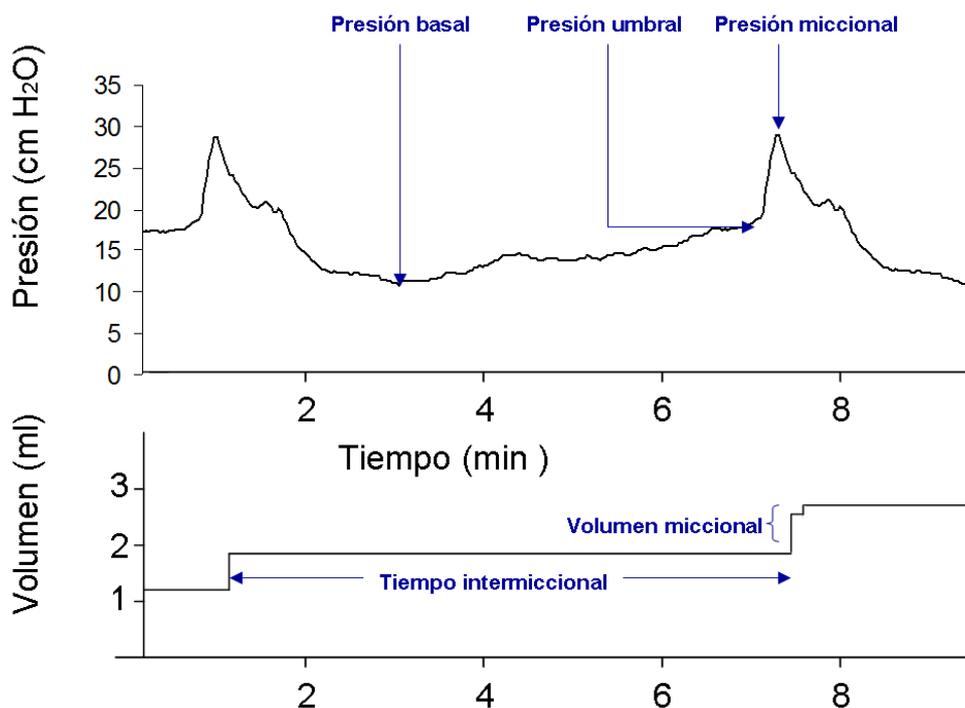


Figura 15. Muestra la forma de obtener cinco de las variables de estudio en uno de los registros urodinámicos obtenidos. Estas cinco variables junto al flujo de perfusión permiten el cálculo del resto de variables que se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Variables de estudio y forma de calcularlas.

Variables de estudio	Abreviatura	Modo de calcularla
1. Presión miccional	(Pm)	Ver figura 15
2. Presión basal	(Pb)	Ver figura 15
3. Presión umbral	(Pu)	Ver figura 15
4. Capacidad Vesical	(Cv)	Flujo de infusión (mL/min) x TI (min)
5. Volumen miccional	(Vm)	Ver figura 15
6. Volumen umbral	(Vum)	Vol perfundido antes de onda contráctil
7. Frecuencia de CEP	(FCEP)	Nº de cambios de P > 5 cm. H ₂ O
8. Amplitud de CEP	(ACEP)	Amplitud de esos cambios espontáneos.
9. Tiempo intermiccional	(TI)	Ver figura 15

CEP: Cambios espontáneos de presión.

2.4. Método utilizado para producir parkinsonismo central bilateral

Tras la anestesia y profilaxis antibiótica ya comentadas, y 30 minutos antes de la manipulación esterotáxica, se inyectó desipramina (Sigma, EE.UU.), a 15 mg/mL de ClNa+ 0,9%, a razón de 30 mg/Kg de peso, con el fin de prevenir el daño oxidativo de las neuronas noradrenérgicas que produce la 6-OHDA. Una vez anestesiados, las ratas se fijaron al aparato de estereotaxia (Stoelting, EE.UU.) mediante barras articuladas interaurales, que cuando están bien colocadas provocan un reflejo de parpadeo del animal. La barra de sujeción de los incisivos se, colocó a 3,3 mm por debajo de la línea interaural (figura 16 y 17). Tras rasurar y lavar la zona dorsal de la cabeza con povidona yodada (Betadine, Francia), se realizó incisión longitudinal de la piel, tejido celular subcutáneo y periostio, dejando expuestas las líneas de fusión ósea, y sus intersecciones. Las coordenadas esterotáxicas de inyección en el tercer ventrículo, fueron en referencia a bregma (punto de intersección de las suturas sagital y coronal) las siguientes: anteroposterior (AP) = -2 mm; lateral (L) = 0 mm; dorsoventral (DV) = -9 mm (figura 18 y anexo 7). (Paxinos y Watson, 1986).

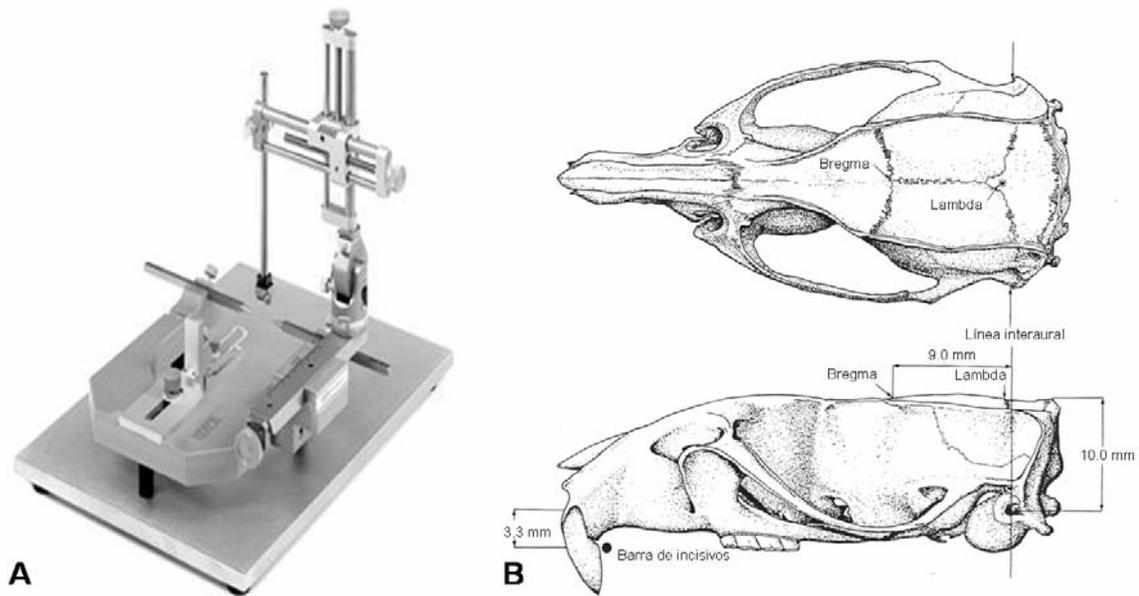


Figura 16. A) aparato de estereotaxia utilizado. B) Vista superior y lateral del cráneo de una rata wistar en las que se muestran las referencias anatómicas utilizadas. (Paxinos y Watson, 1986)

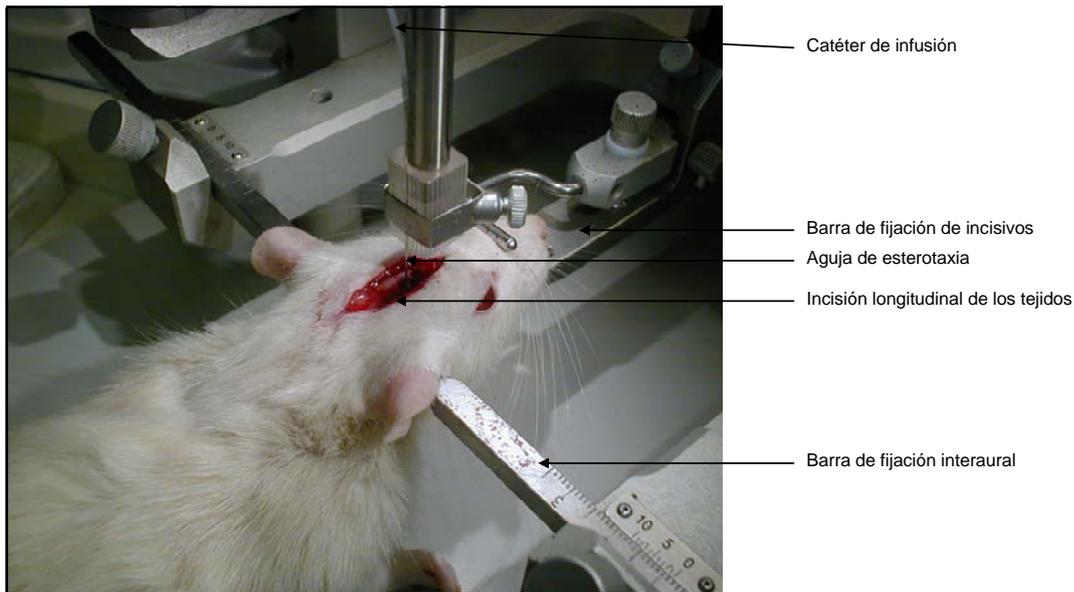


Figura 17. Rata wistar sujeta por las barras interaurales y de incisivos. Obsérvese la incisión y la aguja de esterotaxia entrando por el orificio de trepanación.

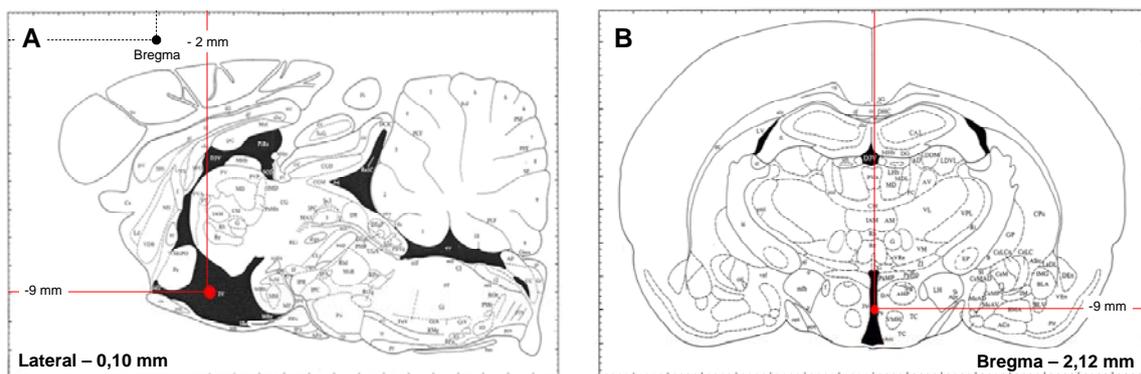


Figura 18: Cortes longitudinal (A) y coronal (B) de cerebro de rata wistar, donde se muestran las coordenadas seguidas para la inyección esterotáxica dentro del tercer ventrículo (en rojo). (Modificada de Paxinos y Watson, 1986)

Para producir la lesión dopaminérgica se utilizó 6-OHDA a la concentración de 29,16 mg/ml, que se combinó previamente con ácido ascórbico a una concentración de 0,3 mg/ml para evitar la oxidación del tóxico. La inyección de 6-OHDA se realizó con jeringa hamilton de 25 μ l de volumen (Aldrich, EE.UU.) conectada a un tubo de poliestireno (diámetro externo: 0,8 mm, diámetro interno 0,4 mm; Portex Inglaterra) a su vez en conexión con una aguja de 30 g. Para evitar incrementos bruscos de presión intracraneal se utilizó bomba de microperfusión (Modelo 100 Stoelting Co., EE.UU.) a un ritmo de 2 μ l/min durante 6 minutos hasta inyectar un total de 12 μ l. La cánula se mantuvo durante 5 minutos en la diana para que difundiera el tóxico y después se sacó lentamente del cerebro.

Para que la lesión fuera estable dejamos transcurrir una semana antes de la colocación del catéter vesical y posterior estudio urodinámico.

Los animales control de la manipulación estereotáxica, se obtuvieron siguiendo la misma sistemática de trabajo pero en lugar de inyección intraventricular de 6 OHDA se inyectó el mismo volumen de suero fisiológico, al mismo ritmo de perfusión.

2.5. Estudio histológico

Al finalizar el estudio urodinámico se anestesiaron los animales (con una dosis 1,5 veces mayor a la utilizada en los procedimientos quirúrgicos previos) y se sacrificaron utilizando una guillotina (VPI, Gran Bretaña). La extracción del cerebro se realizó inmediatamente, a través de incisión longitudinal de la piel, tejido celular subcutáneo y periostio, utilizando después gubias para retirar los huesos de la calota sin lesionar la corteza cerebral. En la base del cerebro se seccionaron los nervios ópticos y el tronco del encéfalo por debajo del cerebelo. Tras la extracción se lavó con PBS frío a 4°C para retirar la sangre y posteriormente se fijó con paraformaldehído (Sigma, EE.UU.) al 4% (peso/vol) en PBS a 4°C, durante 12-16 h.

La inclusión, previa al corte, se realizó con agarosa de bajo punto de fusión (Pronadisa, España) al 10% (peso/vol) en PBS. El tejido se cortó inmerso en PBS a 4°C, utilizando un vibrotomo (Lancer, EE.UU.), obteniendo secciones de 60-100 µm de espesor. Las secciones se dejaban en PBS a 4°C. El procesamiento histológico se realizó con las secciones en inmersión, dentro de placas de petri de vidrio de 60 mm de diámetro, utilizando un agitador orbital (S.B.S, España).

Se empleó la técnica de inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos frente a la tiroxina hidroxilasa, enzima limitante de la síntesis de catecolaminas, que permite la tinción de grupos neuronales noradrenérgicos, dopaminérgicos y de otros grupos neuronales catecolaminérgicos. Tras liberar las secciones de tejido de la agarosa circundante, se lavaron 2 veces (5 min. cada vez) con tritón X-100 (Sigma, EE.UU.) al 0,1% (vol/vol) en PBS (solución denominada PBTx en lo sucesivo), para permeabilizar las membranas celulares. A continuación se deshidrataron empleando concentraciones progresivas crecientes de metanol (Merck, Alemania) en PBTx (25, 50 y 75%, vol/vol). Tras dos

lavados en metanol puro, se rehidrataron empleando diluciones progresivamente mayores de metanol en PBTx (75, 50 y 25%, vol/vol). Los pasos de deshidratación y rehidratación de 5 minutos cada uno, con un disolvente orgánico como el metanol, favorecen la permeabilización de las membranas celulares. Tras 2 lavados de 5 minutos en PBTx, se sometieron las secciones a un tratamiento permeabilizante con tritón X-100 al 0,3% (vol/vol) en PBS durante 5 minutos, pasado el cual se lavaron dos veces, 5 minutos cada vez, con PBS. Seguidamente se bloqueó la actividad peroxidasa endógena dejando las secciones durante 2 h a 4°C en una solución de H₂O₂ (Fluka, Suiza) al 0,4% (vol/vol) en PBS. Después de dar dos lavados de 5 minutos con PBTx, se traspasaron las rodajas a placas de poliestireno (Nunc, Dinamarca) de 12 pocillos (de 7 ml de vol) y se dejaron 2 h a 4°C en solución de bloqueo, la cual disminuye las uniones inespecíficas del anticuerpo y tiene la siguiente composición: suero neonatal bovino (Gibco, España) al 10% (vol/vol) y albúmina bovina (Sigma, EE.UU.) a una concentración de 1 mg/ml en PBTx a 4°C. Las secciones se incubaron de 12 a 16 horas con el anticuerpo primario (1:1000; Chemicon, EE.UU.) en solución de bloqueo. Los lavados del anticuerpo primario se realizaron en las placas de petri cada 30 minutos, durante 8 horas, con PBTx. Seguidamente se incubaron las secciones con el anticuerpo secundario conjugado con biotina (1:200, Pierce, EE.UU.) en solución de bloqueo, durante 12 – 16 h a 4°C, en las placas de poliestireno. A continuación se lavaron con PBTx durante 8 h, cada 30 minutos, en las placas de petri. Pasado este periodo se traspasaron las rodajas de nuevo a placas multipocillo (Nunc, Dinamarca) y se dejaron 1 h a 4°C con albúmina bovina, a una concentración de 2 mg/ml en PBTx. Se preparó el kit de amplificación basado en avidina y peroxidasa biotinilada (kit ABC, Vector, EE.UU.), en oscuridad, de 30 a 45 minutos antes de usarlo. Se dejaron las secciones 2 h en oscuridad con el kit ABC y se lavaron después con PBTx 2 veces, 5 minutos cada vez. Se traspasaron a pocillos cóncavos de vidrio y, tras incubadas de 30 minutos a 1 h con 0,7 mg/ml de 3,3'-diaminobencidina (DAB, Sigma, EE.UU.), se reveló la señal en oscuridad con H₂O₂ al 0,05% (vol/vol) en DAB. La reacción se detuvo lavando varias veces con PBS (tabla 7 y figura 19).

Tabla 7: Soluciones utilizadas para la inmunohistoquímica y modo de preparación

PBS: Solución tampón sódico. (Na_2HPO_4 1,44g, KH_2PO_4 0,24g, KCL 0,2g, NaCl 8g, H_2O MQ hasta 1L, ph 7,4, autoclavado).

PFD 4%: Paraformaldehído al 4% en PBS, se disuelve a 68°C y se filtra.

PBTx: PBS con tritón a la concentración indicada. El stock de tritón es al 10 % en agua MQ. Se conserva a temperatura ambiente.

FCS: El suero tiene que ser inactivado con calor (65°, 30 min); se alicuota y se conserva a -20°C.

BSA (solución bloqueante): El stock de BSA es 20 mg/ml en agua MQ; se alicuota y se conserva a -20°C.

DAB: Se disuelve una pastilla en 5 ml en agua MQ y se filtra (0,22 μm) en oscuridad.

Azida de sodio: El stock es 2 % en agua MQ y se guarda a -20°C. Se prepara en la campana de extracción, es muy tóxica.

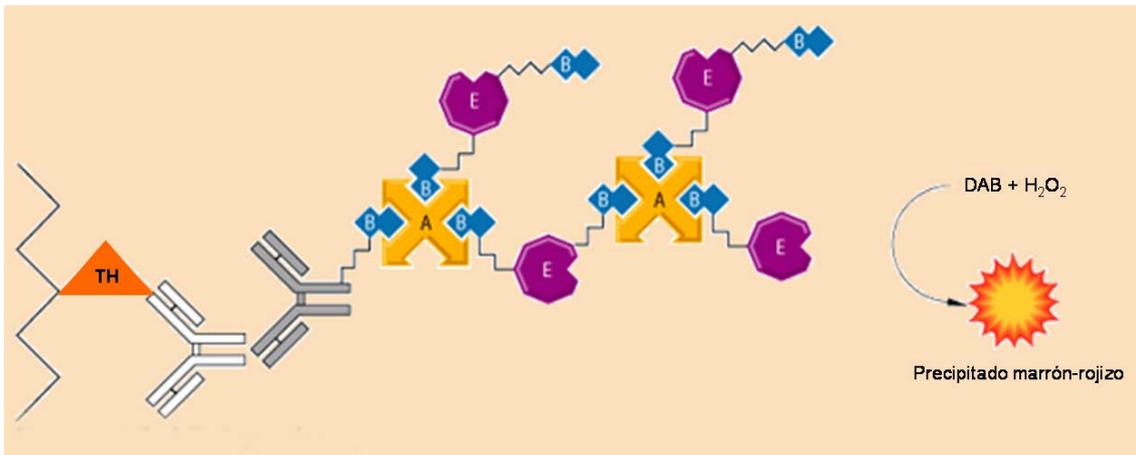


Figura 19: Esquema del funcionamiento del kit ABC para la amplificación de la señal inmunohistoquímica, donde la tiroxina hidroxilasa (TH) es el antígeno sobre el que se acopla el anticuerpo primario (en blanco). Sobre la fracción C se acopla el anticuerpo secundario biotinilado y sobre este las moléculas de avidina que amplifican la señal al permitir la unión de la biotina (B) peroxidasa (E) que favorece la reacción que produce el precipitado marrón rojizo característico.

Las secciones se montaron sobre los portas con PBS; una vez extendidas y lo suficientemente secas se les puso glicerol al 50% en PBS, con 0.02% de azida (Merck, Alemania) y se dejaron reposar 15 min. A continuación se les puso el cubre, y pasado 1-2 días se lacaron para sellarlas y que las rodajas no se sequen con el paso del tiempo.

Para la evaluación de los rodajas colocadas en los portas, se utilizó un microscopio Olympus BX61 (Olympus, Japón). Las microfotografías digitales se realizaron en las mismas condiciones de luz y exposición con la cámara Olympus DP70 (Olympus, Japón) y con el software facilitado por la misma casa para esta cámara.

2.6. Análisis de los resultados histológicos.

Las secciones cerebrales de los animales inyectados con la 6-OHDA se compararon cualitativamente con las de los animales controles de la misma tanda, para eludir así la variabilidad en el marcaje de un experimento a otro.

La desnervación del estriado se determinó estudiando fotografías de las secciones procesadas mediante inmunohistoquímica frente a la TH, a dos niveles (+1,2 y -0,8 mm en el eje anteroposterior, con respecto a bregma) suficientemente separados del tracto dejado por la aguja de inyección (figura 20 A, B y C).

Para estimar si existían diferencias en el grado de lesión dopaminérgica de la sustancia negra, se tomaron secciones de cada rata procesada mediante inmunohistoquímica contra la TH, a -5.2 mm de bregma. A este nivel la sustancia negra está separada del área tegmental ventral (figura 20 A y D).

Para valorar la posible afectación del locus ceruleus por la acción de 6-OHDA, se realizó una estimación del grado de tinción TH positiva en locus ceruleus (a -10.05 mm de bregma) (figura 20 A y E).

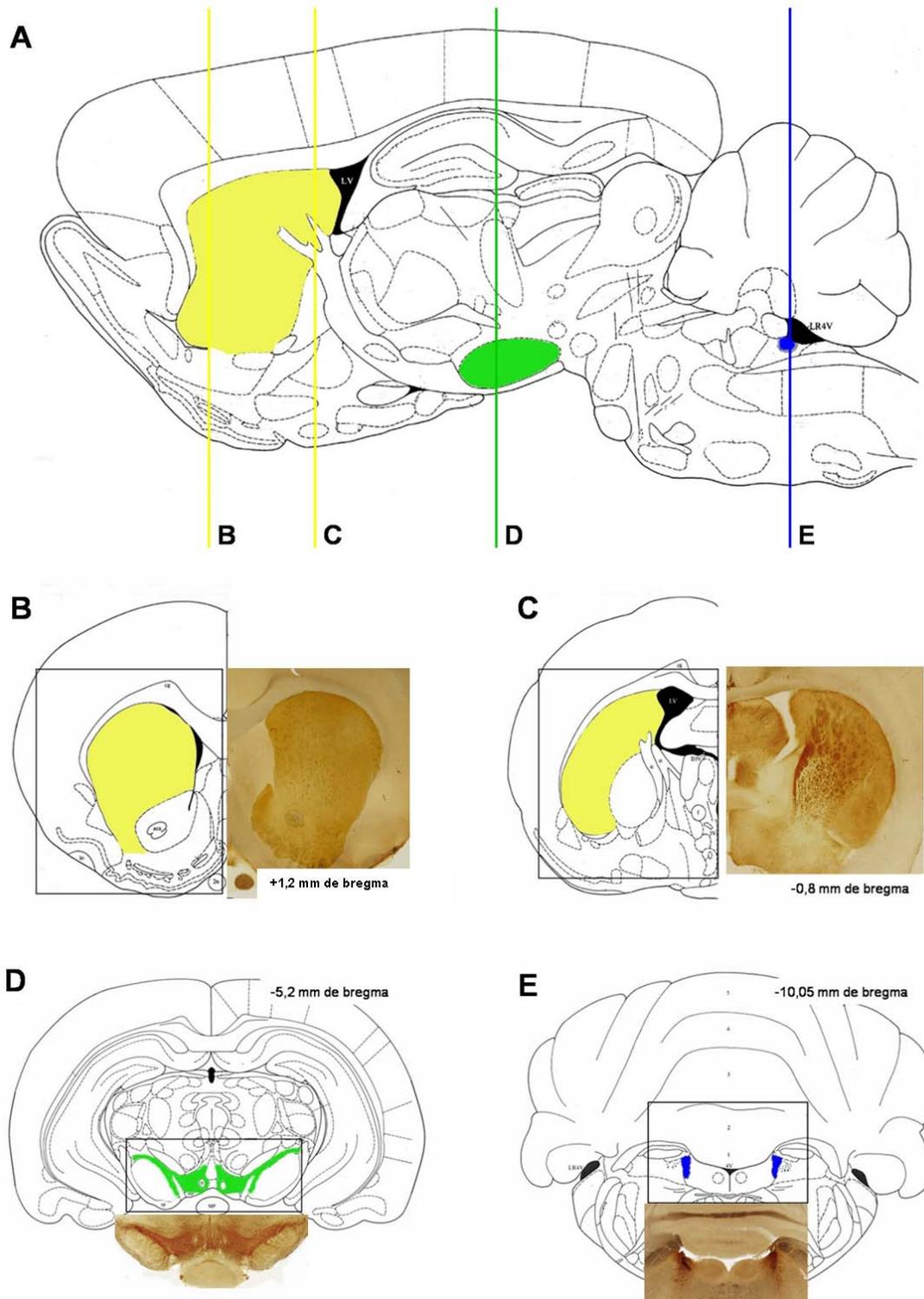


Figura 20: A) Corte sagital de cerebro de rata mostrando los distintos niveles estudiados: estriado (amarillo), sustancia negra (verde) y locus ceruleus (azul). El resto de esquemas e imágenes son secciones coronales y la fotomicrografía de inmunohistoquímica frente a tiroxina hidroxilasa correspondiente a estriado (B y C), sustancia negra y área tegmental ventral (D) y locus ceruleus (E).

2.7. Análisis de los resultados urodinámicos.

Las variables urodinámicas de estudio (ver punto 2.3.4 de material y método), se compararon utilizando el programa SPSS 12.0, realizando estadística descriptiva mediante el uso de frecuencias absolutas y relativas en el caso de las variables cualitativas. En ausencia de normalidad de la muestra las variables cuantitativas se expresaron mediante mediana (percentil 50) y rango intercuartílico [percentil 25-75]. La comparación de los resultados urodinámicos (variables cuantitativas) entre dos grupos, se llevó a cabo mediante la aplicación de la t de student y en ausencia de normalidad o $n < 30$, mediante la prueba de Mann-whitney y la prueba de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras independientes. Para la comparación de los valores urodinámicos pre y post inyección con L-Dopa-carbidopa se utilizó el test de Wilcoxon. Todos los test de hipótesis fueron de dos colas y el nivel de significación se estableció en $P < 0.05$. La representación gráfica de las variables cualitativas se llevó a cabo mediante diagramas de porcentajes acumulados. Las variables cuantitativas según grupos de estudio, se representaron mediante diagramas de cajas y bigotes.

IV. RESULTADOS

1. Resultados de la investigación clínica

1.1. Correlación entre síntomas urinarios y neurológicos en la EP

Para estudiar la posible correlación entre los síntomas motores de la EP y los síntomas urinarios, se incluyeron 19 pacientes con EP y puntuaciones en los cuestionarios de síntomas urinarios superiores a las estipuladas (para mayor detalle ver apartado 3.1.1 de “Material y Métodos”). En tres de ellos el sedimento urinario mostró nitritos positivos, por lo que se excluyeron del estudio. De los 16 pacientes restantes, 9 fueron varones y 7 mujeres, con una edad media de 69 (rango: 58–77) años. Todos presentaron urgencia y frecuencia miccional, y en 10 de ellos se produjeron episodios de incontinencia de urgencia en alguna ocasión. La puntuación media en la escala de síntomas urinarios fue 20 puntos en los varones y 12,15 en las mujeres.

El tiempo medio de evolución de la enfermedad de Parkinson en el momento del estudio fue de 4,3 (rango: 2–9) años, mientras que la gravedad media según la escala de Hoehn y Yahr fue de 3 (que corresponde a afectación bilateral leve a moderada con cierta inestabilidad postural, pero físicamente independiente). De los síntomas neurológicos estudiados la rigidez fue el de mayor intensidad (3,1 según la media en los ítems sobre rigidez de la UPDRS, donde 0 es rigidez ausente y 4 muy intensa).

Al correlacionar la intensidad de los síntomas urinarios con la intensidad de los síntomas neurológicos y otras variables clínicas (tabla 8), se observó que aquellos varones con más años de evolución, y más rigidez, tuvieron mayor intensidad de la sintomatología urinaria (figura 21). En el caso de las mujeres también se observó esta correlación pero no llegó a ser significativa. Sin embargo no se correlacionó la intensidad de los síntomas urinarios con la presencia de síntomas disautonómicos, temblor de reposo, inestabilidad, ni hipocinesia. Tampoco se observó correlación con la gravedad de la enfermedad.

Tabla 8 Correlación entre síntomas urinarios (IPSS ó IU-4), neurológicos y otras variables clínicas.

Variable clínica	Coefficiente de correlación IPSS	Coefficiente de correlación IU-4
Gravedad EP	0,429	0,356
Años de evolución EP	0,922**	0,798
Rigidez	0,847**	0,806
Hipocinesia	0,038	0,231
Inestabilidad	0,093	0,129
Temblor de reposo	0,442	0,427
Disautonomía	0,093	0,097

EP: enfermedad de Parkinson. IU-4: Cuestionario de incontinencia urinaria. IPSS: international prostate symptom score. Test utilizado: Rho de Spearman
 ** $P < 0.01$ correlación significativa (bilateral)

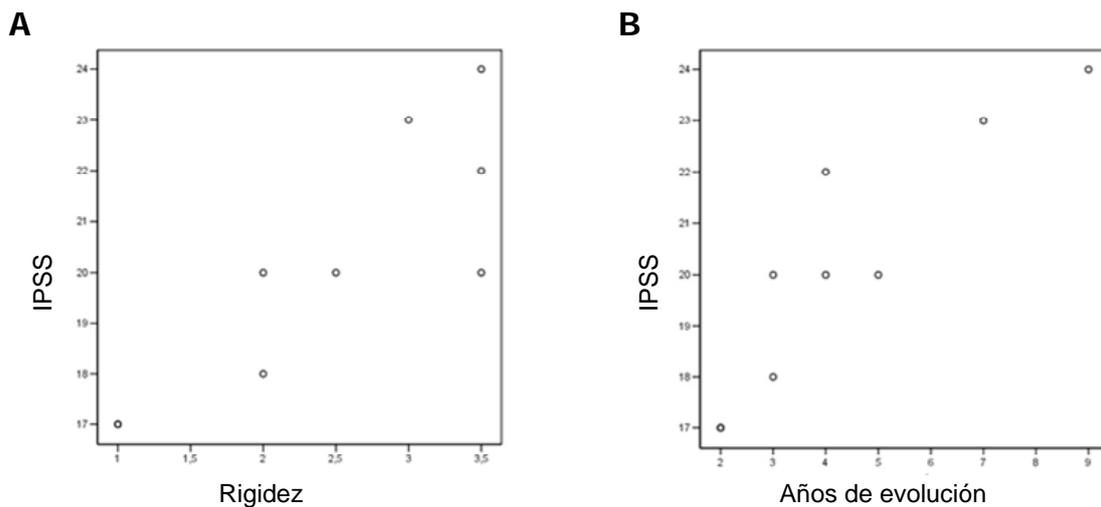


Figura 21: Correlación entre síntomas urinarios, rigidez (A) y años de evolución (B) en los varones con EP. IPSS: international prostate symptom score.

1.2. Alteraciones urodinámicas observadas.

El estudio urodinámico identificó disfunción vesical en el 92,8 % de los pacientes, tras el cual se asignó diagnóstico de HDD en 13 casos (81,2%), hipocontractilidad en uno y alteración de la función esfinteriana en otro. En uno de los pacientes no se evidenció alteración urodinámica (tabla 9). De los 13 casos con HDD, 9 fueron varones y 4 mujeres. Cuatro de los varones además de HDD cumplieron los criterios de obstrucción al flujo

urinario. Así dentro de los pacientes con HDD distinguimos tres subgrupos: varones con obstrucción, varones sin obstrucción y mujeres (tabla 10).

Las mujeres y los varones sin signos urodinámicos de obstrucción, presentaron menor capacidad vesical media, mayor porcentaje de incontinencia de urgencia y aparición de ondas de HDD con volúmenes medios de infusión menores, que aquellos varones con HDD y signos urodinámicos de obstrucción.

Tabla 9 Diagnósticos urodinámicos*

Hiperactividad del detrusor	13
Hipocontractilidad del detrusor	1
Arreflexia del detrusor	0
Alteración de la función esfinteriana	1
Sin alteración evidenciable mediante urodinámica	1

* Según los criterios especificados en material y método

Tabla 10 : Comparación de los estudios urodinámicos de EP con HDD

	Hombre con obstrucción	Hombre sin obstrucción	Mujeres	p
CV máxima (ml)	237 [210-291]	182 [158-202]	191 [166-197]	*
Vol. HDD (ml)	153 [136-166]	98 [94-102]	103 [90-108]	*
Amp HDD (cm H ₂ O)	65 [54-69]	45[40-54]	41 [39-45]	*
Q máx (ml/s)	7 [5-9]	13 [12-14]	14 [12-15]	*
Pdet Qmax (cm H ₂ O)	66 [54-69]	22 [11-27]	25 [24-27]	*
VRP (ml)	37 [7-45]	0	0	
IU (%)	50	100	75	

*Amp HDD: amplitud de la mayor contracción involuntaria del detrusor. CV: capacidad vesical. EP: enfermedad de parkinson. HDD: hiperactividad del detrusor. IU: incontinencia de urgencia. PdetQmax: presión de detrusor en el pico de flujo. Q máx: flujo máximo. Vol. HDD: volumen al que se produjo la primera onda de HDD. VRP: volumen de residuo postmiccional. *: P<0.05. Utilizando para la comparación la prueba de Kruskal-Wallis. [] Rango intercuartílico*

1.3. Respuesta al tratamiento con tolterodina y causas de HDD identificadas

Como ya se indicó en la introducción (apartado 2.2) tolterodina es un anticolinérgico antimuscarínico de acción periférica que puede producir retención aguda de orina en pacientes con obstrucción. De los 13 pacientes con HDD cuatro presentaron HDD y signos clínicos y urodinámicos de obstrucción urinaria secundaria a hipertrofia prostática, por lo que no recibieron tratamiento con tolterodina. Entre los 9 pacientes restantes que realizaron

tratamiento se produjo una pequeña mejoría, que consistió en una disminución en la puntuación media de los cuestionarios de síntomas urológicos, pasando de 20 a 18 en los varones (escala IPSS) y de 12,15 a 7,50 en las mujeres (escala IU-4). En ningún caso se consiguió que los pacientes con incontinencia quedaran secos, pero sí una disminución (del 33%) en la puntuación de los ítems de urgencia y frecuencia. La irregularidad en la cumplimentación del diario miccional no nos permitió valorar otros parámetros. El tratamiento con anticolinérgicos no produjo episodios de retención aguda de orina, ni ninguna otra reacción adversa, a excepción de sequedad de boca en dos casos. En un caso se produjo infección urinaria en los días posteriores al estudio urodinámico, que se atribuyó a la manipulación. Por otro lado en todos los pacientes que presentaron clínica de HDD se identificaron dos o más causas posibles que justificaban esa clínica de HDD, entre las que se encontraron: la propia EP, la medicación de la enfermedad (todos los pacientes realizaban tratamiento al menos con L-DOPA), la HBP, y la edad (tabla 11).

Tabla 11 **Distribución de las posibles causas de HDD**

Casos causas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
E.P	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
L-DOPA	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Ago.DOPA				×	×				×		×			×	×	×
>70 años	×			×	×						×				×	×
HBP						×				×			×	×		

Ago. Dopa: agonista dopaminérgico. E.P: enfermedad de Parkinson. HBP: hiperplasia benigna de próstata. HDD: hiperactividad del detrusor. L-DOPA: levodopa

2. Resultados de la experimentación animal

Nunca antes en nuestro país se habían realizado estudios urodinámicos en ratas no anestesiadas. Por tanto, inicialmente se exponen algunas de las dificultades o aspectos más importantes observados durante el desarrollo y puesta a punto de esta técnica, que es uno de los objetivos de este trabajo. Un total de 122 animales (10 ratones y 112 ratas) fueron necesarios para la puesta a punto del modelo urodinámico y para los experimentos realizados posteriormente. Tras la descripción de las dificultades encontradas y las medidas adoptadas para la obtención de un registro fiable y reproducible, se exponen los resultados de los estudios urodinámicos realizados en ratas controles, en ratas manipuladas esterotáxicamente y en ratas con parkinsonismo central.

2.1 Desarrollo y puesta a punto del modelo de urodinámica en animales

2.1.1. Artefactos, errores controlados y ajustes realizados.

A) Estimación del volumen miccional no registrado

Cuando las ratas colocadas sobre la rejilla de la jaula metabólica realizan una micción, la orina emitida pasa a través de la rejilla y desliza por las paredes del embudo hasta caer en el vaso colector colocado sobre el transductor. Con objeto de determinar si todas las micciones eran registradas y que cantidad de la orina emitida quedaba adherida a las paredes del embudo se realizaron los experimentos que se comentan a continuación. De 10 ratas wistar hembras con un peso medio de 310 g. (rango 276 - 339) a las que se colocó catéter vesical, 1 falleció en el postoperatorio inmediato. Se realizó estudio urodinámico en las 9 restantes. Tras un periodo inicial medio de adaptación a la jaula metabólica de 36 minutos se obtuvo un registro de presión intravesical estable y con contracciones vesicales cíclicas. El transductor de volumen miccional registró todas y cada una de las micciones observadas (figura 22). Sin embargo, no toda la orina emitida en cada micción llegó al vaso colector, una pequeña parte quedó adherida a las paredes del embudo a pesar de la impregnación de éstas con silicona, parafina y otras sustancias que disminuyen la tensión superficial.

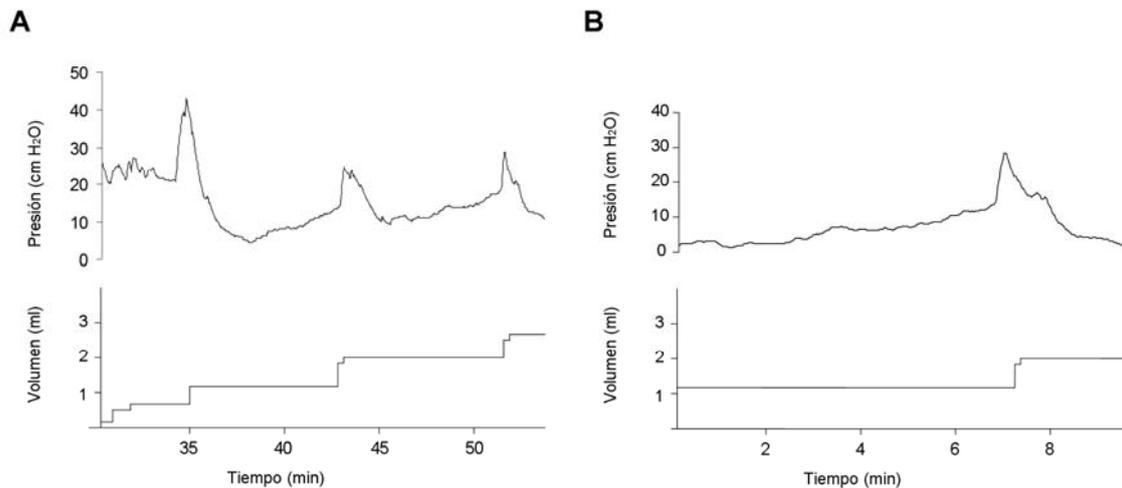


Figura 22: Registros urodinámicos de ratas wistar no manipuladas esterotáxicamente. **A)** La primera parte del registro muestra trazado de presión intravesical irregular, después del minuto 35 se observa normalización del registro de presión intravesical y de volumen miccional, comprobando que los incrementos de presión vesical (secundarios a las contracciones vesicales) coinciden con los incrementos de volumen producidos por cada micción. **B)** Muestra el incremento progresivo de presión vesical durante el llenado vesical hasta que se produce la contracción vesical.

Con objeto de determinar la cantidad de orina que quedaba en las paredes del embudo en cada micción hicimos el siguiente cálculo: volumen total infundido en 30 minutos menos volumen miccional total en 30 minutos es igual a volumen total de orina adherida a las paredes del embudo. Este volumen dividido entre el número de micciones en esos 30 minutos da como resultado el volumen medio de orina adherida a la pared del embudo en cada micción. Realizado este cálculo en 5 de esas 9 ratas se obtuvo un volumen medio de orina adherida a la pared del embudo en cada micción de 0,015ml (rango 0,006 – 0,04). Es decir que variaciones iguales o inferiores a este volumen podrían ser debidas a la orina que queda adherida a las paredes del embudo. Este volumen es muy bajo y no invalida el método utilizado, siempre que las diferencias observadas sean mayores 0,08 ml, es decir, un valor doble del rango superior.

Un modelo de estudio urodinámico en ratones permitiría utilizar distintos modelos genéticos de parkinsonismo, sin embargo, al intentar desarrollar este modelo en ratones no se consiguió un buen registro. Así, de 10 ratones C57BL/6 hembras con un peso medio de 22 g (rango 18-32) a los que se le colocó catéter vesical, no se produjo desinserción del catéter ni se evidenció infección de orina en ningún caso. El estudio urodinámicos se realizado dos días después de la colocación del catéter y a un ritmo de infusión de 0,01 ml/min. En los diez animales, tras la fase inicial de adaptación a la jaula, se obtuvo un registro de presiones fiable con contracciones vesicales cíclicas, sin embargo también en los diez animales el registro de micciones fue irregular. No se registraban todas las micciones (figura 23). Debido al escaso volumen miccional en estos animales, la orina de algunas de las micciones no deslizaba adecuadamente sobre el embudo, no siendo registradas. Además esa orina adherida a la pared del embudo era arrastrada por micciones posteriores que fueron de un volumen falsamente mayor. En uno de los animales de 30 micciones solo fueron registradas por el transductor 11 de ellas. En este mismo animal las variaciones en el volumen miccional oscilaron entre 0,08 y 0,15 ml. La imposibilidad de obtener un registro fiable, incluso utilizando un embudo de mayor pendiente, desechó el modelo urodinámico en ratones.

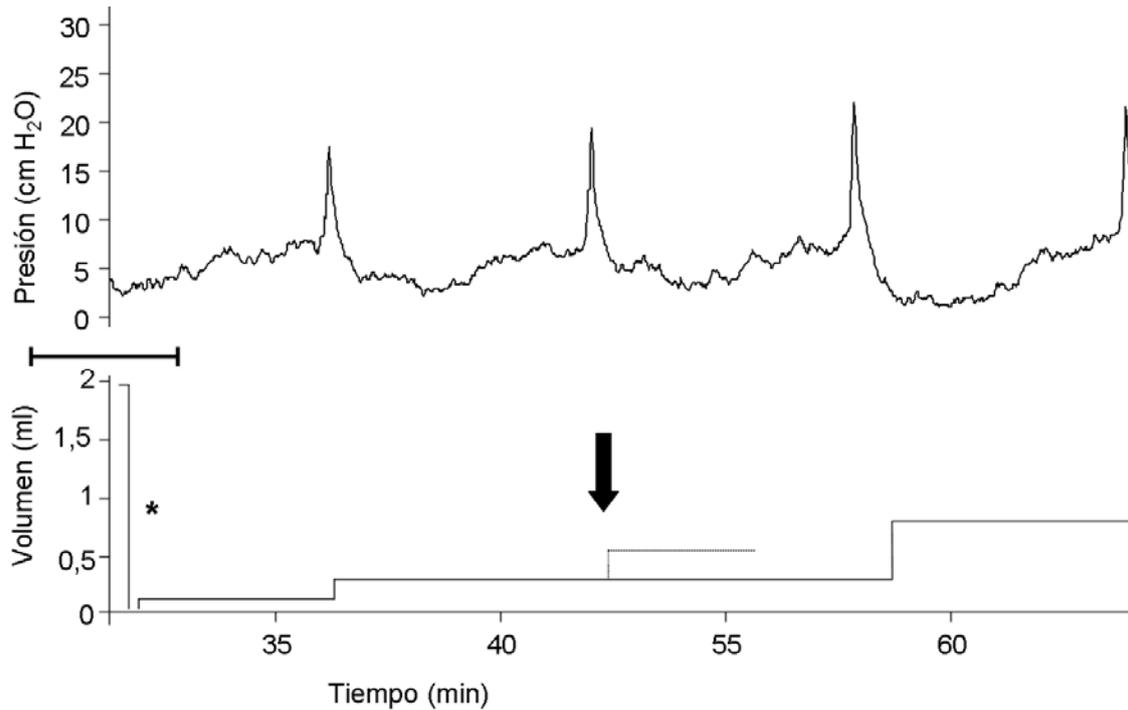


Figura 23: Registro urodinámico de ratón que muestra un adecuado registro de presiones intravesicales, con contracciones rítmicas y regulares. Sin embargo, no todas las micciones fueron registradas. *Ajuste de la línea de base. La flecha negra muestra los puntos discontinuos que representan donde debía haberse registrado la segunda micción que no ha sido registrada, mientras que la tercera micción registra un volumen miccional mayor de lo habitual (cada micción tiene un ascenso de volumen distinto).

B) Acodamiento del catéter de infusión. Falsa micción

Otros problemas observados en los estudios urodinámicos en ratas, y que han sido tenidos en cuenta en las determinaciones y cálculos posteriores son: el ascenso lineal de la presión intravesical secundario al acodamiento ocasional del catéter de infusión, producido por los giros del animal sobre si mismo (figura 24A). Este ascenso lineal que cae al deshacer el codo, podía confundirse con una contracción vesical. Otro evento que podía inducir a error fueron los ascensos del registro de volumen producidos por la caída, en el vaso colector, de heces que pasaban la rejilla de la jaula metabólica (figura 24B). Estos eventos se marcaron en el registro para evitar posibles confusiones a la hora de leer y evaluar los datos.

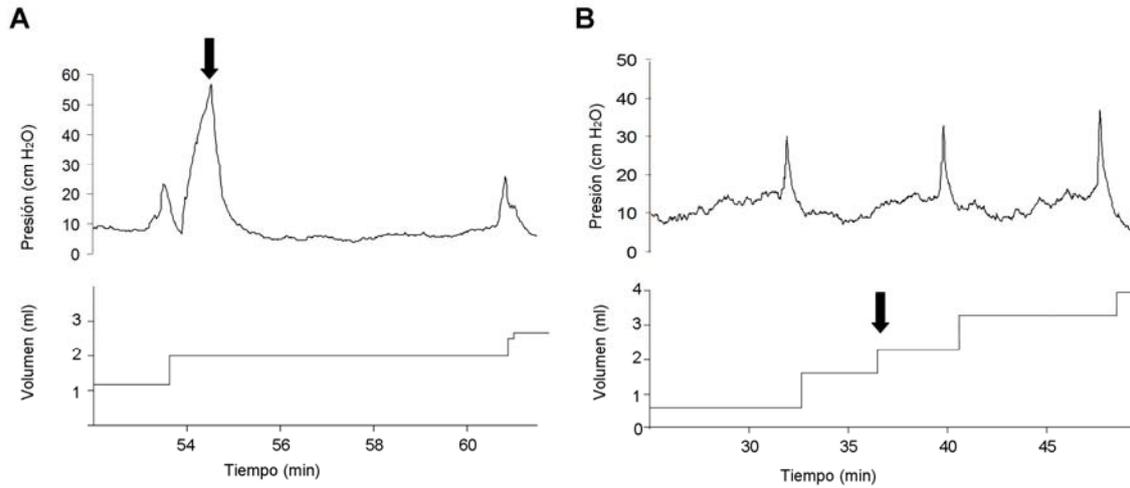


Figura 24: A) Ascenso producido por acodamiento del catéter y descenso tras deshacerlo. B) Incremento de volumen miccional producido por la caída de heces en el vasito colector. Ambos eventos (flechas negras) se marcaron así para no confundirlos con una contracción vesical ni con una micción.

C) Retraso en el registro de la señal

Durante la puesta a punto del modelo, se comprobó que desde que la rata orinaba hasta que la orina caía en el vaso colocado transcurrían 2 segundos, es decir que los valores miccionales tenían un retraso de 2 segundos con respecto a los valores de presión vesical. Hecho que se tuvo en cuenta a la hora de realizar los cálculos de las variables de estudio propuestas (figura 25).

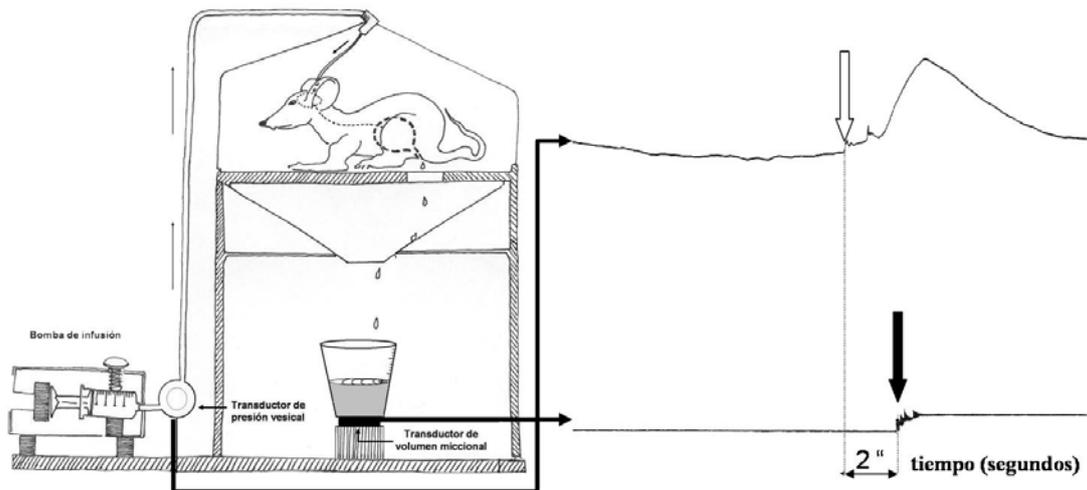


Figura 25: Esquema que muestra el espacio que recorre la orina desde la uretra de la rata hasta el vaso colector situado sobre el transductor de presión y el fragmento de registro urodinámico que muestra el retraso en el tiempo entre el inicio de la micción (flecha blanca) y la detección de ésta por el transductor de presión (flecha negra).

2.1.2. Resultado del estudio urodinámico en ratas controles

Una vez comprobada la fiabilidad y reproducibilidad de los estudios urodinámicos con el modelo urodinámico desarrollado (ver puntos anteriores), se propuso la determinación de los valores medios de la rata wistar en nuestro modelo para poder compararlos con los que ya comunicados por otros grupos (Mattiasson y Uvelius 1982; Maggi, 1986; Malmgren 1987).

Con este objetivo se colocó catéter vesical a 20 ratas wistar hembras, y dos días después, para favorecer la estabilización de la función vesical, se procedió a realizar el estudio urodinámico. Tres ratas fueron excluidas antes del estudio urodinámico por presentar orina de aspecto purulento, y otra se excluyó tras el estudio urodinámico porque al sacrificar el animal, se observó infección grave en las proximidades del catéter y la vejiga. Se analizó el estudio urodinámico de las 16 ratas restantes que tuvieron un peso medio de 303 g (rango 293-343). Todos los estudios se realizaron entre las 15 y las 18 horas, al mismo ritmo de infusión (0,1 ml/min) y en las mismas condiciones de temperatura (20° C) e iluminación (luz artificial a intensidad predeterminada). Los valores urodinámicos medios obtenidos en cada una de las distintas variables de estudio se muestran en la tabla 12.

Tabla 12: Valores urodinámicos medios obtenidos en ratas Wistar.

Variable (unidad)	Media (DE) n=16
Presión miccional (cm H ₂ O)	41,19 (± 10,15)
Presión umbral (cm H ₂ O)	6,34 (± 3,05)
Presión basal (cm H ₂ O)	1,27 (± 1,21)
Capacidad vesical (ml)	0,81 (± 0,13)
Volumen miccional (ml)	0,76 (± 0,11)
Volumen umbral (ml)	0,73 (± 0,09)
FCEP (n / ciclo miccional)	0,43 (± 0,28)
ACEP (cm H ₂ O)	4,60 (± 2,72)
Tiempo intermiccional (min)	6,92 (± 0,41)

ACEP: Amplitud de CEP. CEP: cambios espontáneos de presión; DE: desviación estándar; FCEP: frecuencia de CEP;

El patrón urodinámico en la mayoría de estas ratas se caracterizó por presiones miccionales próximas a 40 cm H₂O, una capacidad vesical y un volumen miccional, inferiores a 1 ml, un tiempo entre una micción y la siguiente de aproximadamente 7 minutos. Ascenso lento y progresivo de la presión vesical a medida que se llenaba la vejiga (es decir buena acomodación o complianza) y prácticamente ausencia de cambios espontáneos de presión entre las micciones (durante el llenado vesical) (figura 26).

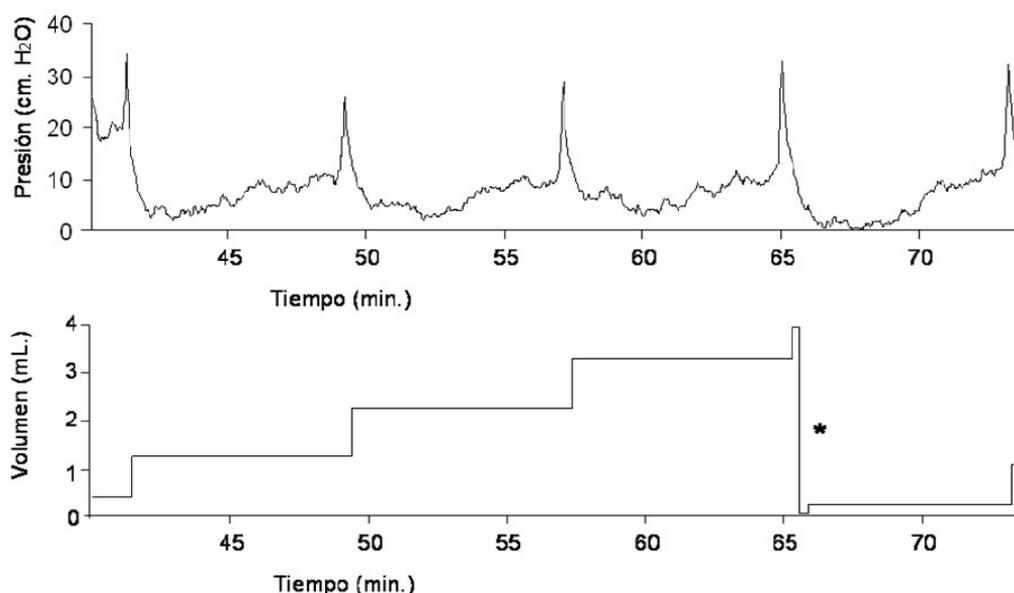


Figura 26: Registro urodinámico de rata control en el que se observa el patrón miccional normal, con ascenso de presión lento y progresivo durante el llenado vesical (buena acomodación del detrusor), contracciones vesicales separadas unas de otras (al menos siete minutos) y que se acompañan de micciones de abundante volumen (aproximadamente 1 ml). *Ajuste automático de la línea de base.

Estos resultados validan la fiabilidad del modelo desarrollado, porque tanto la morfología de los registros como los valores medios de las variables de estudio son similares a los ya publicados por otros grupos con amplia experiencia en estudios urodinámicos en ratas wistar.

2.2. Comprobación de la localización esterotáxica del tercer ventrículo

El modelo de lesión dopaminérgica central bilateral que se utilizó produce la lesión dopaminérgica por la acción tóxica de 6-OHDA sobre la sustancia negra de los dos hemisferios. Para esta lesión es necesario inyectar el tóxico dentro del tercer ventrículo y que éste difunda por él hasta alcanzar ambas sustancias negras. Para comprobar que mediante esterotaxia se conseguía la inyección y difusión del tóxico dentro del tercer

ventrículo se inyectó tinta china en las coordenadas ya comentadas (ver apartado 2.4 de “Material y método”). En el estudio histológico posterior de las rodajas de cerebro en fresco, se comprobó que las paredes ventriculares y el tracto de la aguja de inyección estaban teñidas de tinta china, con ausencia de tinción del parénquima cerebral circundante (figura 27B). Además se pudo comprobar la difusión de la tinta a lo largo del tercer ventrículo (figura 27C).

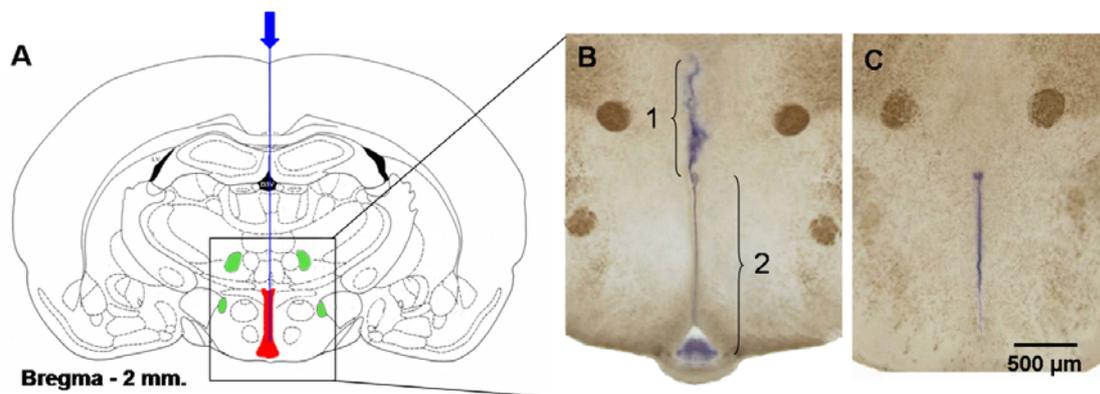


Figura 27: A) Esquema que muestra en rojo el tercer ventrículo, lugar en el que se pretendía realizar la inyección esterotáxica. En verde los tractos mamilotalámicos y los fornix de los ambos hemisferios cerebrales. En azul el trayecto seguido por la aguja de esterotaxia. B y C) Fotomicrografías de cortes coronales del cerebro a -2 mm respecto a bregma, que muestran tinta china en el interior del tercer ventrículo cerebral (2) y parte del tracto dejado por la aguja de inyección (1), y más posterior con respecto a bregma (-3,6 mm) (C) que demuestra la difusión de la tinta al mostrar tinta en el interior del tercer ventrículo.

2.3. Resultados de la inyección intraventricular de suero salino.

Una vez comprobada la correcta introducción y difusión del tóxico dentro del tercer ventrículo, se estudió si la simple manipulación esterotáxica o la inyección de un volumen de 12 µl de suero fisiológico a un ritmo de perfusión de 2 µl/min producían alguna alteración urodinámica. Para ello ratas de una misma camada (para evitar en lo posible la variabilidad entre grupos) fueron divididas aleatoriamente en dos brazos. Uno experimental, en el que se inyectó el volumen de suero salino ya comentado en el tercer ventrículo, y otro control en el que sólo se colocó el catéter vesical. Se realizaron tandas sucesivas de ratas hasta obtener un número suficiente para su análisis estadístico. En el grupo experimental los catéteres vesicales se colocaron una semana después de la inyección esterotáxica, y en los dos grupos el estudio urodinámico se realizó dos días después de la colocación del catéter vesical.

De 15 ratas inyectadas con suero salino 2 fallecieron en los días posteriores a la manipulación esterotáxica y 4 se excluyeron por los siguientes motivos: 2 por infección de orina, 1 por ausencia de micción secundaria a desinserción del catéter, y 1 por presentar movimientos continuos de giro sobre si misma en un solo sentido, que sugería daño cerebral unilateral producido por la inyección esterotáxica. De los 17 animales control se excluyó 1 por desinserción del catéter (figura 28).

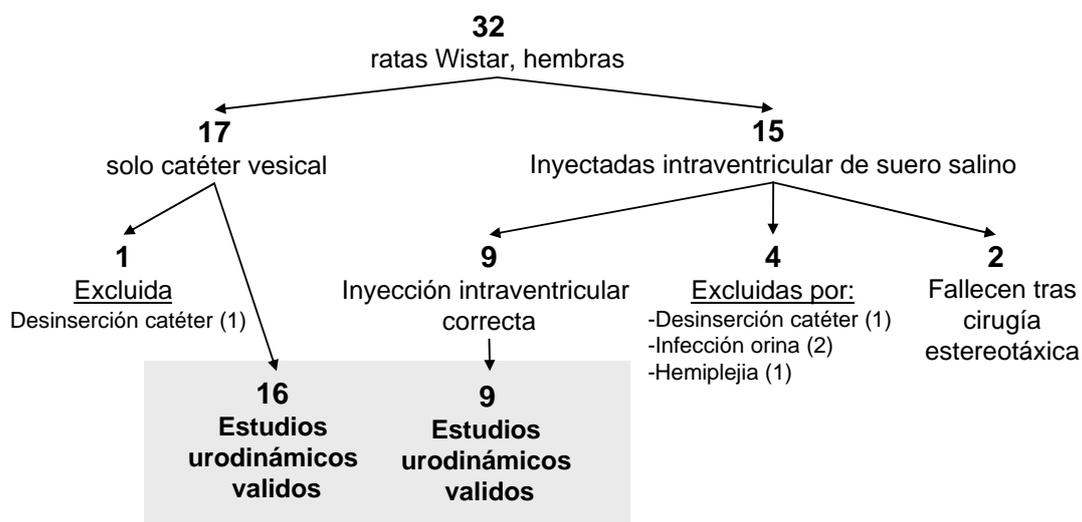


Figura 28: Distribución de las ratas en cada grupo, las pérdidas y el motivo de éstas. Sobre fondo gris se muestran los estudios con los que se realizó el análisis estadístico.

2.3.1. Estudios Urodinámicos

Los valores urodinámicos medios de las ratas manipuladas esterotáxicamente (9) y de sus controles (16) se muestran en la tabla 13. Tras comprobar la normalidad de la muestra mediante el test de Kolgomorov Smirnoz, se compararon los valores medios de uno y otro grupo mediante el test de student. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables de estudio (tabla 13). De forma que la manipulación esterotáxica en esas coordenadas y la inyección de 12 µl de suero salino a un ritmo de infusión de 2 µl por minuto no produjeron alteraciones significativas de la función vesical. En resumen, en las ratas inyectadas con suero salino (CINa⁺ 0,9%), la morfología del registro y el patrón urodinámico fue muy similar al de las ratas control, con pequeñas diferencias en los valores de presión basal, que no fueron significativos.

Tabla 13: Valores medios de ratas manipuladas esterotáxicamente frente a ratas controles.

Variable		Controles (n=16)	Inyectadas con ClNa (n=9)	Nivel de Significación
Peso	(mg)	285,44 (± 33,44)	308,44 (± 72,13)	0,562
Presión miccional	(cm H ₂ O)	41,19 (± 10,15)	40,83 (± 3,02)	0,901
Presión umbral	(cm H ₂ O)	6,34 (± 3,05)	6,37 (± 2,34)	0,898
Presión basal	(cm H ₂ O)	1,27 (± 1,21)	0,45 (± 0,26)	0,175
Capacidad vesical	(ml)	0,79 (± 0,13)	0,81 (± 0,07)	0,785
Volumen miccional	(ml)	0,76 (± 0,11)	0,77 (± 0,07)	0,924
Volumen umbral	(ml)	0,73 (± 0,09)	0,74 (± 0,06)	0,893
FCEP	(n / ciclo miccional)	0,43 (± 0,28)	0,29 (± 0,17)	0,869
ACEP	(cm H ₂ O)	4,60 (± 2,72)	5,22 (± 2,33)	0,452
Tiempo intermiccional	(min)	6,92 (± 0,41)	6,88 (± 0,24)	0,397

CEP: cambios espontáneos de presión; FCEP: frecuencia de CEP; ACEP: Amplitud de CEP. Estudio estadístico utilizado: t de student. (): Desviación estandar.

2.3.2. Análisis Inmunohistoquímico

Para comprobar si la inyección esterotáxica de suero salino producía algún cambio histológico macroscópico sobre las rodajas de cerebro o en la inmunohistoquímica frente a tiroxina hidroxilasa, se hizo estudio inmunohistoquímico de las rodajas de cerebro de ratas inyectadas con suero fisiológico y de las ratas controles. Posteriormente se realizó comparación cualitativa de ambos grupos normalizados siempre entre animales de una misma tanda para evitar la variación en el marcaje de un experimento a otro.

Con excepción del tracto dejado por la aguja de inyección, los estudios inmunohistoquímicos frente a la tiroxina hidroxilasa, de las rodajas de cerebro de ratas inyectadas con salino, no mostraron diferencias en la intensidad del marcaje con respecto a sus controles. Así, la sustancia negra no mostró diferencias evidentes en el marcaje frente a TH+ (-5,2 en el eje antero posterior, con respecto a bregma), con respecto a sus controles. El estriado de las ratas inyectadas con ClNa+ tampoco mostró diferencias evidentes en el marcaje de las TH+ en los 2 niveles estudiados (+1,2 y -0,8 mm en el eje antero posterior, con respecto a bregma) con respecto a sus controles.

La inmunohistoquímica del locus ceruleus, (-10.05 mm en el eje antero posterior, con respecto a bregma) no mostró diferencias en la densidad de células TH+ entre las ratas inyectadas con ClNa+ 0,9% y sus controles.

2.4. Resultados del parkinsonismo central bilateral.

Para comprobar si la lesión dopaminérgica central bilateral secundaria a la inyección de 6-OHDA intraventricular produce alteraciones de la función vesical, tandas sucesivas de ratas de una misma camada fueron divididas en dos grupos, uno formado por las inyectadas con 6-OHDA intraventricular y otro control. Un total de 16 ratas se inyectaron con 6-OHDA intraventricular. Cuatro fallecieron en los días posteriores a la inyección esterotáxica. En las 12 supervivientes se colocó el catéter vesical a la semana de la inyección, realizando el estudio urodinámico 2 días después en 10, pues una de ellas falleció durante la colocación del catéter vesical y otra presentaba orina purulenta. El grupo control lo formaron 8 ratas en las que sólo se colocó el catéter vesical, de éstas 1 se excluyó por desanclaje del catéter y otra por orina purulenta, realizándose el estudio urodinámico en las 6 restantes dos días después.

Tras el estudio inmunohistoquímico de las ratas inyectadas con 6-OHDA frente a los controles de su misma tanda, se observó lesión dopaminérgica bilateral evidente en 8 de las 10 ratas estudiadas urodinámicamente. Sólo se analizaron los estudios urodinámicos de las 8 ratas que mostraron una lesión dopaminérgica evidente en el estudio inmunohistoquímico. En estas ratas correctamente lesionadas se ha observado además de una disminución media del peso del 24 %, una hipomotilidad manifiesta, una inestabilidad marcada al mover la jaula y pelo erizado en todos los casos (figura 29).

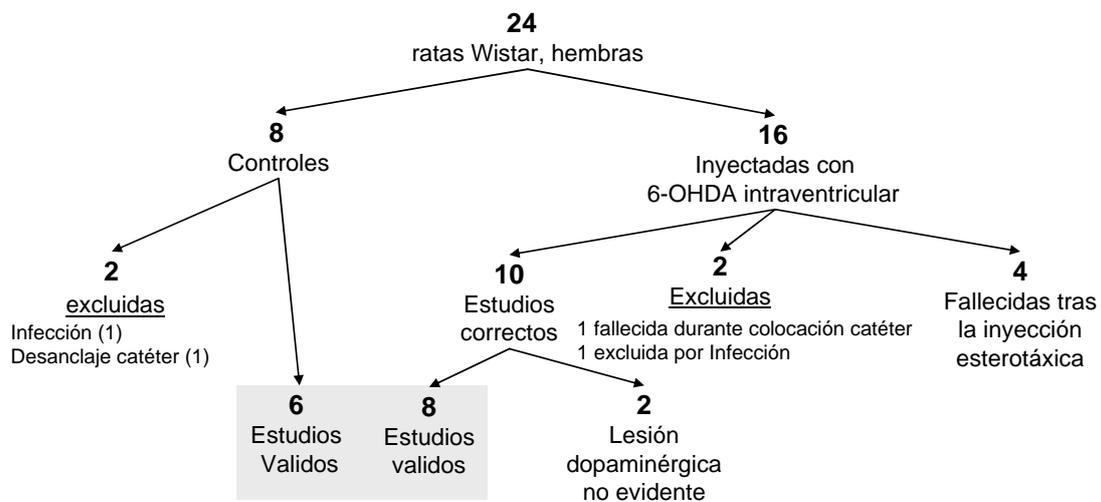


Figura 29: Distribución de las ratas en cada grupo, las pérdidas y el motivo de éstas. Sobre fondo gris se han representado los incluidos en el análisis estadístico.

2.4.1. Resultados urodinámicos

Al comparar los estudios urodinámicos de ratas con lesión dopaminérgica bilateral (inducida por 6-OHDA) frente a los de sus controles, se han encontrado los siguientes hallazgos urodinámicos: disminución de la capacidad vesical media ($p \leq 0,01$), del volumen miccional medio ($p \leq 0,01$) y del volumen umbral medio ($p \leq 0,01$). Además se objetivó un tiempo intermiccional medio acortado ($p \leq 0,01$), o lo que es lo mismo, una frecuencia miccional aumentada, por último se observó mayor frecuencia ($p \leq 0,03$) y amplitud ($p \leq 0,01$) de cambios espontáneos de presión durante la fase de llenado vesical (tabla 14) (figuras 30 y 31).

Tabla 14 Comparación de los valores urodinámicos de ratas controles frente a ratas con lesión dopaminérgica.

Variable	Controles (n=6)	Lesionadas (n=8)	Nivel de significación
Peso (mg)	293,17 (\pm 43,63)	301,00 (\pm 51,53)	0,764
Presión miccional (cm H ₂ O)	43,00 (\pm 3,03)	42,38 (\pm 4,71)	0,769
Presión umbral (cm H ₂ O)	6,33 (\pm 1,75)	4,58 (\pm 0,68)	0,058
Presión basal (cm H ₂ O)	0,85 (\pm 0,35)	1,02 (\pm 0,41)	0,409
Capacidad vesical (ml)	0,77 (\pm 0,12)	0,42 (\pm 0,07)	0,01 *
Volumen miccional (ml)	0,75 (\pm 0,12)	0,40 (\pm 0,06)	0,01 *
Volumen umbral (ml)	0,73 (\pm 0,11)	0,38 (\pm 0,06)	0,01 *
FCEP (cm H ₂ O)	0,24 (\pm 0,17)	1,56 (\pm 0,86)	0,03 *
ACEP (cm H ₂ O)	4,17 (\pm 2,3)	13,63 (\pm 3,37)	0,01 *
Tiempo intermiccional (min)	7,03 (\pm 0,62)	4,61 (\pm 0,61)	0,01 *

*ACEP: Amplitud de CEP. CEP: cambios espontáneos de presión; FCEP: frecuencia de CEP; Variable de agrupación: tipo de rata. Estudio estadístico utilizado: t de student, corrección de bonferroni.*P <0,05.*

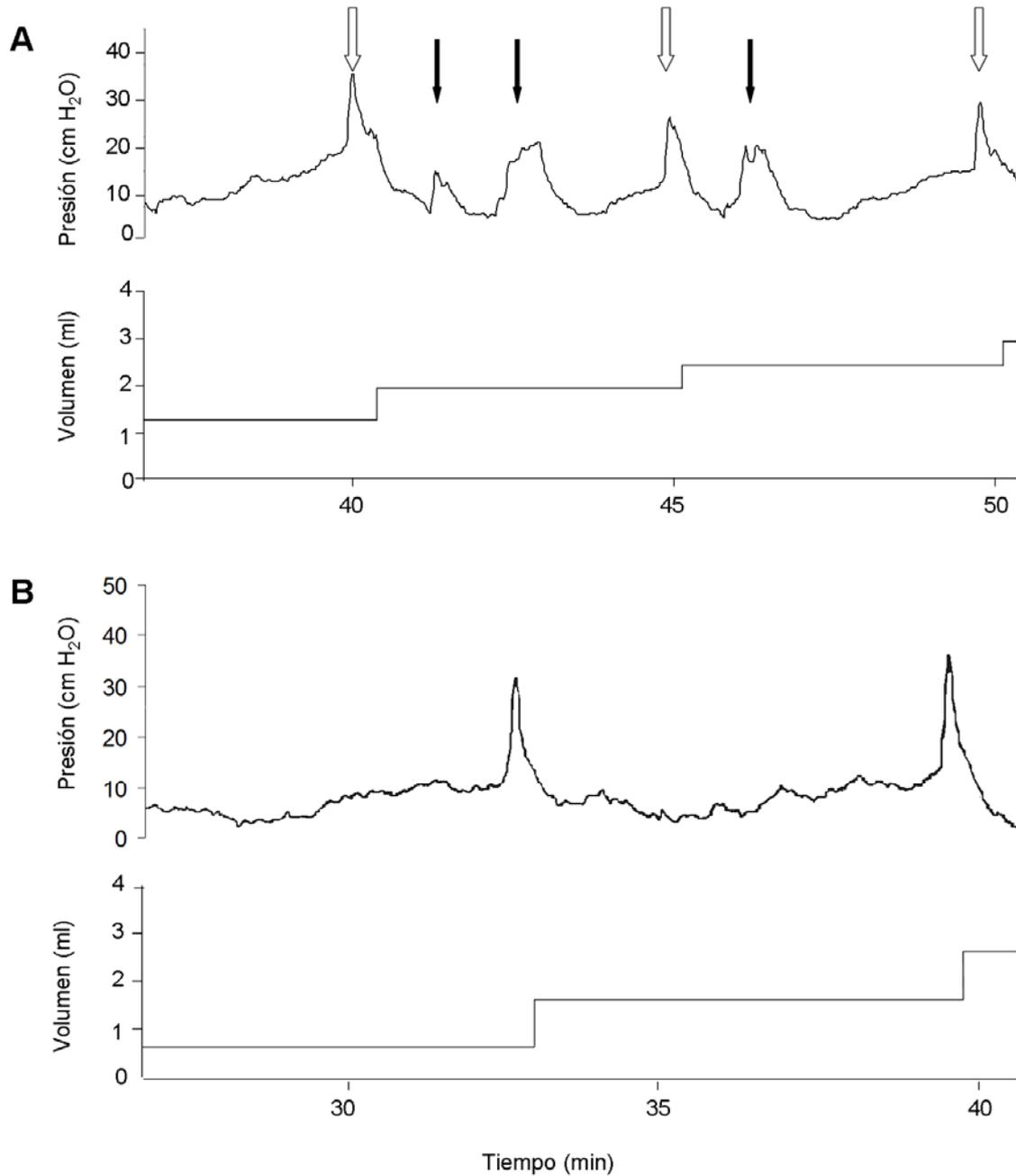


Figura 30: A) Registro urodinámico representativo de rata con lesión dopaminérgica bilateral. Muestra 3 contracciones vesicales efectivas (flechas blancas) en diez minutos, y entre ellas cambios espontáneos de presión vesicales durante la fase de llenado (flechas negras) que no se acompañan de micciones. Las micciones también son frecuentes y de pequeño volumen. B) Registro representativo de rata control. Las contracciones vesicales en la rata control son regulares y se distancian más en el tiempo que las de la rata lesionada. Las micciones en la rata control son de un volumen adecuado y coinciden en todo momento con las contracciones vesicales, mientras que en la rata lesionada las micciones son de menor volumen y más frecuentes.

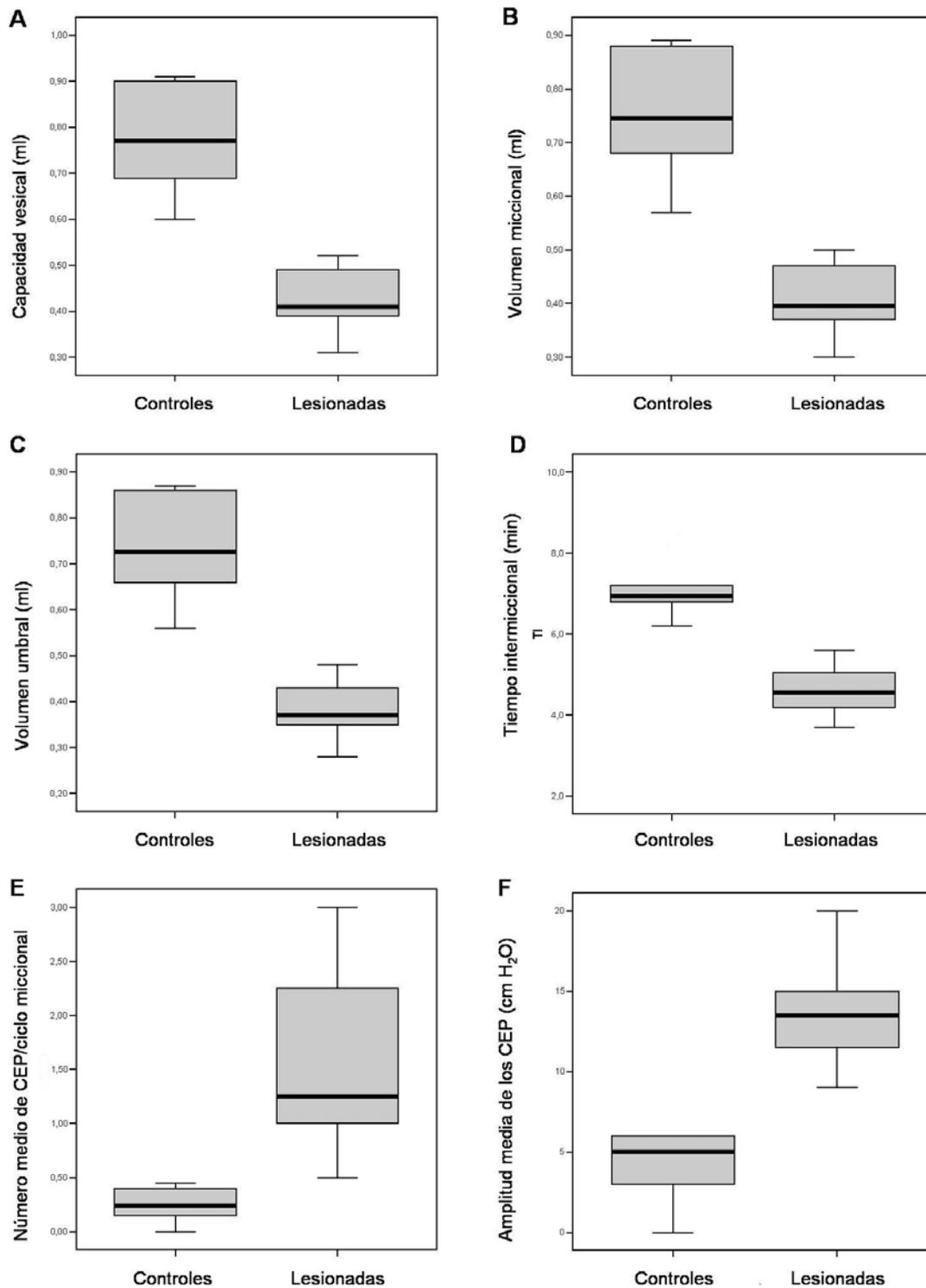


Figura 31: Diagramas de cajas que muestran de forma gráfica la menor capacidad vesical (A), volumen miccional (B) y volumen umbral (C), de las ratas con lesión dopaminérgica central bilateral con respecto a ratas controles de la misma camada. Así como una disminución del tiempo medio entre una micción y la siguiente (D), es decir una mayor frecuencia miccional. Se muestra también la mayor frecuencia (E) y amplitud (F) de los cambios espontáneos de presión (CEP) de las ratas con lesión dopaminérgica bilateral con respecto a sus controles.

2.4.2. Análisis inmunohistoquímico

Para comprobar si la inyección intraventricular de 6-OHDA produjo la lesión dopaminérgica bilateral esperada, se realizó un análisis cualitativo de secciones coronales de cerebro teñidas con técnicas de inmunohistoquímica frente a la tiroxina hidroxilasa (TH). Para evitar la variabilidad en el marcaje histológico de un experimento a otro, cada rata inyectada con 6-OHDA se comparó con controles de la misma tanda. Así, de las 10 ratas a las que se realizó estudio completo, es decir, estudio urodinámico y estudio histológico, 8 mostraron diferencias evidentes en el marcaje entre las rodajas de ratas inyectadas con 6-OHDA y las de sus controles. Ocho de esas 10 ratas inyectadas con 6-OHDA mostraron una disminución importante del marcaje a distintos niveles del estriado y de la sustancia negra (figuras 32 y 33A). A mayor aumento se pudo comprobar además una disminución evidente del número de neuronas dopaminérgicas a nivel de la sustancia negra (figura 33B).

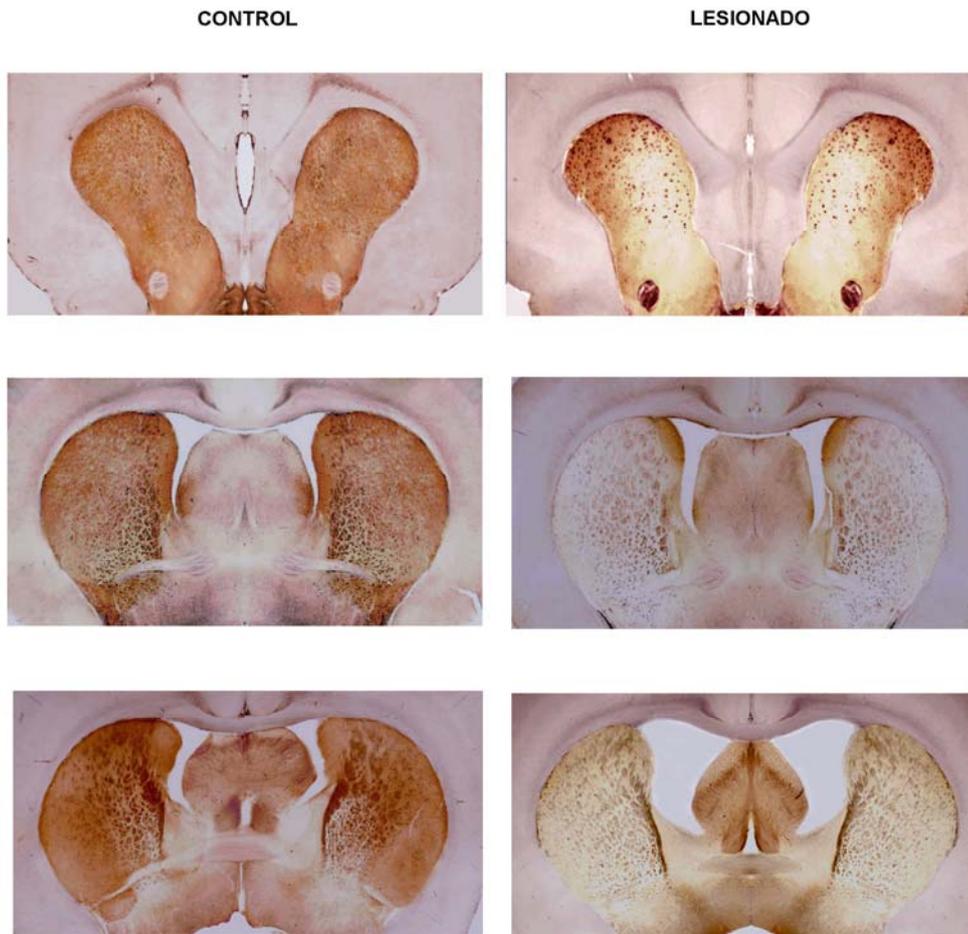


Figura 32: Fotomicrografías de inmunohistoquímica frente a la TH (en color marrón oscuro), de cortes coronales a distintos niveles del cerebro. Muestra la intensidad del marcaje del estriado (marrón oscuro) de un animal control (columna de la izquierda), frente a la práctica ausencia de marcaje del estriado de un animal de la misma tanda inyectado con 6-OHDA (columna derecha).

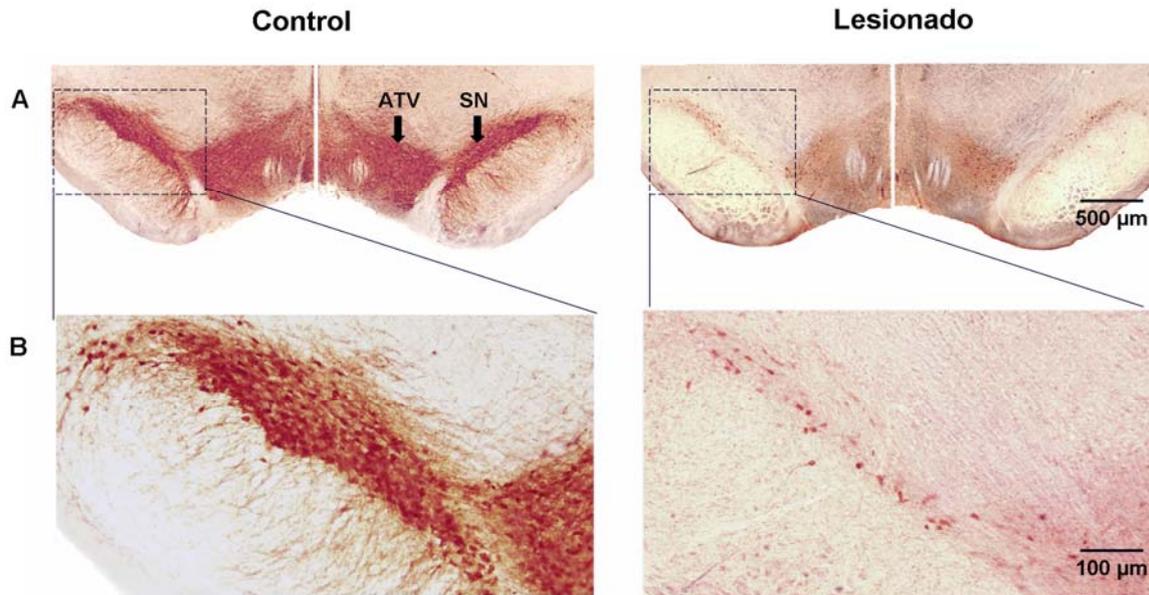


Figura 33: A) Fotomicrografía de inmunohistoquímica frente a la tiroxina hidroxilasa, de cortes coronales del tronco del encéfalo a $-5,2$ mm respecto a bregma, Mostrando la intensidad del marcaje (marron oscuro) de la sustancia negra (SN) y el área tegmental ventral (ATV) de un animal control, frente a la practica ausencia de marcaje de estas regiones en una rata lesionada. B) A mayor aumento que muestra la disminución del número de neuronas dopaminérgicas (TH+) a nivel de sustancia negra y área tegmental ventral, en los animal lesionado con respecto a su controles.

También se estudió el locus ceruleus, estructura del SNC rica en células noradrenérgicas y que participa en el control neurológico de la micción en personas normales. Esta región noradrenérgica es una de las zonas afectas en la EP idiopática, y podría estar implicada en las alteraciones urodinámicas que aparecen en esta enfermedad. El modelo de lesión dopaminérgica central bilateral secundaria a la inyección intraventricular de 6-OHDA utiliza desipramina 30 minutos antes la inyección esterotáxica, para evitar la lesión de neuronas noradrenérgicas entre las que se encuentran las del locus ceruleus. La inmunohistoquímica frente a la tiroxina hidroxilasa a nivel de locus ceruleus, (-10.05 mm respecto a bregma) no mostró diferencias en el marcaje entre las 8 ratas con lesión dopaminérgica bilateral y sus controles de la misma tanda (figura 34). Por lo que podemos inferir que las alteraciones urodinámicas observadas en los animales inyectados con 6-OHDA intraventricular son debidas la lesión dopaminérgica de la sustancia negra y del estriado, y no a la alteración del locus ceruleus.

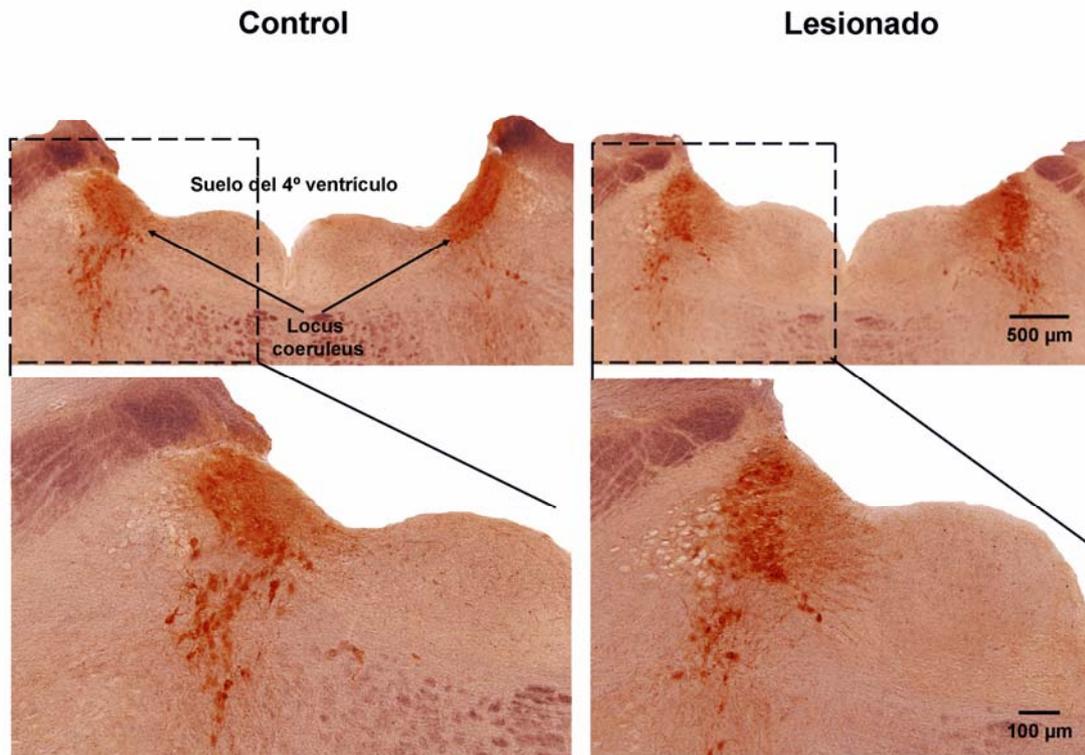


Figura 34: A) Fotomicrografías de inmunohistoquímica frente a TH de cortes coronales del diencefalo a -10,05 mm respecto a bregma. Muestra el locus ceruleus de una rata control y de otra con lesión dopaminérgica central, ambos con una intensidad de marcaje similar que no sugieren lesión de esta región. B) A mayor aumento no se observan diferencias en el número de células del locus ceruleus de los dos animales.

2.5. Validación farmacológica del modelo.

Tras comprobar las variaciones urodinámicas que produjo la lesión dopaminérgica central bilateral, se realizaron experimentos para valorar la reversibilidad de las alteraciones. Se utilizó L-Dopa intraperitoneal que tiene actividad no selectiva sobre receptores D1 y D2. Su degradación periférica se evitó añadiendo carbidopa a la dilución en una proporción 4:1 y a una dosis de 7 mg/Kg.

De nuevo para evitar la variabilidad intergrupo se utilizaron tandas de animales de la misma camada que se dividieron en 2 grupos: controles e inyectados con 6-OHDA. Se utilizaron 16 animales. Diez fueron inyectados con 6-OHDA, de los cuales 2 murieron en los días posteriores a la inyección, y 2 se excluyeron: 1 por orina purulenta y otro por desinserción del catéter. A seis sólo se les colocó el catéter (controles) de los que se excluyó uno por desinserción del catéter.

Se realizó el estudio urodinámico a 6 ratas inyectadas con 6-OHDA y a 5 controles. Tras el periodo de adaptación inicial, y obtención de un registro urodinámico basal de al menos 30 minutos, se inyectó en todos los casos 1 ml de L-Dopa + carbidopa intraperitoneal a 7 mg/kg. y se continuó el estudio durante otros 60 minutos.

Tras el estudio inmunohistoquímico se observó que una de las ratas no mostraba lesión dopaminérgica con respecto a los controles de su tanda, por lo que su estudio urodinámico no fue valorado.

En el grupo control no se observaron variaciones importantes en la morfología ni en los valores de las distintas variables urodinámicas tras la inyección con L-dopa peritoneal (tabla 15). Sin embargo en el grupo de ratas con lesión dopaminérgica central bilateral se produjeron cambios estadísticamente significativos en algunas de las variables urodinámicas (tabla 16). Observamos un aumento de capacidad vesical ($p=0,043$), volumen miccional ($p=0,042$), volumen umbral ($p=0,043$) y tiempo intermiccional ($p=0,031$). Por otro lado se observó una disminución de la frecuencia ($p=0,043$) y amplitud ($p=0,041$) de los cambios espontáneos de presión durante la fase de llenado vesical. Alcanzando valores ligeramente inferiores a los de las ratas del grupo control.

Es decir L-dopa no produce cambios en la función vesical de las ratas controles, mientras que sobre ratas con lesión dopaminérgica central produce una cierta reversibilidad de las alteraciones de la función vesical producidas por la lesión dopaminérgica (ver figuras 35 a 38).

Tabla 15 Comparación de los valores urodinámicos pre y post inyección intraperitoneal de L-dopa + carbidopa en el grupo control.

Variable	Pre L-Dopa (n=5)	Post L-Dopa (n=5)	Nivel de significación
Presión miccional (cm H ₂ O)	43 [38,50 – 43,50]	43 [39,50 – 44,0]	0,854
Presión umbral (cm H ₂ O)	6,00 [5,00 – 7,25]	6,00 [5,00 – 6,00]	0,492
Presión basal (cm H ₂ O)	1,00 [0,55 – 1,15]	1,00 [0,80 – 1,15]	0,705
Capacidad vesical (ml)	0,83 [0,71 – 0,90]	0,84 [0,71 – 0,89]	0,705
Volumen miccional (ml)	0,81 [0,70 – 0,88]	0,81 [0,70 – 0,88]	1,000
Volumen umbral (ml)	0,79 [0,68 – 0,86]	0,78 [0,68 – 0,86]	1,000
FCEP (n / ciclo miccional)	0,15 [0 – 0,15]	0,15 [0 – 0,30]	1,000
ACEP (cm H ₂ O)	4,00 [0 – 5,50]	4,00 [4,00 – 6,00]	0,312
Tiempo intermiccional (min)	6,90 [6,75 – 7,15]	6,90 [6,80 – 7,05]	0,704

*CEP: cambios espontáneos de presión; DE: desviación estándar; FCEP: frecuencia de CEP; ACEP: Amplitud de CEP. Variable de agrupación: tipo de rata, Estudio estadístico utilizado: Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon []: Rango intercuartílico * p < 0,05*

Tabla 16

Comparación de los valores urodinámicos pre y post inyección intraperitoneal de L-Dopa + carbidopa en el grupo con lesión dopaminérgica.

Variable	Pre L-Dopa (n=5)	Post L-Dopa (n=5)	Nivel de significación
Presión miccional (cm H ₂ O)	43,00 [36 – 51]	40,00 [36,0 – 47]	0,131
Presión umbral (cm H ₂ O)	3,9 [3,25 – 4,65]	2,00 [2,00 – 3,15]	0,080
Presión basal (cm H ₂ O)	1,00 [0,95 – 1,65]	1,00 [0,90 – 1,40]	0,180
Capacidad vesical (ml)	0,39 [0,34 – 0,41]	0,63 [0,59 – 0,68]	0,043 *
Volumen miccional (ml)	0,36 [0,33 – 0,39]	0,60 [0,56 – 0,63]	0,042 *
Volumen umbral (ml)	0,35 [0,31 – 0,37]	0,58 [0,54 – 0,61]	0,043 *
FCEP (n / ciclo miccional)	2,00 [1,25 – 2,75]	0,66 [0,49 – 1,00]	0,043 *
ACEP (cm H ₂ O)	10,00 [8,55 – 13,50]	5 [4,00 – 6,50]	0,041 *
Tiempo intermiccional (min)	4,80 [4,00 – 5,20]	6,40 [6,15 – 6,70]	0,031 *

CEP: cambios espontáneos de presión. FCEP: frecuencia de CEP; ACEP: Amplitud de CEP. Variable de agrupación: tipo de rata, Estudio estadístico utilizado: Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. []: Rango intercuartílico * p<0,05

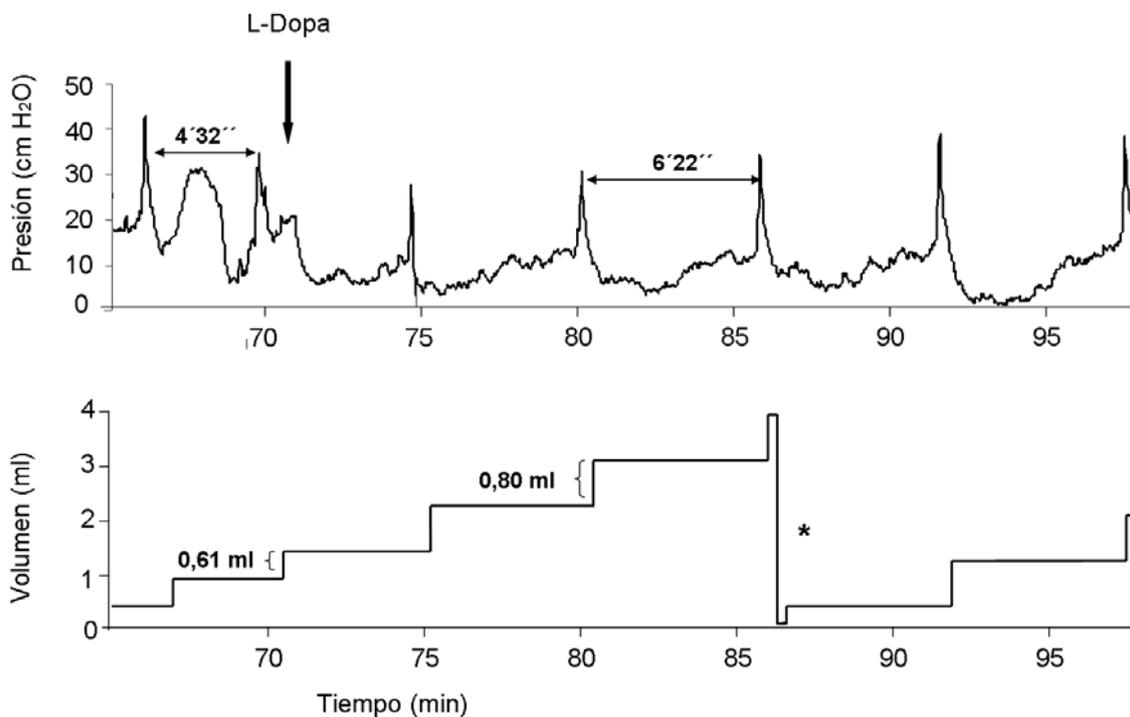


Figura 35: Registro urodinámico antes y después de la inyección intraperitoneal de L-Dopa + carbidopa (flecha negra), en animal con lesión dopaminérgica central. Muestra un aumento del tiempo intermiccional y del volumen miccional, minutos después de la inyección. También muestra un descenso de los valores de presión intravesical. *Ajuste de la línea de base.

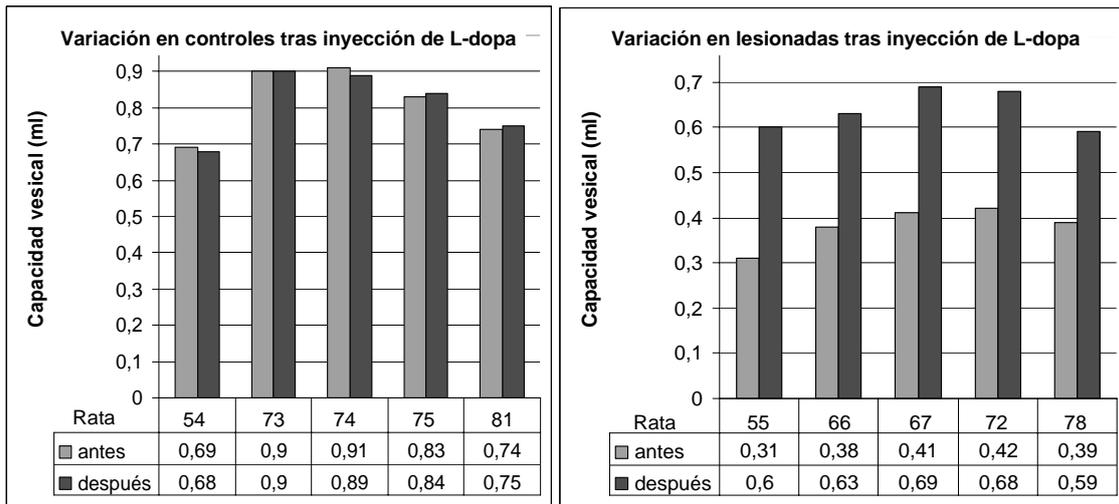


Figura 36: Medidas de la capacidad vesical antes y después de la inyección de L-Dopa en ratas controles (izquierda) y ratas con lesión dopaminérgica central (derecha). Observese el aumento de la capacidad vesical en las ratas con lesión dopaminérgica, mientras que en el grupo control no se produjeron variaciones significativas.

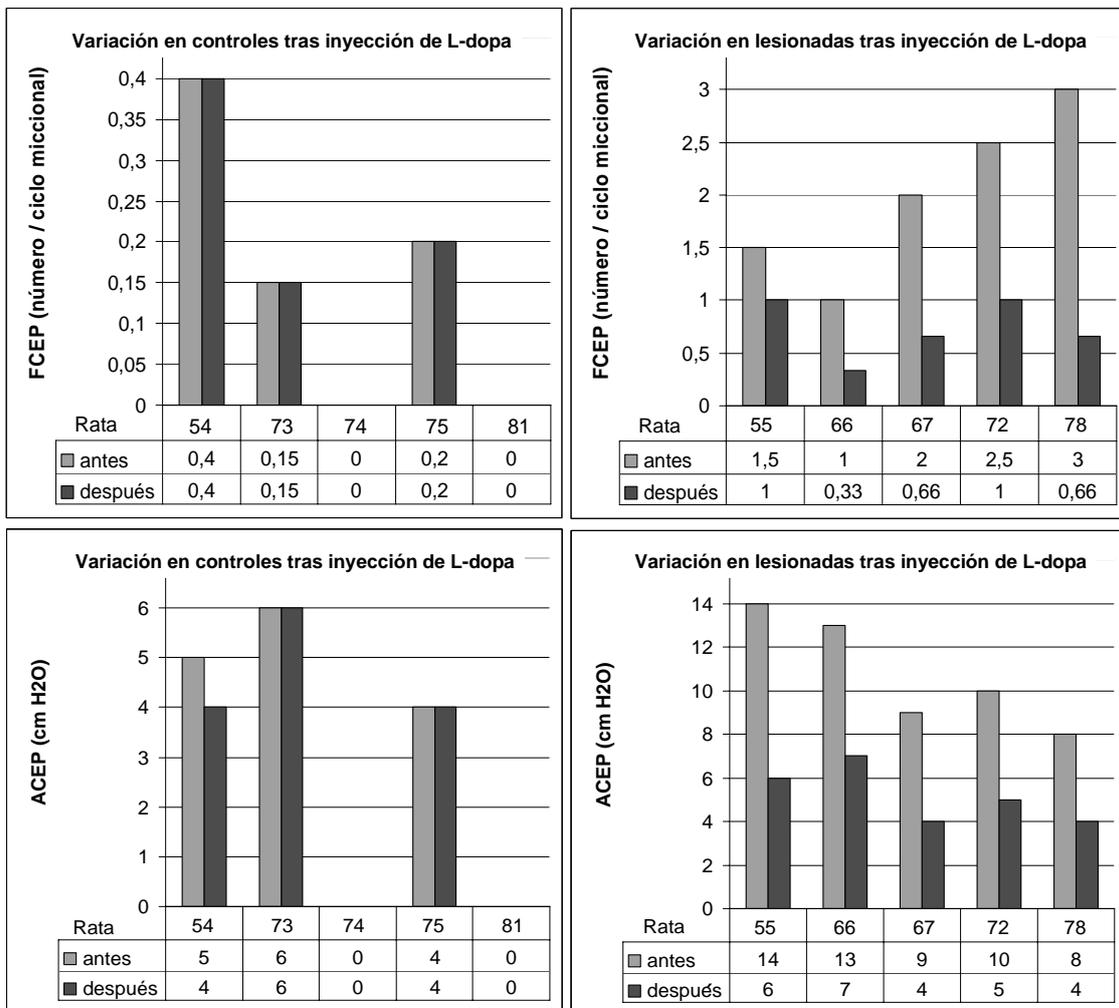


Figura 37: Medidas de la frecuencia y amplitud de los cambios espontáneos de presión antes y después de la inyección de L-Dopa en ratas controles (izquierda) y ratas con lesión dopaminérgica central (derecha). Observese la disminución de la FCEP y ACEP en las ratas con lesión dopaminérgica, mientras que en el grupo control no se produjeron variaciones significativas.

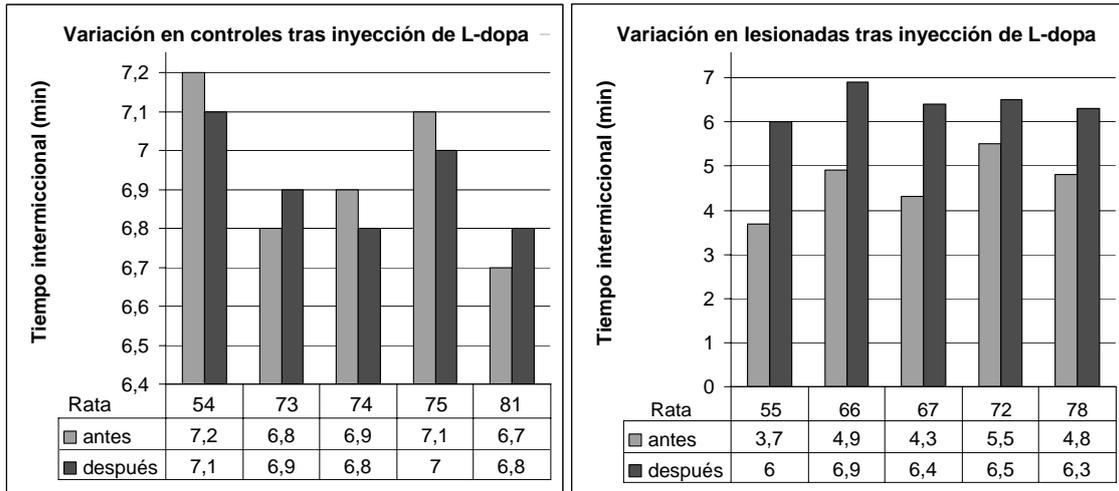


Figura 38: Medidas del tiempo intermiccional antes y después de la inyección de L-Dopa en ratas controles (izquierda) y ratas con lesión dopaminérgica central (derecha). Observese el aumento del tiempo intermiccional (o lo que es lo mismo la disminución de la frecuencia miccional) en las ratas con lesión dopaminérgica, mientras que en el grupo control no produjeron variaciones significativas.

V. DISCUSIÓN

1. Sintomatología urinaria de la EP

Además de los síntomas motores cardinales de la EP (bradicinesia, temblor de reposo, rigidez e inestabilidad), los pacientes con esta enfermedad suelen presentar también síntomas urinarios que se consideran menores, pero que son muy invalidantes ya que limitan su independencia y su vida social. Los primeros estudios sobre la sintomatología urinaria en la EP ya tratan de establecer una relación entre la presencia de síntomas urinarios y la mayor intensidad de alguno de los síntomas motores de la EP. El interés por identificar esa posible relación, está en que permitiría establecer qué enfermos de Parkinson son los que tienen mayor predisposición para desarrollar sintomatología urinaria. Además de los síntomas motores cardinales ya mencionados, también se ha estudiado la relación de la sintomatología urinaria con los síntomas disautonómicos, con los años de evolución de la enfermedad y con la gravedad de ésta, obteniéndose datos contradictorios en las distintas series publicadas (Murnaghan G, 1961; Pavlaquis A, 1983; Lemack G et al, 2000; Araki I, 2000; Defreitas, 2003; Winge K, 2006).

Si bien parece claro que la intensidad de los síntomas motores de la EP se relaciona con los años de evolución y la gravedad de la enfermedad, es decir que los pacientes con más años de evolución son los más graves y los que tienen una sintomatología motora más intensa (Lang, 1998), no está claro si la gravedad y los años de evolución de la EP se correlacionan con la frecuencia e intensidad de los síntomas urinarios (Lemack, 2000; Araki, 2000). En los pacientes con EP incluidos en la fase clínica de este trabajo se ha observado una mayor intensidad de síntomas urinarios cuantos más años de evolución (tabla 8 y figura 21B), o sea que los síntomas urinarios evolucionarían igual que la sintomatología motora de la EP. Sin embargo los pacientes con mayor puntuación en la escala de Hoehn y Yahr, que son los que tienen mayor afectación, no presentaron mayor intensidad de los síntomas urinarios.

En este trabajo, tras el estudio de la relación entre la intensidad de los síntomas urinarios y los síntomas motores ya comentados, sólo se encontró correlación positiva entre el grado de rigidez y la intensidad de los síntomas urinarios (tabla 8 y figura 21A); observando que cuanto mayor fue la rigidez de los pacientes, mayor fue la intensidad de los síntomas de urgencia y frecuencia miccional. Los pacientes que presentaron mayor bradicinesia, temblor de reposo o inestabilidad no presentaron mayor intensidad de la

sintomatología urinaria, tampoco se observó mayor intensidad de sintomatología urinaria en los pacientes con síntomas disautonómicos.

En cuanto a la correlación de los síntomas urinarios referidos por los pacientes con EP y los hallazgos urodinámicos, se ha comunicado que entre el 36 y el 90% de estos pacientes (Lemack, 2000) tienen una función vesical patológica. En la fase clínica inicial de este trabajo se encontró una alta correlación entre los síntomas urinarios y la presencia de alguna alteración urodinámica (91%) , siendo la HDD la más frecuente de ellas (tabla 9). Analizando los estudios urodinámicos realizados a los pacientes con EP incluidos, se han podido identificar dos grupos de pacientes con HDD (unos con obstrucción al flujo de salida y otros sin ésta), encontrando que aquellos con HDD sin signos de obstrucción presentaron una HDD más invalidante, pues las ondas de HDD aparecieron con volúmenes vesicales menores y además presentaban una capacidad vesical menor (tabla 10). Los pacientes sin obstrucción al flujo de salida refirieron urgencia miccional con pequeños volúmenes y una mayor frecuencia miccional, que podría explicar la menor capacidad vesical. También se observó un mayor porcentaje de incontinencia de urgencia en los pacientes con HDD sin obstrucción (tabla 10). En este mismo sentido otro grupo (Defreitas, 2003), concluye que la HDD de la EP es menos severa cuando se acompaña de HDD no neurogénica, presentando menos urgencia, frecuencia e incontinencia de urgencia. Sin embargo es difícil separar una etiología de otra (neurogénica de no neurogénica) y probablemente sea más correcto utilizar el diagnóstico de HDD y obstrucción acompañante, sin hacer referencia a la etiología, pues es difícil aclarar cuando la HDD se debe a una etiología o a las dos. La reducción de la complianza vesical y de la capacidad vesical máxima encontrada en los estudios urodinámicos de los paciente con EP, independientemente de que tengan obstrucción acompañante o no (tabla 10), podría ser explicada por una mayor rigidez o espasticidad de la musculatura vesical.

2. Tratamientos de los síntomas urinarios en la EP

De los tratamiento descritos para la HDD (tabla 3), los anticolinérgicos orales que actúan sobre los receptores muscarínicos son el tratamiento de elección en la población general, siendo la retención aguda de orina (RAO) uno de sus efectos adversos más graves. La sistemática de estudio utilizada en este trabajo permitió identificar los casos con riesgo de RAO, es decir, aquellos con signos de obstrucción del tracto urinario inferior (tabla 10),

en los que no se realizó tratamiento anticolinérgico. Ningún paciente tratado con tolterodina 4 mg presentó episodio de RAO. En algunos de estos pacientes el tratamiento anticolinérgico redujo sensiblemente los síntomas de urgencia y frecuencia miccional, pero no se consiguió la continencia urinaria en ninguno de ellos. La reducción (del 33%) en la intensidad de la urgencia y frecuencia miccional, supone un porcentaje de respuesta al tratamiento anticolinérgico menor que el descrito para la HDD en la población general (65%) (Appell R, 1997, 2001). Estos resultados sugieren que el tratamiento anticolinérgico es menos efectivo en la HDD de la EP que en la HDD de población general. En resumen la combinación del cuestionario de síntomas urinarios y el estudio urodinámico identificó eficazmente aquellos pacientes con EP que presentaron HDD con signos obstructivos, ayudando a seleccionar de forma objetiva los casos tributarios de tratamiento anticolinérgico, aunque la respuesta a éste fue menor que en la población general.

En este trabajo no se estudio la variación de los síntomas urinarios tras el tratamiento con L-Dopa, descrita por Aranda y col en 1992 y que está en discusión tras el trabajo de Weing y col, en 2004. No se estudio porque uno de los criterios diagnósticos de la EP es la respuesta de los síntomas motores al tratamiento con L-Dopa, y no habría sido ético retirar el tratamiento para evaluar algo que no reportara beneficio al paciente. Sin embargo, como se vera más adelante este tema se abordó mediante el uso de un modelo experimental animal.

3. Aproximación a la etiología de la sintomatología urinaria en la EP

En este trabajo se ha comprobado que la mayoría de los pacientes con EP y síntomas urinarios suelen presentar HDD en el estudio urodinámico (tabla 9) (Murnaghan, 1961; Berger, 1987; Lemarck, 2000; Defreitas, 2003). Las causas que podrían justificar este mayor porcentaje de HDD en la EP son diversas (tabla 11) y pueden coexistir en un mismo paciente. Los datos observados en la cohorte de pacientes con EP y síntomas urinarios de este estudio, apuntan una etiología multifactorial, que también sugieren otros grupos (Diokno, 1988; Resnick, 1989; Ouslander, 1995). No obstante algunos autores dudan que la propia EP contribuya a este mayor porcentaje de HDD y sugieren que es el cúmulo de muchas circunstancias (el envejecimiento, la HBP y la medicación [tabla 4]) lo que favorece el mayor porcentaje de HDD en la EP (Resnick, 1989; Oularder, 1995; Niimi, 1999). Sin embargo la correlación observada en este trabajo entre la sintomatología urinaria

y los años de evolución de la EP sugiere que la progresión de la enfermedad influye en la aparición de la HDD (tabla 8 y figura 21A), por lo que parece lógico pensar que la propia enfermedad contribuye a ese mayor porcentaje de HDD.

En cuanto a cuál podría ser la lesión neurológica responsable de la HDD de la EP, algunos autores han propuesto que los síntomas urinarios al igual que otros síntomas disautonómicos que aparecen en la EP, son debidos a la lesión de la columna intermediolateral (punto importante del SN autónomo afecto en la EP) y a la lesión del plexo pélvico (Hasegawa, 1992; Wakabayashi, 1997). Sin embargo otros grupos sugieren que es la lesión dopaminérgica y centran su trabajo en este sentido (Pavlakis, 1983; Aranda B, 1993; Berger, 1997; Araki, 2000; Lemack, 2000; Hobson, 2003). En la cohorte de pacientes con EP estudiados no se encontró correlación entre los síntomas disautonómicos y los urinarios (tabla 8), sin embargo si se objetivó una mayor frecuencia e intensidad de síntomas urinarios (secundarios a HDD), cuantos más años de evolución de la enfermedad (figura 30b). Estos datos sugieren que los síntomas miccionales aparecen a medida que evoluciona la enfermedad, es decir, conforme progresa la neurodegeneración dopaminérgica (Lang, 1998). Aunque otra posibilidad no apuntada anteriormente por otros autores, es que la HDD de la EP sea secundaria a la lesión del locus ceruleus que se produce en la EP. Esta estructura participa en la modulación del reflejo miccional en personas normales y su lesión puede dar lugar a la aparición de HDD.

En resumen la coexistencia de varias causas de HDD observada en los pacientes de este trabajo (tabla 11), nos permite sugerir la etiología multifactorial, pero no aclarar si la lesión dopaminérgica central contribuye a la HDD de la propia EP. En una segunda etapa de esta tesis se ha profundizado en el estudio de la etiología de la HDD en animales parkinsonianos. Encontrando tras la experimentación que las alteraciones urodinámicas quedan explicadas por la lesión dopaminérgica central (de la sustancia negra).

4. Modelos urodinámicos en animales de experimentación

Los estudios urodinámicos en animales cuantifican de forma objetiva las variaciones de la función vesical en condiciones experimentales. A lo largo de los últimos años se ha utilizado una gran variedad de animales de experimentación para la realización de estos estudios. Se han empleado, entre otros, monos, cerdos, perros, diversas variedades de

cobayas, marmotas, gatos, ratas y ratones. Por su costo económico, accesibilidad y manejo, los animales ideales para estos experimentos son las ratas y los ratones. Sin embargo los ratones a pesar de permitirnos trabajar con animales modificados genéticamente (Baik, 1995), son menos utilizados por orinar pequeños volúmenes de orina en cada micción, lo que hace difícil el deslizamiento de la orina por cualquier superficie y en consecuencia el registro de la señal (Pandita, 2000). Esto hemos podido comprobarlo en la fase de pilotaje inicial en los estudio urodinámico realizados en ratones sensibles a MPTP. A pesar de haber modificado la pendiente del embudo colector e impregnado sus paredes con diferentes sustancias que disminuyen la tensión superficial de los líquidos (silicona, parafina, etc.), no se consiguió un deslizamiento correcto de las gotas de orina.

Por esos motivos los estudios urodinámicos en ratas son habitualmente los más utilizados y en los que están establecidos los valores fisiológicos de llenado vesical y el ritmo circadiano del tono muscular de la vejiga (Mattiasson y Uvelius, 1982; Yaksh, 1986; Malmgren, 1987). Dentro de este modelo hay autores que realizan la cistomanometría bajo sedación, para facilitar el manejo del animal. Sin embargo otros autores prefieren hacer el estudio cistomanométrico en el animal consciente para evitar las alteraciones que pueden producir los anestésicos habitualmente empleados en experimentación animal (Andersson, 1987; Satoshi, 2001). Existe consenso en que los estudios en animales no sedados se aproximan más a la realidad, y por eso los estudios urodinámicos de este trabajo se han realizado sin anestesia.

5. Validez del modelo urodinámico desarrollado

La metodología empleada tanto en la colocación del catéter vesical como en la realización del estudio urodinámico están consolidadas y son ampliamente utilizadas, como queda reflejado en la abundante literatura científica sobre estos métodos (Mattiasson y Uvelius 1982; Maggi, 1986; Malmgren 1987). El aprendizaje de estas técnicas se ha realizado con el grupo del Profesor KE Andersson, de la Universidad de Lund, Suecia) que tiene un gran experiencia en la realización de estudios urodinámicos en ratas no anestesiadas. De ese modo se minimizaban posibles errores metodológicos y se hizo que los resultados fueran comparables. Otros aspectos que aumentan la fiabilidad y validez de los estudios urodinámicos son las múltiples comprobaciones sobre: el ritmo de perfusión (0,1 ml/min) dentro del rango descrito como fisiológico para la rata de 0.02–0.2 ml/min (Yaksh,

1986), el correcto deslizamiento de orina por el embudo minimizando y cuantificando las pérdidas, las calibraciones previas a cada estudio, los cambios periódicos de los sistemas de infusión y el cálculo de los valores medios de cada variable con una hoja de cálculo a la que se exportaban los valores registrados de forma automática. La metodología seguida, el modo de aprendizaje, las múltiples comprobaciones realizadas, y sobre todo la reproducción de los patrones miccionales descritos para la rata wistar normal (Malmgren, 1987), con valores dentro del rango considerado de normalidad, son argumentos a favor de la validez de los estudios urodinámicos realizados.

Otro argumento que valida el modelo urodinámico desarrollado para el estudio de la etiología de la HDD en la EP es que permite obviar otras causas de HDD (el envejecimiento, la medicación [tabla 4] y la HBP) que son difíciles de eludir en humanos. Para evitar la posible HDD secundaria a los cambios que se producen con la edad se utilizaron ratas jóvenes de aproximadamente 3 meses de edad y 300 g de peso. La rata suele vivir aproximadamente 24 meses de edad (Saito, 1990), por lo que se puede considerar a las de tres meses como ratas jóvenes. Además todas las ratas fueron hembras y no recibieron tratamiento previo alguno, lo que evitó las otras dos causas de HDD que pueden coexistir en la EP. Por otro lado al utilizar en cada tanda ratas de una misma camada se disminuyó la variabilidad experimental.

Otros problemas que podían alterar la función vesical y por tanto invalidar los resultados del estudio eran: las infecciones de orina y del sistema nervioso central, la manipulación esterotáxica y el aumento de la presión intracraneal tras la inyección intraventricular (ver más adelante). Para evitarlas se realizó profilaxis antibiótica antes de cada procedimiento (inyección esterotáxica e implantación del catéter vesical). Los animales en los que se produjo infección a pesar de la profilaxis antibiótica, fueron excluidos del estudio. El grupo al que se inyectó intraventricularmente suero salino mostró que la manipulación esterotáxica del cráneo o la inyección intraventricular no produjo alteraciones urodinámicas significativas.

En resumen este modelo urodinámico desarrollado tiene validez para aclarar si la lesión dopaminérgica central es causa de HDD por sí misma, ya que evita otras causas de HDD que coexisten en la EP y controla muchos posibles sesgos.

6. Modelo animal de parkinsonismo utilizado

La inyección de 6-OHDA dentro del tercer ventrículo cerebral, fue el modelo animal de parkinsonismo elegido para estudiar si la lesión dopaminérgica central bilateral produce alteraciones urodinámicas. Este modelo (descrito por Rodríguez, 2001) no ha sido utilizado nunca para el estudio de la función vesical y presenta una serie de ventajas respecto a modelos animales anteriormente utilizados para el estudio de la función vesical en animales parkinsonianos. La 6-OHDA no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo tanto no se produce ninguna de las lesiones periféricas que acompañan a la EP (Salones, 1996), sólo lesión de las células dopaminérgicas centrales. En experimentos previos del grupo se comprobó que este modelo (a las dosis y concentración de 6-OHDA utilizadas, y dejando transcurrir una semana desde la inyección) consigue una lesión dopaminérgica bilateral severa y estable. Además evita la lesión de otros grupos neuronales catecolaminérgicos (como locus ceruleus) gracias a la acción neuroprotectora de la desipramina inyectada 30 minutos antes de la inyección intraventricular de 6-OHDA. No utilizamos la inyección unilateral de 6-OHDA, porque las alteraciones urodinámicas podrían estar corregidas por la sustancia negra y el estriado contralateral. Estos son los motivos por los que el modelo de inyección intraventricular de 6-OHDA en ratas permite profundizar con más exactitud en el papel de la lesión dopaminérgica central, como posible área, cuya lesión es responsable de la HDD en la EP.

El modelo animal sobre el que más se ha estudiado la función vesical en animales parkinsonianos es el que produce parkinsonismo secundario a MPTP, de ellos los estudios en monos inyectados con MPTP son los más representativos (Yoshimura 1992, 1993, 1998). Este modelo de parkinsonismo secundario a MPTP en monos, presenta un inconveniente importante, y es que MPTP afecta la transmisión sináptica en los ganglios simpáticos, con un efecto similar al de los narcóticos analgésicos como meperidina (Wilson, 1991; Alkadhi y Hogan, 1992), lo que no permite discriminar si la HDD encontrada es consecuencia de la lesión dopaminérgica o del bloqueo sináptico periférico. Además MPTP produce una lesión dopaminérgica sistémica, es decir, del sistema nervioso central y periférico, lo que no permite aclarar si es la lesión dopaminérgica central la responsable de la HDD. Otros inconvenientes del modelo de MPTP son el alto costo, el difícil acceso y manejo de estos animales.

7. Lesión dopaminérgica producida

En experimentación animal, la lesión dopaminérgica suele comprobarse histológicamente por técnicas de inmunohistoquímica o de hibridación “in situ”. En este trabajo se utilizó la primera. Con ella además de teñirse las neuronas dopaminérgicas se tiñen otros grupos neuronales catecolaminérgicos como locus ceruleus, cuya valoración ha sido importante para aclarar si los cambios urodinámicos que se observaron eran secundarios a una lesión exclusivamente dopaminérgica o a una lesión dopaminérgica y noradrenérgica (de locus ceruleus) (Vizzard, 1995).

De los 10 animales que sobrevivieron a la inyección estereotáxica de 6-OHDA y que presentaron un estudio urodinámico correcto (figura 29), 8 tenían una lesión dopaminérgica evidente tanto a nivel de la sustancia negra como del estriado (figura 32 y 33). En los otros dos animales inyectados con 6-OHDA no se observó una disminución evidente del marcaje frente a TH, por lo que no se consideraron correctamente lesionados y se excluyeron del análisis de datos. Esto supone que el porcentaje de lesión conseguido entre las supervivientes a la inyección de 6-OHDA fue del 80%. Este porcentaje de lesión es congruente con lo comunicado por otros grupos (Rodríguez, 2001). En cuanto al grado de lesión dopaminérgica conseguido: la importante disminución celular a nivel de la sustancia negra (figura 33B), la alta mortalidad entre las ratas inyectadas con 6-OHDA y la importante disminución del peso entre las supervivientes sugieren una lesión muy severa. Sin embargo el locus ceruleus de los animales lesionados no mostró diferencias con los controles en el marcaje inmunohistoquímico frente a TH (figura 34). Esta indemnidad del locus ceruleus sugiere que las alteraciones urodinámicas encontradas se deben solo a lesión dopaminérgica y no a la suma de la lesión dopaminérgica y adrenérgica.

8. Variaciones observadas en ratas con lesión dopaminérgica bilateral

Además de las variaciones de la función vesical, se observaron otras alteraciones que se comentan a continuación. De todas las ratas inyectadas con 6-OHDA, fallecieron el 31,25 %, la mayoría en los días posteriores a la inyección estereotáxica (figura 29). Sin embargo, no murió ninguna de las ratas manipuladas estereotáxicamente e inyectadas con suero salino intraventricular. Esta diferencia sugiere que la muerte de los animales inyectados con 6-OHDA no ha sido por la propia manipulación estereotáxica, sino por la

severa lesión dopaminérgica producida. Está descrito que la lesión dopaminérgica severa causada por la inyección intraventricular de 6-OHDA provoca también lesión del área tegmental ventral (Rodríguez, 2001). Esta región próxima a la sustancia negra (figura 20D) y rica en células dopaminérgicas, tiene un papel regulador sobre el apetito y se afecta en la EP. En las 8 ratas con una correcta lesión de la sustancia negra se produjo también una falta de marcaje frente a la TH a nivel del área tegmental ventral (figura 29). Además en estas ratas y en las que fallecieron se observó un decremento en el peso del 24 %. Todo esto sugiere que la causa del mayor índice de mortalidad entre las ratas inyectadas con 6-OHDA, podría ser la inanición provocada por la severa lesión del área tegmental ventral, moduladora del apetito. Otra diferencia observada al comparar las ratas correctamente lesionadas con las controles fue que las lesionadas presentaban una hipomotilidad manifiesta y una inestabilidad marcada del animal al mover la jaula, signos no cuantificados pero que también sugieren la severidad de la lesión dopaminérgica.

Con respecto a la función vesical, los valores urodinámicos obtenidos en las ratas controles (tabla 12) son similares y superponibles a los descritos por otros autores (Mattiasson y Uvelius, 1982; Maggi, 1988; Malmgren, 1987). Igualmente se realizaron experimentos que descartan que la simple manipulación esterotáxica e inyección intraventricular produzca variaciones significativas de la función vesical (tabla 13). Sin embargo las ratas inyectadas con 6-OHDA intraventricular, que presentaban una lesión dopaminérgica bilateral evidente en el estudio inmunohistoquímico, presentaron cambios significativos de la función vesical (tabla 14). Los cambios observados fueron una disminución de la capacidad vesical, del volumen umbral y miccional, así como del tiempo intermiccional (es decir mayor frecuencia miccional). Además presentaron mayor frecuencia y amplitud de cambios espontáneos de presión durante la fase de llenado vesical (figura 30). Estos cambios urodinámicos tienen importantes similitudes con las alteraciones urodinámicas observadas en pacientes con EP (tabla 10), que son: ondas de hiperactividad del detrusor durante la fase de llenado vesical (figura 12) de mayor amplitud a menor volumen, disminución de la capacidad vesical y mayor frecuencia miccional (en tabla 10 los tres grupos tienen valores inferiores a los normales).

Los cambios urodinámicos observados son congruentes con los comunicados por otros grupos en modelos de HDD de origen central (Yoshimura, 2003). En esos modelos el hallazgo fundamental es la reducción de la capacidad vesical. En el modelo desarrollado, además de una disminución de la capacidad vesical se ha observado: una disminución del

volumen miccional y del tiempo intermiccional (es decir un aumento de la frecuencia miccional). El otro signo de HDD que ha reflejado este modelo de HDD es la mayor frecuencia y amplitud de los cambios espontáneos de presión durante la fase de llenado, que podrían corresponderse con las ondas de HDD observadas en los pacientes con HDD en la EP, y que no han sido descritos hasta el momento en la literatura.

La obtención de más signos de HDD que los encontrados en monos parkinsonianos (Yoshimura, 1992, 1993 y 1998), probablemente se deba a que el modelo desarrollado (al igual que el de Malmgren 1987), no utilizó anestesia alguna durante los estudios urodinámicos, circunstancia que lo acerca todavía más a las condiciones fisiológicas reales. Esta mayor intensidad de los signos de HDD podría deberse también a que MPTP (sustancia empleada por Yoshimura y col. para obtener monos parkinsonianos) produce bloqueo de la transmisión sináptica a nivel de los ganglios simpáticos (Wilson, 1991; Alkadhi y Hogan, 1992), cosa que no ocurre con la 6-OHDA intraventricular.

9. Aportaciones del modelo al conocimiento de la etiología de la HDD en la EP.

Como ya se ha comentado anteriormente el estudio de la etiología de la HDD en la EP es un tema controvertido pero de gran interés, ya que aclarar ésta cuestión ayudaría a centrar la investigación sobre fármacos que alivien la sintomatología urinaria de la EP. Aranda y col, sugirieron que la lesión dopaminérgica era responsable de la HDD, tras comprobar que en 7 de los 12 pacientes con EP y síntomas urinarios tratados con L-dopa se produjo mejoría de los síntomas urinarios. Sin embargo en un estudio posterior en el que se realizó estudio urodinámico pre y postratamiento con dopamina, se encontró una respuesta variable al tratamiento y los autores sugirieron que los síntomas urinarios eran debidos a una lesión cortical difusa (Winge, 2004). Además de estas contradicciones sobre la respuesta al tratamiento con L-dopa, los estudios con tomografía por emisión de positrones (PET) en pacientes con EP y síntomas urinarios tampoco son aclaratorios. Unos informan de una probable lesión cortical difusa (Koike y Takahashi, 1997) y otros tratan de correlacionar un descenso de los niveles de dopamina con las alteraciones urodinámicas observadas (Sakakibara, 2001).

Los resultados de este trabajo de experimentación animal sugieren que la lesión dopaminérgica central bilateral produce alteraciones urodinámicas similares a las que

presentan los pacientes con EP, independientemente del resto de lesiones neurológicas centrales o periféricas que acompañan a la enfermedad (figura 9). Esto no quiere decir que el resto de lesiones neurológicas, presentes en la EP (locus ceruleus, núcleos del rafe medio, columna intermedio lateral de la médula y los ganglios periféricos) no contribuyan al desarrollo de la sintomatología urinaria, solo que la lesión dopaminérgica central por si sola justifica la HDD y los síntomas. Además en este trabajo se profundiza en la fisiología de la HDD en la EP, pues no sólo aporta datos sobre la lesión dopaminérgica como responsable de la HDD en la EP, sino que estos son debidos a la lesión central. Otra aportación de este trabajo ha sido conseguir un modelo urodinámico de HDD de origen central más completo en cuanto a signos de HDD que modelos anteriores.

10. Acción de L-dopa sobre la función vesical de los pacientes con EP.

En los experimentos realizados en este trabajo, todas las ratas lesionadas tratadas con l-dopa intraperitoneal (+ carbidopa en proporción 4:1 para evitar su degradación periférica), tuvieron una mejoría urodinámica significativa de la función vesical (tabla 16). Esta mejoría consistió en un aumento de la capacidad vesical, del volumen miccional, del volumen umbral y del tiempo intermiccional; además de una disminución de la frecuencia y amplitud de los cambios espontáneos de presión durante la fase de llenado vesical (figuras 35 - 38). Los valores alcanzados tras la inyección de l-dopa intraperitoneal se aproximan a los de las ratas del grupo control. Sin embargo la inyección de l-dopa en ratas controles no produjo variaciones importantes en la morfología del registro urodinámico ni en los valores de las distintas variables urodinámicas (tabla 15). Es decir, l-dopa no produjo cambios en la función vesical de las ratas controles, mientras que en ratas con lesión dopaminérgica central produjo una cierta reversibilidad de las alteraciones de la función vesical producidas por la lesión dopaminérgica.

En cuanto a la acción de fármacos dopaminérgicos sobre la función vesical de pacientes con EP se ha comunicado que el tratamiento con bromocriptina (agonista D2), produce frecuencia y urgencia miccional, especialmente durante la noche, y que sus síntomas urinarios mejoran de forma importante 4 semanas después de sustituir bromocriptina (agonista D2) por pergolide (agonista D1/D2) (Kuno, 1997; Seki, 2001). Esta mejoría sugiere que la acción de dopamina sobre los receptores D1 y D2 mejora la sintomatología urinaria, mientras que un predominio de la acción de la dopamina sobre

receptores D2 facilitaría el reflejo miccional y la aparición de síntomas urinarios secundarios a HDD. Según esto lo más probable es que la mejoría observada tras la inyección con l-dopa se deba al predominio de la acción de l-dopa sobre receptores D1. Esto es congruente con lo comunicado por Aranda y col., que administraron de forma sistémica agonistas no selectivos de receptores D1/D2 (apomorfina y l-dopa), conseguían mejoría de la HDD y los síntomas secundarios a ésta. Sin embargo en un estudio posterior en el que se realizó estudio urodinámico pre y postratamiento con l-dopa, se encontró una repuesta variable al tratamiento, cuestionando que la lesión dopaminérgica fuera la responsable de los síntomas urinarios en la EP (Winge, 2004). Mientras que un estudio más reciente encuentra que una dosis aguda de l-dopa produce un empeoramiento de la función vesical de pacientes con EP leve, mientras que el tratamiento crónico durante 2 semanas produce una mejoría de los síntomas y de la capacidad vesical, sugiriendo que la diferente acción depende de las concentraciones sinápticas de l-dopa o de la regulación en los mecanismos postsinápticos que genera el tratamiento crónico con l-dopa (Brusa, 2007). Los resultados del trabajo de experimentación animal que se presenta son contrarios a los resultados del último trabajo comentado, ya que una dosis aguda y única de l-dopa produjo una mejoría de la HDD. Esta discordancia puede radicar en la diferencia entre el estudio en humanos, que evalúa a pacientes con EP leve y que llevan dos años en tratamiento con l-dopa de media, y el modelo experimental desarrollado que produce una lesión aguda, severa y exclusivamente dopaminérgica. Podría ser que ante una lesión dopaminérgica central severa, una dosis aguda de l-dopa produzca un predominio de la acción mediada por receptores D1.

Estudios que profundicen más en la acción dual de la dopamina sobre el reflejo miccional (inhibitorio sobre D1 y facilitador sobre D2) y sobre el tratamiento agudo y crónico con l-dopa pueden traer nuevos tratamientos farmacológicos para la hiperactividad del detrusor de origen central. Agonistas y antagonistas dopaminérgicos son una alternativa real del tratamiento de la HDD en la EP. El modelo que se presenta en este trabajo puede ayudar a dilucidar esta cuestión, y podría utilizarse para el ensayo de este tipo de fármacos.

11. EP y variaciones en el circuito de control neurológico de la micción.

La disminución de la capacidad vesical y la presencia de ondas de HDD observada en pacientes con EP, y en ratas con lesión dopaminérgica central, sugieren un aumento de la

actividad del músculo detrusor secundaria a la disminución de los niveles de dopamina. Cómo altera este descenso de dopamina el circuito de control neurológico de la micción para producir ese aumento de la actividad del detrusor continúa sin aclararse. Según el esquema propuesto por Lang para explicar las alteraciones motoras de la EP (1998), en un sujeto normal la dopamina producida en las células dopaminérgicas de la sustancia negra actúa sobre los receptores dopaminérgicos D1 y D2 del estriado, manteniendo un equilibrio gracias al que se conserva la función motora y probablemente también la vesical (figura 39A). Mientras que en la EP el descenso de los niveles dopaminérgicos en el estriado hace que predomine el efecto de receptores D2 sobre el de receptores D1. Este predominio produce inhibición del globo pálido externo, que inhibía el núcleo subtalámico. Por lo tanto el resultado final de la EP es una hiperactividad del núcleo subtalámico que conlleva inhibición gabaérgica sobre el tálamo y el tronco del encéfalo (figura 39B).

La distensión vesical produce estiramiento de los mecanorreceptores vesicales provocando un aumento del número de impulsos que estos generan. El tálamo participa en la modulación inhibitoria de éstos impulsos antes de que alcancen la corteza cerebral haciendo consciente la distensión vesical (ver figura 39A). En la fase clínica de esta tesis los estudios urodinámico a pacientes con EP mostraron que pequeñas distensiones vesicales (bajos volúmenes de llenado) eran referidos como grandes distensiones vesicales (urgencia miccional). Este aumento de las sensaciones vesicales en la EP podría explicarse por un descenso en la actividad inhibitoria del tálamo secundaria al aumento de la inhibición gabaérgica (figura 39B). A favor de esta hipótesis está el hecho de que la estimulación eléctrica de alta frecuencia (que provoca inhibición) del núcleo subtalámico, produce mejoría motora y vesical en animales parkinsonianos (Kresi, 1997; Sakakibara 2003) y en pacientes con EP (Finazzi-Agrò, 2003; Sefi; 2004). Otra posibilidad que explicaría el aumento de la actividad del detrusor es el descenso de la actividad del centro de almacenamiento pontino (CAP) (ver figura 5A), responsable de mantener el tono de las estructuras esfinterianas y favorecedor de la relajación del detrusor. Este decremento en la función del CAP puede estar producido por el aumento de la inhibición gabaérgica sobre el puente del encéfalo (figura 39B). En los pacientes con EP en los que predomine la sintomatología de urgencia miccional sin gran afectación motora, la estimulación eléctrica de alta frecuencia de las ramas posteriores de las raíces sacras (S2-S4), podría disminuir la frecuencia de los impulsos, sin que fuera necesaria la estimulación eléctrica transcraneal del núcleo subtalámico para el tratamiento de los síntomas urinarios.

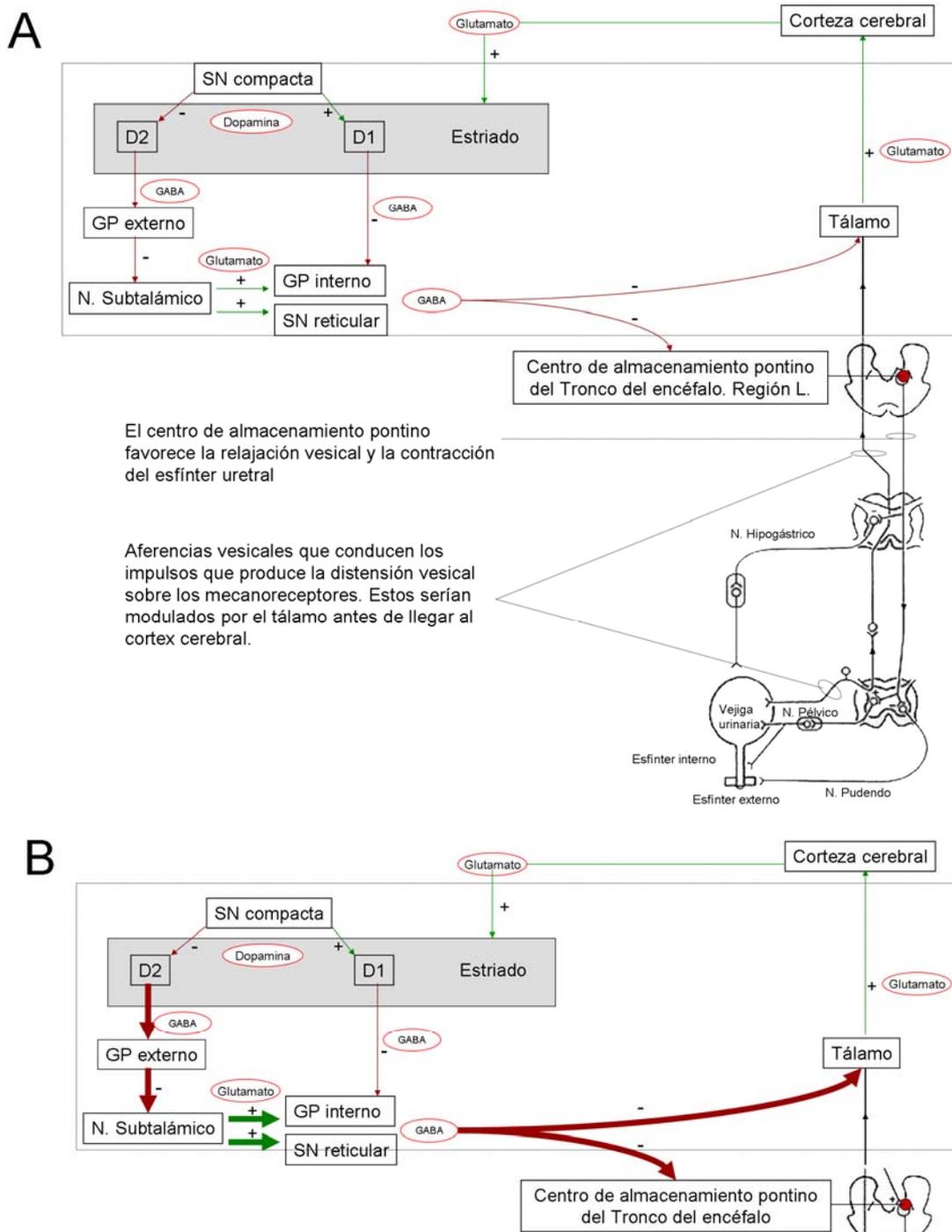


Figura 39: A) Modelo propuesto para explicar la función de los ganglios basales en el control de la función vesical en personas normales. B) Modelo propuesto para explicar la función de los ganglios basales en personas con un parkinsonismo.

Por lo tanto la lesión dopaminérgica central a nivel de la sustancia negra que disminuye la actividad del tálamo y el CAP, podrían explicar el aumento de la actividad del detrusor y de los síntomas de urgencia miccional a bajo volumen vesical.

VI. CONCLUSIONES

1. En pacientes con EP la severidad de los síntomas urinarios se correlaciona con el grado de rigidez y con los años de evolución de la EP. La presencia de síntomas disautonómicos, temblor de reposo, inestabilidad, o hipocinesia, no se correlacionó con la intensidad de los síntomas urinarios. Tampoco se observó correlación entre síntomas urinarios y gravedad de la enfermedad.
2. Existe una alta correlación entre los síntomas urinarios de los pacientes con EP y las alteraciones urodinámicas. La más frecuente es la HDD. Los pacientes con signos urodinámicos de obstrucción presentan una sintomatología urinaria menos invalidante.
3. La combinación de los cuestionarios (IPSS o IU-4) y el estudio urodinámico permite identificar el tipo de disfunción vesical, seleccionando los pacientes tributarios de tratamiento anticolinérgico, sin riesgo de retención aguda de orina. Tolterodina reduce los síntomas de urgencia y frecuencia en la EP, pero no consigue la continencia.
4. En los pacientes con enfermedad de Parkinson coexisten múltiples patologías y circunstancias que pueden producir HDD.
5. El modelo de estudio urodinámico en ratas puesto en marcha y desarrollado obtiene medidas fiables y reproducibles, sin embargo en el modelo urodinámico desarrollado en ratones, se obtienen medidas irregulares y de menor fiabilidad.
6. La manipulación estereotáxica y la inyección intraventricular de suero salino en la rata wistar no produce alteraciones urodinámicas significativas.
7. El parkinsonismo inducido por 6-OHDA intraventricular en ratas, con lesión específica de la sustancia negra, muestra variaciones urodinámicas significativas que revierten con agonistas dopaminérgicos, y que son similares a la hiperactividad del detrusor que se observa en el estudio urodinámico de los pacientes con enfermedad de Parkinson. Esto sugiere que la lesión dopaminérgica central es responsable, al menos en gran parte, de las alteraciones miccionales y urodinámicas de los pacientes con enfermedad de Parkinson.

8. El modelo de HDD de origen central puesto a punto en este trabajo consigue reproducir los signos de HDD, más fidedignamente, que otros modelos anteriores de HDD, y por tanto podría utilizarse para el ensayo de fármacos que traten de mejorar los síntomas miccionales tanto de la enfermedad de Parkinson como de otras patologías que cursan con HDD.

VII. ANEXOS

ANEXO 1

CUESTIONARIO I-PSS (Badia, 1998)

Muchos pacientes con Enfermedad de Parkinson tienen escapes de orina en un momento determinado. Estamos intentando determinar el número de personas que presentan este problema y hasta que punto les preocupa esta situación. Le estaríamos muy agradecidos si contestase a las siguientes preguntas, pensando en cómo se ha encontrado en las últimas cuatro semanas.

Nombre:

Fecha de hoy:

Sintomas	Nunca	Una vez de cada cinco	Una vez de cada tres	Una vez de cada dos	Dos veces de cada tres	Casi siempre
1. Durante el mes pasado, ¿cuántas veces ha tenido la sensación, al terminar de orinar, de que no había vaciado la vejiga al completo?	0	1	2	3	4	5
2. Durante el mes pasado, ¿cuántas veces ha tenido que orinar más de una vez en menos de dos horas?	0	1	2	3	4	5
3. Durante el mes pasado, ¿cuántas veces le ha sucedido que se le interrumpiera o cortara el chorro de la orina?	0	1	2	3	4	5
4. Durante el mes pasado, ¿cuántas veces le ha resultado difícil aguantar las ganas de orinar?	0	1	2	3	4	5
5. Durante el mes pasado, ¿cuántas veces ha tenido un chorro de orina flojo?	0	1	2	3	4	5
6. Durante el mes pasado, ¿cuántas veces ha tenido que apretar o hacer fuerza para empezar a orinar?	0	1	2	3	4	5
	Ninguna	1 vez	2 veces	3 veces	4 veces	5 veces o más
7. Durante el mes pasado, ¿cuántas veces se ha levantado para orinar por la noche, desde que se acuesta hasta que se levanta por la mañana?	0	1	2	3	4	5
TOTAL I-PSS =.....						

Muchas gracias por responder estas preguntas

ANEXO 2

CUETIONARIO IU-4 (modificado de Badia, 1999)

Muchos pacientes con Enfermedad de Parkinson pierden orina en un momento determinado. Estamos intentando determinar el número de personas que presentan este problema y hasta que punto les preocupa esta situación. Le estaríamos muy agradecidos si contestase a las siguientes preguntas, pensando en cómo se ha encontrado en las últimas cuatro semanas.

Nombre:

Fecha de hoy:

1. ¿Con qué frecuencia se le escapa la orina? (Marque sólo una respuesta)
Nunca..... 1
Alguna vez..... 2
Continuamente..... 3

 2. ¿Se le escapa la orina cuando hace un esfuerzo físico (subir o bajar escaleras, reír, toser, estornudar)?
Nunca..... 1
Alguna vez..... 2
Siempre..... 3

 3. ¿Se le presentan bruscamente las ganas de orinar?
Nunca..... 1
Alguna vez..... 2
Siempre..... 3

 4. ¿Se le ha escapado la orina porque no le da tiempo a llegar al baño?
Nunca..... 1
Alguna vez..... 2
Continuamente..... 3

 5. Por causas de los escapes de orina al presentarse bruscamente las ganas de orinar, ¿Ha necesitado usar algún tipo de protección?
Nunca..... 1
Alguna vez..... 2
Continuamente..... 3
- Puntuación total.....

Muchas gracias por contestar estas preguntas.

ANEXO 3: ESCALA DE SÍNTOMAS NEUROLÓGICOS PARA LA EP UPDRS (UNIFIED PARKINSON'S DISEASE RATING SCALE) (Fahn y Elton, 1987).

Solo se muestran los ítems correspondientes a la exploración motora (Subescala III del cuestionario global) de los síntomas estudiados.

LENGUAJE.

0. Normal.
1. Pérdida discreta de expresión, dicción y/o volumen.
2. Monótono: farfullado, pero comprensible; moderadamente alterado.
3. Muy alterado, difícil de comprender.
4. Ininteligible.

EXPRESION FACIAL.

0. Normal.
1. Mínima hipomimia; podría ser una cara inexpresiva (“cara de póker”) normal.
2. Disminución discreta, pero claramente anormal, de la expresión facial.
3. Hipomimia moderada; labios separados la mayor parte del tiempo.
4. Cara <<de máscara>> o expresión fija con pérdida acusada o completa de la expresión facial; labios separados más de 6mm.

TEMBLOR DE REPOSO EN MMSS

0. Ausente.
1. Discreto e infrecuentemente presente.
2. Discreto en amplitud y persistente, o de amplitud moderada pero presente sólo de forma intermitente.
3. De amplitud moderada y presente la mayor parte del tiempo.
4. De gran amplitud y presente la mayor parte del tiempo.

TEMBLOR DE REPOSO EN MMII

0. Ausente.
1. Discreto e infrecuentemente presente.
2. Discreto en amplitud y persistente, o de amplitud moderada pero presente sólo de forma intermitente.
3. De amplitud moderada y presente la mayor parte del tiempo.
4. De gran amplitud y presente la mayor parte del tiempo.

TEMBLOR DE ACCIÓN O POSTURAL DE LAS MANOS

0. Ausente
1. Leve; presente con la acción
2. De amplitud moderada; presente con acción.
3. De amplitud moderada al mantener la postura en el aire; así como con la acción.
4. De gran amplitud; interfiere la alimentación.

RIGIDEZ AXIAL (Valorada según el movimiento pasivo de las grandes articulaciones, con el paciente relajado y sentado).

0. Ausente.
1. Discreta o detectable solamente cuando se activa por movimientos en espejo o de otro tipo.
2. Discreta a moderada.
3. Intensa pero se consigue con facilidad el movimiento en toda su amplitud.
4. Muy intensa; la amplitud del movimiento se logra con dificultad.

RIGIDEZ EN MMSS (Valorada según el movimiento pasivo de las grandes articulaciones, con el paciente relajado y sentado. No considerar la rigidez “en rueda dentada”).

0. Ausente.
1. Discreta o detectable solamente cuando se activa por movimientos en espejo o de otro tipo.
2. Discreta a moderada.
3. Intensa pero se consigue con facilidad el movimiento en toda su amplitud.
4. Muy intensa; la amplitud del movimiento se logra con dificultad.

RIGIDEZ EN MMII (Valorada según el movimiento pasivo de las grandes articulaciones, con el paciente relajado y sentado. No considerar la rigidez “en rueda dentada”).

0. Ausente.
1. Discreta o detectable solamente cuando se activa por movimientos en espejo o de otro tipo.
2. Discreta a moderada.

3. Intensa pero se consigue con facilidad el movimiento en toda su amplitud.
4. Muy intensa; la amplitud del movimiento se logra con dificultad.

GOLPETEO DE LOS DEDOS (El paciente golpea el pulgar con el índice en rápida sucesión y con la mayor amplitud posible; realizar con cada mano por separado)

0. Normal (>15/5 segundos)
1. Enlentecimiento discreto y/o reducción de la amplitud (11-14/5 segundos).
2. Moderadamente alterado. Fatigoso de manera evidente y precoz. Puede haber detenciones ocasionales en el movimiento (7-10/5 segundos).
3. Muy alterado. Frecuentes titubeos al iniciar los movimientos o detenciones mientras se realiza el movimiento (3-6/5 segundos).
4. Apenas puede realizar la acción (0-2/5 segundos).

MOVIMIENTOS ALTERNANTES CON LAS MANOS (El paciente abre y cierra las manos en rápida sucesión con la mayor amplitud posible).

0. Normal.
1. Discreto enlentecimiento y/o reducción de la amplitud.
2. Alteración moderada. Fatigoso de manera evidente y precoz. Puede haber detenciones ocasionales en el movimiento.
3. Muy alterado. Frecuentes titubeos al iniciar los movimientos o detenciones mientras se realiza el movimiento
4. Apenas puede realizarlos.

MOVIMIENTOS RAPIDOS ALTERNANTES DE MMSS. (Movimientos de pronación-supinación de las manos, en sentido vertical, con la mayor amplitud posible y simultáneamente con ambas manos).

0. Normal.
1. Discreto enlentecimiento y/o reducción de la amplitud.
2. Alteración moderada. Fatigoso de manera evidente y precoz. Puede haber detenciones ocasionales en el movimiento.
3. Muy alterado. Frecuentes titubeos al iniciar los movimientos o detenciones mientras se realiza el movimiento
4. Apenas puede realizarlos.

AGILIDAD CON LOS MMII. (El paciente golpea con el talón en rápida sucesión levantando el pie entero del suelo; la amplitud del movimiento debe ser alrededor de 7,5 cm).

0. Normal.
1. Discreto enlentecimiento y/o reducción de la amplitud.
2. Alteración moderada. Fatigoso de manera evidente y precoz. Puede haber detenciones ocasionales en el movimiento.
3. Muy alterado. Frecuentes titubeos al iniciar los movimientos o detenciones mientras se realiza el movimiento
4. Apenas puede realizarlos.

LEVANTARSE DE LA SILLA (El paciente intenta levantarse de una silla de madera o metal de respaldo recto, con los brazos cruzados ante el pecho).

0. Normal
1. Lento, o puede necesitar más de un intento.
2. Tiene que impulsarse con los brazos en la silla.
3. Tiende a caer hacia atrás y puede tener que intentarlo más de una vez, pero puede conseguirlo sin ayuda.
4. Incapaz de levantarse sin ayuda.

POSTURA.

0. Erecta normal.
1. Postura no muy erecta, discretamente encorvada; podía ser normal en una persona mayor.
2. Postura moderadamente encorvada, claramente anormal. Puede inclinarse discretamente a un lado.
3. Postura muy encorvada, con cifosis. Puede inclinarse moderadamente a un lado.
4. Flexión marcada con alteración postural extrema.

MARCHA.

0. Normal.
1. Camina lentamente; puede arrastrar los pies, con pasos cortos, pero sin festinación ni propulsión.
2. Camina con dificultad, pero no requiere ayuda o muy escasa. Puede haber festinación, pasos cortos o propulsionados.

3. Trastornos graves de la marcha que requieran ayuda.
4. No puede caminar, incluso con ayuda.

ESTABILIDAD POSTURAL (respuesta al desplazamiento súbito posterior producido por un tirón de los hombros mientras el paciente permanece en bipedestación con los ojos abiertos y los pies discretamente separados; el paciente está avisado)

0. Normal.
1. Retropulsión, pero se recupera sin ayuda.
2. Ausencia de respuesta postural; se caería si no le sujetara el examinador.
3. Muy inestable; tiende a perder el equilibrio espontáneamente.
4. Incapaz de permanecer en pie sin ayuda.

BRADIQUINESIA E HIPOQUINESIA (combina lentitud, titubeo, disminución del braceo, pequeña amplitud y pobreza de movimiento en general)

0. No hay.
1. Mínima lentitud que da al movimiento un carácter deliberado; podría ser normal en algunas personas. Amplitud posiblemente reducida.
2. Lentitud y pobreza de movimientos, en grado leve, que es claramente anormal. Como alternativa, cierto grado de reducción de amplitud.
3. Lentitud, pobreza o pequeña amplitud de movimientos moderada.
4. Lentitud, pobreza o pequeña amplitud de movimientos marcada.

ANEXO 4: ESCALA DE GRAVEDAD DE LA EP DE HOEHN Y YAHR (Hoehn y Yahr)

Estadio/Situación Clínica

- 0.- No hay signos de enfermedad.
- 1.0- Enfermedad exclusivamente unilateral.
- 1.5- Afectación unilateral y axial.
- 2.0- Afectación bilateral sin alteración del equilibrio.
- 2.5- Afectación bilateral leve con recuperación en la prueba de retropulsión (Test del empujón)
- 3.0- Afectación bilateral leve a moderada; cierta inestabilidad postural, pero físicamente independiente.
- 4.0- Incapacidad grave; aún capaz de caminar o de permanecer en pie sin ayuda.
- 5.0- Permanece en una silla de ruedas o encamado si no tiene ayuda.

ANEXO 5: HOJA DE RECOGIDA DE DATOS EN ENFERMOS DE PARKINSON

FILIACIÓN:			
Edad:	Sexo:	Años de evolución de la enfermedad:	
CAUSAS POSIBLES DE HDD:	Enfermedad de Parkinson <input type="checkbox"/>	HBP <input type="checkbox"/>	
	Medicación <input type="checkbox"/>	Edad >70 <input type="checkbox"/>	
ESCALAS DE SÍNTOMAS			
Rigidez (0 – 4)*:			
Hipocinesia (0 – 4)*:			
Temblor de reposo (0 – 4)*:			
Inestabilidad (0 – 4)*:			
Síntomas disautonómicos (S o N):			
Gravedad de la EP (Puntuación en escala de Hoehn y Yahr):			
Síntomas urinarios Puntuación IPSS (Hombre):			
Puntuación IU-5 (Mujer):			
PATRÓN MICCIONAL INICIAL			
Número de episodios de urgencia miccional:			
Número de micciones día:			
Número de episodios de incontinencias:			
TACTO RECTAL:	grado I	grado II – III	grado IV
ECOGRAFIA ABDOMINAL (Signos ecográficos de obstrucción):	SI	NO	
ESTUDIO URODINÁMICO			
Volumen infundido hasta el primer deseo miccional			
Capacidad vesical máxima			
Presencia de contracciones no inhibidas			
Presión máxima del detrusor			
Distensibilidad o complianza del detrusor			
Obstrucción el nomograma de Siroky	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	
EVALUACIÓN A LOS TRES MESES			
Tratamiento con tolterodina	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	
Puntuación IPSS			
Puntuación IU-5			
Diario Miccional	Número de episodios de urgencia miccional:		
	Número de micciones día:		
	Número de episodios de incontinencias:		
Efectos adversos o complicaciones por el tratamiento instaurado			
Sistema nervioso autónomo:		Dispepsia	
(que no presentara previamente)		Estreñimiento	
		Dolor abdominal	
		Flatulencias	
		Vómitos	
		Alteraciones de la acomodación	
		Sequedad de boca	
General:	Dolor de cabeza.		
	Dolor de pecho.		
Visión:	Xeroftalmia.		
Piel:	Sequedad de piel.		
Psiquiátricos:	Somnolencia.		
	Nerviosismo.		
Urinarios:	Retención urinaria.		

*Aparecen en negrillas los datos obtenidos en la consulta de neurología. * Valor medio de los diversos ítems sobre este síntoma que aparece en la escala de síntomas neurológicos UPDRS.*

ANEXO 6: DIARIO MICCIONAL UTILIZADO
(Se muestra el cuestionario relleno para una mejor comprensión)

Hora	Bebidas		Micción		Pérdidas accidentales	¿Urgencia?	¿Qué estaba haciendo?
	Qué tipo	Cuánto	Cuántas veces	Cantidad (poca, media, mucha)	Cantidad (poca, media, mucha)	¿Urgencia?	¿Qué estaba
06-08	–	–	1	Poca	–	Sí	Dormir
08-10	Café+leche	250 mls	1	Media	Media	Sí	Trabajo
10-12		–	2	Media	Poco	Sí	Trabajo
12-14	Agua/sopa	500 mls	1	Poca	–	Sí	Trabajo
14-16	Café	100 mls	2	Mucha	–	Sí	Trabajo/comer
16-18	–	100 mls	2	Media	Media	Sí	Gimnasio
18-20	Leche	400 mls	1	Poca	Poco	Sí	Actividades domésticas
20-22	Agua/puré	500 mls	2	Media	Poco	Sí	Cena
22-00	Leche	250 mls	2	Media	Poco	Sí	TV
00-02	–		1	Media	–	Sí	Dormir
02-04	–		1	Poca	Poco	Sí	Dormir
04-06	–		1	Poca	–	Sí	Dormir

ANEXO 7: HOJA DE RECOGIDA DE DATOS UTILIZADA EN ANIMALES

RATA Nº _____. 6-OHDA INTRAVENTRICULAR <input type="checkbox"/> ClNa+ <input type="checkbox"/> NO LESIONADA <input type="checkbox"/> Nacida _____ Fecha _____ Peso (g.) _____			
1º LESIÓN ESTEROTÁXICA			
Coordenadas esterotáxicas	AP	L	DV
Bregma			
3V respecto a Bregma	-2	0	-9
3V: coordenadas definitivas			
Anestesia (hidrato de cloral 70 mg/ml ClNa+ 0.9%, 350 mg/Kg): _____ µ Desipramina (15 mg/ml ClNa+ 0.9%, 30 mg/Kg): _____ µ Penicilina (40.000 u) 6-OHDA (____ mg/ml ClNa+ 0.9%, 0.3 mg/ml L-ascorbato): _____ µ (Display _____ ml) Hydrochloride <input type="checkbox"/> Tasa de inyección: _____ µl/min (Display _____ ml/h) Incidencias			
2º IMPLANTECIÓN DEL CATÉTER			
Fecha _____ Hora _____ Incidencia _____			
3º ESTUDIO URODINÁMICO			
Fecha _____ Hora _____ Incidencias _____			
			Tras inyección L-Dopa
Presión miccional	_____ cm H ₂ O		
Presión umbral	_____ cm H ₂ O		
Presión basal	_____ cm H ₂ O		
Capacidad vesical	_____ ml		
Volumen miccional	_____ ml		
Volumen Umbral	_____ ml		
FCEP	_____ min		
ACEP	_____ cm H ₂ O		
Tiempo intermiccional	_____ min		
Incidencias:			
4º ESTUDIO HISTOLÓGICO			
Lesión dopaminérgica de la sustancia negra:	Si	No	
Denervación del estriado	Si	No	
Cualquier otra alteración (describirla):			

ACEP: Amplitud de cambios espontáneos de presión; FCEP: Frecuencia de los cambios espontáneos de presión intravesical; AP: anteroposterior; L: lateral; DV: dorsoventral; 3V: tercer ventrículo; Display: mostrar en pantalla el ritmo de perfusión.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abrams P, Freeman R, Anderstrom C, Mattiasson A (1998). "Tolterodina a new antimuscarinic agent: as effective but better tolerated than oxybutinin in patients with an overactive bladder". *Br J Urol* 81: 801-10.

Abrams P, Cardozo L, Fall M. (2002). "The standarization of terminology of lower urinary tract function: report from the standarization Sub-committe of the international Continence Society". *Neurourol Urodyn*; 21: 167-78.

Abrams, P. (2003). "Describing bladder storage function: overactive bladder syndrome and detrusor overactivity". *Urology*.62 (Suppl 2):28-37; discussion 40-2.

Alkadhi K.A, Hogan YH. (1992). "Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydroxypyridine (MPTP) on ganglionic transmission". *J Auton Pharmacol* 12 (1): 15-23.

Andersen, J. (1978). "Prostatism: clinical, radiological and urodynamics aspects". *Neurourol Urodyn* 1: 241.

Andersen J, Jacobsen O. (1978). "Bladder function in healthy elderly males." *Scand J Urol Nephrol* 12: 123-7.

Andersson KE, Sjögren C (1982). "Aspects on the physiology and pharmacology of the bladder and urethra". *Prog Neurobiol* 19: 71-89.

Andersson KE. (2002). "Treatment of the overactive bladder: Possible central nervous system drug targets". *Urology* 59 (Suppl 5A): 18-24.

Andersson KE, Appel R, Award S, Chapple C, Drutz H, Fourcroy J, y col. (2002). "Pharmacological treatment of urinary incontinence". In: *Incontinence, 2nd International Consultation on incontinence*, Abrams P, Khoury S, & Wein A (eds), Plymbridge Distributors Ltd, Plymouth, UK, 479-511.

Andersson KE. (2003). "Storage and voiding symptoms: pathophysiologic aspects". *Urology* 62:3-10.

Andersson KE. (2004). "Antimuscarinics for treatment of overactive bladder". *Lancet Neurol* 2004; 3: 46-53.

Appell, R. (1997). "Clinical efficacy and safety of tolterodina in the treatment of overactive bladder: a pooled analysis." *Urology* 59: 90-6.

Appell R, Abrams P, Drutz HP, Van-Kerrebroeck P, Millard R, Wein A. (2001). "Treatment of overactive bladder: Long term tolerability and efficacy of tolterodine". *World Journal of Urology* 19: 141-7.

Araki I, de Groat WC. (1997). "Synaptic modulation associated with developmental reorganization of visceral reflex pathways". *J. Neurosci* 17: 8402.

- Araki I, Kuno S. (2000). "Assessment of voiding dysfunction in Parkinson's disease by the international prostate symptom score". *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 68: 429-33.
- Aranda B, Cramer P (1993). "Effect of apomorphine and L-dopa on the parkinsonian bladder." *Neurourol Urodyn* 12: 203-9.
- Atala A. (1999). "Creation of bladder tissue in vitro and in vivo. A system for organ replacement". *Adv Exp Med Biol*, 462: 31.
- Badia X, Garcia-Losa M, Dal-Ré R, Carballido, J, Serra M. (1998). "Validation of harmonized Spanish version of the IPSS: evidence of equivalence with the original American scale. International Prostate Symptom Score". *Urology*; 52: 614-20.
- Badia-Llach X, Castro-Díaz D, Perales-Cabanas L, Pena-Outeriño JM, Martínez-Agulló E, Conejero-Sugranes J. (1999). "The development and preliminary validation of the IU-4 questionnaire for the clinical classification of urinary incontinence". *Actas Urol Esp* 23:565-72.
- Bahita N, Bradley W. (1983). "Neuroanatomy and physiology: innervation of the urinary tract." In Raz S (ed): *Female Urology*. Philadelphia, WB Saunders.: 12.
- Baik JH, Picetti R, Siardi A, Thiriet G, Dierich A, Dapualis A, Le Meur M, Borrelli E. (1995). "Parkinson-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptor." *Nature* 377: 424-8.
- Barrington F. (1921). "The relation of the hind-brain to micturition." *Brain* 44: 23.
- Barrero R, Mir P, Cayuela A, Campoy P, Pena JM, Alberca R. "Síntomatología miccional y alteraciones urodinámicas en la enfermedad de Parkinson". *Neurología* 2007; 22:93-98.
- Benson G. (1990). "Bladder dysfunction in the elderly." *Am J Kidney Dis*. 16(4): 322-3.
- Berger Y, Blaivas J, DeLaRocha ER, Salinas JM. (1987). "Urodynamics findings in Parkinson's disease." *J Urol* 138: 836-8.
- Betarbet R, Sherer T, Greenamyre JT. (2002). "Animal models of Parkinson's disease." *BioEssays* 24: 308-18.
- Blaivas, J. (1982). "The neurophysiology of micturition: a clinical study of 550 patients." *J Urol* 127: 958.
- Blok BFM, Sturms ATM, and Holstege G. (1997). "PET study on brain control of micturition in humans". *Brain* 120: 11-121.
- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. (2001) "Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution of the apoptotic theory in Parkinson's disease". *Prog Neurobiol* 65:135-72.
- Bradley W, Teague C (1968). "Spinal cord organisation of micturition reflex afferents." *Exp Neurol* 22: 68.

Bradley W, Timm G, Scott FB. (1974). "Innervation of the detrusor muscle and urethra". *Urol Clin N Am.* 1: 3.

Bradley W, Sundin T (1982). "The physiology and pharmacology of urinary tract dysfunction." *Clin Neuropharmacol* 5: 131.

Brusa L, Petta F, Pisani A, Moschella V, Iani C, Stanzione P. (2007). "Acute vs chronic effects of l-dopa on bladder function in patients with mild Parkinson disease". *Neurology* 68: 1455-1459.

Carlsson C. (1978). "The supraspinal control of the urinary bladder." *Acta Pharmacol Toxicol* 43 suppl 2:8-12.

Chen SY, Wang SD, Cheng CL, Kuo JS, de Groat WC, Chai CY. (1993). "Glutamate activation of neurons in cardiovascular reactive areas of the cat brain stem affects urinary bladder motility". *Am J Physiol*;256: 520-7.

Crower R, Burnstock G. (1988). "Intramural ganglia in the human urethra." *J Urol* 140: 183-7.

Damian J., Martínez Moreno JM, Lobo F, Bonache J, Cerviño J, Redondo Márquez L, Martínez Agulló E. (1998). "Prevalence of urinary incontinence among Spanish older people living at home." *Eur Urol* 34: 333-8.

De Groat WC, Ryall RW. (1969). "Reflex to the sacral parasympatic neurones concerned with micturition in the cat". *J Physiol* 200: 87.

De Groat WC, Booth A. (1984). "Autonomic system to the urinary bladder and sexual organs." En: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge R, eds. *Peripheral neuropathy*. Philadelphia: WB Saunders.: 285-99.

De Groat WC, Kawatani M. (1985). "Neural control of the urinary bladder: possible relationship between peptidergic inhibitory mechanisms and detrusor instability." *Neurourol Urodyn* 4: 285-300.

De Groat WC. (1986). "Spinal cord projections and neuropeptides in visceral afferent neurons". *Prog Brain Res*; 67:165-88.

De Groat WC, Strees W. (1988). "Neural Control of the urinary bladder and sexual organs: experimental studies in animals." Bannister R, ed. *Autonomic failure: a textbook of clinical disorders of the autonomic nervous system*. 2^a edition. Oxford: Oxford University Press.: 196-222.

De Groat, WC, Booth A, Yoshimura N. (1993). "Neurophysiology of micturition and its modification in animal models of human disease." En: *Nervous control of the urogenital system*. Switzerland: Harwood Academic Publishers.

De Groat WC, Downie JW, Levin RM, Long Lin AT, Morrison JFB, Nishizawa O, y col. (1999) "Basic Neurophysiology and Neuropharmacology": 1st International Consultation on Incontinence, Monaco 1998. Pp 105-154. In 'Incontinence' Edited by P. Abrams, S. Khoury and A. Wein. Health publications, Ltd. ISBN 1 898452 25 3.

Defreitas GA, Lemack GE, Zimmern PE, Dewey RB, Roehenborn CG, O'Suilleabhain PE. (2003). "Distinguishing neurogenic from non-neurogenic detrusor overactivity: urodynamic assessment of lower urinary tract symptoms in patients with and without Parkinson's disease." *Urology* 62(4): 651-5.

Deplanne V, Palea S, Angel I. (1998). "The adrenergic, cholinergic and NANC nerve-mediated contractions of the female rabbit bladder neck and proximal, medial and distal urethra." *Br J Pharmacol* 123: 1517-24.

de Rijk MC, Rocca WA, Anderson DW, Melcon MO, Breteler MM, Maragarone DM. (1997). "A population perspective on diagnostic criteria for Parkinson's disease". *Neurology* 48(5):1277-81.

Diokno A, Hyndman C, Hardy DA, Lapides J. (1972). "Comparison action of imipramine (Tofranil) and Propantheline (Probanthine) on detrusor contraction." *Br J Urol* 107: 42-3.

Diokno A, Brown M, Brock BM, Herzog AR, Normolle DP. (1988). "Clinical and cystometric characteristic of continent and incontinent noninstitutionalized elderly." *J Urol* 140: 567-71.

Dray A, Metsch R. (1984). "Inhibition of urinary bladder contractions by a spinal action of morphine and other opioids". *Exp Ther*; 231:254-7.

Dykstra DD, Sidi AA, Scout AB, Pagel JM, Goldish GD. (1988). "Effects of botulinum A toxin on detrusor sphincter dyssynergia in spinal cord injury patients." *J Urol*, 139: 919.

Elbadawi A. (1982). "Neuromorphologic basis of vesicourethral function". *Neurourol Urodyn*; 1: 3-50.

Esteban M, Sanchez-Chapado M. (1999). "Actualizaciones del tratamiento farmacológico de la vejiga hiperactiva." *Urol Interg Invest* 4: 125-37.

Espey MJ, Downie JW. (1995). "Modulation bladder function before and after spinal transection". *Eur. J. Pharmacol.* 287: 173

Espey MJ, DU HJ, Downie JW. (1998). "Serotonergic modulation of spinal ascending activity and sacral reflex activity evoked by pelvic nerve stimulation in cats". *Brain Res*; 798:101-8.

Franks ME, Sasaki K, Seki S. (2001). "Inhibitory effects of preproenkephalin (PPE) gene therapy mediated by herpes simple virus (HSV) vector on bladder hyperactivity induced by intravesical capsaicin." *J Urol, Suppl.*, 165: 249, abstract 1027.

Fahn S, Elton RL. (1987). "UPDRS Development Committee. Unified Parkinson's disease. Florham Park, NY: MacMillan Healthcare Information 2,: 153-63, 293-304.

Finazzi-Agrò E, Peppe A, D'Amico A, Petta F, Mazzone P, Micali F, Caltagirone C. (2003). "Effects of subthalamic Nucleus Stimulation on Urodynamic findings in patients with Parkinson's disease". *J Urol* 169 (4); 1388-91.

- Gilpin C, Dixon J, Gilpin SA, Gosling JA. (1983). "The fine structure of autonomic neurons in the wall of the human urinary bladder." *J Anat* 137: 705-13.
- Gosling JA, Dixon JS, Lendon RG. (1977). "The innervation of the human male and female bladder neck and proximal urethra." *J Urol*. 118: 302-5.
- Gosling JA. (1979). "The structure of the bladder and urethra in relation to function." *Urol Clin N Am*. 6: 31-40.
- Gosling JA, Dixon JS. (1990). "Anatomy of the bladder and urethra." *Scientific foundations of urology*. Heinemann medical Books and Year book medical publishers. 33: 266-73.
- Gray R, Stern G, Malone-Lee J. (1995). "Lower urinary tract dysfunction in Parkinson's disease." *Age Aging* 24: 499-504.
- Griffiths J. (1977). "Urodynamics assessment of bladder function." *B J Urol*. 49: 29-36.
- Hasegawa Y, Takahashi A. (1992). "Progressive autonomic failure with Parkinson's disease". *Nippon Rinsho* 50 (4): 790-8. (Solo el abstrac).
- Hisamitsu T, De Groat WC. (1984). "The inhibitory effect of opioid peptides and morphine applied intrathecally and intracerebrovascularly on the micturition reflex in the cat". *Brain Res*; 298: 51-55.
- Hobson P, Islam W, Roberts S, Adhiyman V, Meara J. (2003). "The risk of bladder and autonomic dysfunction in a community cohort of Parkinson's disease patients and normal controls". *Parkinsonism Relate Disorders*. 10(2):67-71.
- Hoehn MM, Yahr GM. (1967). "Parkinsonism: onset, progression and mortality". *Neurology*; 17: 427-42.
- Holstegue G. (1987). "Some anatomical observations on the projections from the hypothalamus to brainstem and spinal cord: an HRP and autoradiographic tracing study in the cat". *J Comp Neurol* 260: 98-106.
- Hu TW, Wagner TH, Bentkover JD, LeBlanc K, Piantentini A, Stewart WF, Corey R, Zhou SZ, Hunt TL. (2003). "Estimated economic cost of overactive bladder in the United States". *Urology* 61: 1123-28.
- Hughes AJ, Daniel SE, Blankson S, Lees AJ. (1993). "A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease." *Arch Neurol* 50(2): 140-8.
- Hunsballe JM, Djurhuus JC. (2001). "Clinical options for imipramina in the management of urinary incontinence". *Urol Res*; 29:118-125.
- Igawa, Y, Mattiasson A, Andersson KE. (1993). "Effects of GABA- receptor stimulation and blockade on micturition on normal rats and rats with bladder outflow obstruction". *J Urol* 150: 537-42.

Inselin CE, Schmidlin F, Borst F, Rohner S, Graber P. (1997). "Oxybutynin in the treatment of early detrusor instability after transurethral resection of de prostate." *Br J Urol* 79: 915-9.

Jänig W, McLchlan E. (1987). "Organization of lumbar spinal outflow to distal colon and pelvic organs." *Physiol Rev* 67: 255-77.

Jones KW, Schoenberg HW. (1985). "Comparison of the incidence of bladder hiperreflexia in patients with benign prostatic hypertrophy and age matched female controls." *J Urol* 133: 425-6.

Klevmark B. (1974). "Motility of the urinary bladder in cats during filling at physiological rates, intravesical pressure patterns study by a new method of cystometry". *Acta physiol Scand.* 90:565-77.

Koike Y, Takahashi A. (1997). "Autonomic dysfunction in Parkinson's disease". *Eur Neurol* 38 Suppl 2: 8-12.

Kojima M, Takeuchi Y, Goto M, Sano Y. (1983). "Immunohistochemical study on the localization of serotonin fibres and teminals in the spinal cord of the monkey". *Cell Tissue Res*; 229:23,.

Kontani H, Inouse T, Sakai T. (1990). "Dopamine receptor subtypes that induce hyperactive urinary bladder response in anesthetized rats." *Jpn J Pharmacol* 54: 482-6.

Kontani, H, Inouse T, Sakai T. (1990). "Effects of apomorphine on urinary bladder motility in anesthetized rats." *Jpn J Pharmacol* 52: 59-67.

Kresis DS, Mastropieto CW, Rawji SS, Walters JR. (1997). "The response of subthalamic nucleus neurons to dopamine receptor stimulation in the rodent model of Parkinson's disease." *J neurosci* 17: 6807-19.

Kumar R, Agarwal AK, Seth PK (1995). "Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine." *J Neurochem* 64: 1703-7.

Kuno S. (1997). "Differential effects of D1 and D2 agonists on neurogenic bladder in Parkinson's disease and MPTP - induced parkinsonian monkeys." *Eur Neurol* 38:Suppl 1: 18-22.

Lang A, Lozano A. (1998). "Parkinson's disease. First of two parts" *N Engl J Med* 339: 1044-53.

Lang A, Lozano A. (1998). "Parkinson's disease. Second of two parts" *N Engl J Med* 339: 1130-42.

Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. (1983). "Chronic Parkinsonism in Human Due to a product of Meperidin-Analog Synthesis". *Science*: 219: 979-80.

Latarget, A. (1982). "Órganos genitourinarios: Vejiga. Uretra." *Tratado de Anatomía Humana. Testut.* 4(13): 924-94.

Lemack GE, Dewey RB Jr, Roehrborn CG, O'Suilleabhain PE, Zimmern PE. (2000). "Questionnaire-based assessment of bladder dysfunction in patients with mild to moderate Parkinson's disease." *Urology* 56(1): 250-4.

Lewin RJ, Dillard GV, Porter RW. (1967). "Extrapyramidal inhibition of the urinary bladder." *Brain Res.* 4: 301-7.

Longhurst PA, Legget RE, Briscoe JA. (1995). "Characterization of the functional muscarinic receptors in the rat urinary bladder." *Br J Pharmacol* 116: 2279-85.

Lundbeck F, Stewart FA. (1989). "Acute changes in the bladder reservoir function after irradiation alone or in combination with chemotherapy: a matter of mouse strain". *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 125:141-7.

Maggi CA, Santicoli P, Meli A. (1986). "The non-stop transvesical cystometrogram in urethane-anaesthetized rats: a simple procedure for quantitative studies on the various phases of urinary bladder voiding cycle". *J Pharmacol Methods*; 5: 157-67.

Maggi C, Meli A. (1988). "The sensory efferent function of capsaicin-sensitive neurons." *Gen Pharmacol* 19: 1-43.

Mahoney DT, Lafrte RO, Blais DJ. (1977). "Integral storage and voiding reflexes." *Urology* 9: 95-106.

Malmgren A, Sjögren C, Uvelius B, Mattasson A, Andersson KE, Andersson PO. (1987). "Cystometrical evaluation of bladder instability in rats with infravesical out flow obstruction." *J Urol* 137: 1291-4.

Malory BS, Roppolo JR, de Groat. (1991). "Pharmacological modulation of the pontino micturition centre". *Brain Research* 546: 310-20.

Madresbacher H, Störer M, Richter R, Burgdorfer H, Hachen HJ, Murtz G. (1995). "Trospium chloride versus oxybutinin: a randomised, double-blind, multicenter trial in the treatment of detrusor hiperreflexia." *Br J Urol* 75: 452-6.

Martínez Agülló E. (1992). "Correlación entre diagnóstico clínico y urodinámico en el síndrome miccional irritativo de la Enfermedad de Parkinson." *Urod.* 5(3): 209-15.

Mattiasson A, Uvelius B. (1982). "Changes in contractile properties in hypertrophy rat urinary bladder." *J. Urol* 128: 1340-2.

Micieli G, Tosi P, Marcheselli S, Cavallini A. (2003) "Autonomic dysfunction in Parkinson's disease". *Neurol Sci* 24 Suppl 1 : 32-4.

Mitterberger M, Marksteiner R, Margreiter E, Pinggera GM, Colleselli D, Frauscher F, y cols. (2007). Autologous myoblasts and fibroblasts for female stress incontinence: a 1-year follow-up in 123 patients. *BJU Int*;100:1081-5.

Morrison J, Strees WD, Brading A, Block B, Fry C, de Groat WC, Kakizaki H, Levin R, Thor R. (2002). "Neurophysiology and Neuropharmacology": 2nd International Consultation on Incontinence, July 2001. Pp 85-163. In 'Incontinence' Edited by P.

Abrams, L. Cardozo, S. Khoury and A. Wein. Health publications, Ltd. ISBN 1 898452 55 5.

Motola JA, Mascarenas B, Badlani GH. (1988). "Cerebrovascular accidents: Urodynamic and neuroanatomical findings". J Urol 139: 512A.

Mundy A. (1987). "Structure and function of the lower urinary tract." Mundy AR Scientific basis of Urology. Edinburgh. Churchill. 3: 3-73.

Murnaghan GF. (1961). "Neurogenic disorders of the bladder in parkinsonism." Br J Urol 33: 403-9.

Nadelhaft I, Vera PL. (1996). "Neurons in the rat brain and spinal cord labelled after pseudorabies virus injected into the external urethral sphincter". J. Comp. Neurol. 375: 502-17.

Netter FH. (2000). Sistema nervioso, trastornos neurológicos y neuromusculares. Colección Ciba de ilustraciones médicas. Ediciones ciencias y técnicas S.A. ISBN 84-458-0187-2.

Netter FH. (2000). Riñones, uréteres y vejiga urinaria. Colección Ciba de ilustraciones médicas. Ediciones ciencias y técnicas S.A. ISBN 84-458-0187-2.

Niimi Y, Ieda T, Hirayama M, Koike Y, Sobue G, Hasegawa Y, Takahashi A. (1999). "Clinical and physiological characteristics of autonomic failure with Parkinson's disease". Clin Auton Res. 9 (3): 139-44.

Norris J, Staskin D. (1996). "Historia, exploración física y clasificación de la disfunción neurógena de la micción." Clin North America 3: 352-7.

O'Donnell PD. (1990). "Central actions of bethanechol on the urinary bladder in dogs". J Urol; 143:634-8.

Ouslander JG, Schnelle JF, Uman G, Fingold S, Nigam JG, Tuico E, Bates-Jensen B. (1995). "Predictors of successful prompted voiding among incontinent nursing home residents." JAMA 273: 1366-70.

Pandita RK, Fujiwara M, Alm P, Andersson KE. (2000). "Cystometric evaluation of bladder function in non anesthetized mice with and without bladder outlet obstruction." J Urol 164: 1385-9.

Pavlaquis A, Siroky MB, Goldstein I, Kranner RJ. (1983). "Neurourological findings in Parkinson's disease." J Urol 129: 80-3.

Paxinos G, Watson Ch. (1986). "The Rat Brain in stereotaxic coordinates." United Kingdom edition published by academic press inc. Orlando, Florida. ISBN 0 12 547621 3.

Perumal AS, Gopal VB, Tordzro WK, Cooper TB, Cadet JL. (1992). "Vitamin E attenuates the toxic effects of 6-hydroxydopamine on free radical scavenging systems in rat brain." Brain Res Bull 29: 699-701.

Petit H, Wiart E, Gaujard E, Le Breton F, Ferriere JM, Lagueny A, Y cols. (1998) "Botulinum A toxin on detrusor sphinter dyssynergia in spinal cord disease." Spinal cord, 36: 91.

Porter RW, Bros E. (1971). "Neurogenic bladder in parkinsonism: effect of thalamotomy." J. Neurosurg 34: 27-32.

Pruchnic R, Chancellor MB, y cols. (2001). "A population of muscle derived cells exhibit stem cell properties and may offer an alternative treatment for urological dysfunction". J Urol, suppl., 165: 37, abstract 151.

Ramirez LV, Ulfhake B, Arvidsson U, Verhofstad AA, Visser TJ, Hokfelt T. (1994) "Serotonergic, peptidergic and GABAergic innervation of the ventrolateral and dorsolateral motor nuclei in the cat S1/S2 segments: an immunofluorescence study." J. J Chem Neuroanat. Jul;7(1-2):87-103

Rajaofetra N, Passagia JG, Marlier L, Poulat P, Pellas F, Sandillon F, y col. (1992) "Serotonergic, noradrenergic and peptidergic innervation of Onuf's nucleus of normal an transected spinal cords of baboons (Papio Papio) ". J Comp Neurol. 318(1):1-17.

Rajput AH, Rozdilsky B, Ang L, Rajput A. (1991). "Clinicopathologic observations in essential tremor: report of six cases". Neurology. 1991 Sep;41(9):1422-4.

Resnick N, Yalla S. (1985). "Management of urinary incontinence in the elderly." N Engl J Med 313: 800-5.

Resnick N. (1988). "Voiding dysfunction in the elderly, in Yalla SW, Mc-Guire EJ, Elbadawi A, Blaivas JG. (eds): Neurourology and urodynamics." Principles and practice. New York, MacMillan Publishing Co.,: 303-30.

Resnick N, Yalla S. (1989). "The pathophysiology of urinary incontinence among institutionalized elderly persons." N Engl Med 320: 1-7.

Resnick. (1994). Geriatric Medicine, en Iselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DJ (edit) Harrison's Principles of Internal Medicine. McGraw-Hill, 1994, page 34.

Richter R, Mardesbacher H, Stohrer M. (1997). "Double blind, placebo controlled clinical study of propioverine in patient suffering from detrusor hiperreflexia." International Medical Society of Paraplegic. 36th Annual scientific Meeting, May 14-16 1997, Insbruck.

Rocha I, Burnstock G, Spyer KM. (2001). "Effect on urinary bladder function and arterial blood pressure of thhe activation of putative purine receptors in brainstem areas". Autonomic Neuroscience-Basic & clinical; 88:6-15.

Rodríguez M, Barroso-Chinea P, Abdala R, Obeso J, Gonzalez-Hernandez T. (2001). "New cell degeneration induced by intraventricular administration of 6 hydroxydopamine in the rat: similarities with cell loss in Parkinson's disease." Exp Neurol 169(1): 163-81.

Rosario D, Leaker R, Smith DJ. (1995). "A pilot study of the effects of multiple doses of the M3 muscarinic receptor antagonist darifenacine on detrusor activity parameters in patients with detrusor instability." *Neurourol Urodyn* 14: 464-5.

Saito M, Gotoh M, Kato K, Hasegawa S, Konda A. (1990). "Pharmacological experiments in aged rat urinary bladder." *Nippon HinyokikaGakkai Zasshi. (Solo abstrac)* 81(6): 862-7.

Sakakibara R, Shinothon H, Uchiyama T, Yoshiyama M, Hattori T, Yamanishi T. (2001). "SPECT imaging of the dopamine transporter with [(123)I]-beta-CIT reveals marked decline of nigrostriatal dopaminergic function in Parkinson's disease with urinary dysfunction". *J Neurol Sci* 187:55-9.

Sakakibara R, Nakazawa K, Uchiyama T, Yoshiyama M, Hattori T. (2003). "Effects of subthalamic nucleus stimulation on the micturation reflex in cats" *Neuroscience*;120(3):871-5.

Salinas J, Viserda M. (1992). "Study on the vesicoelastic properties of the urinary bladder in dogs." *Urol Int* 48: 185-90.

Salonem T, Haapalinna A, Heinonem E. (1996). "Monoamine oxidise B inhibitor selegiline protects young and aged rat peripheral sympathetic neurons against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity". *Acta Neuropathol (Berl)* 91 (5): 466-74.

Sandmann-Keil D, Braak H. (2005). "Postmortal diagnosis of Parkinson's disease" *Pathologe*; 26(3):214-20.

Sasa M, Yoshimura N. (1994). "Locus ceruleus noradrenergic neurons as a micturion center". *Microscopic Res. Tech.*, 29: 226.

Sasaki K, Yoshimura N. (2001). "Nerve growth factor (NGF) gene therapy mediated by herpes simple virus (HSV) vectors reverses bladder dysfunction and the decline in NGF expression in L6-S1 afferent neurons in diabetic rats". *J Urol, suppl.*, 165: 274, abstract 1125.

Schurch B, Stöhrer M, Kramer G, Schimd DM, Gaul G, Hauri D. (2000). "Botulinum A toxin for treating detrusor hiperreflexia in spinal cord injured patients: a new alternative to anticholinergic drug? Preliminary results". *J Urol*, 164: 692.

Seif C, Herzog J, Van der Horst C. (2004) "Effect of subthalamic deep brain stimulation on the function of the urinary bladder". *Ann Neurol.* 55(1):118-20.

Seki S, Igawa Y, Kaidoh K, Ishizuka O, Nishizawa O, Adersson KE. (2001). "Role of dopamine D1 and D2 receptors in the micturition reflex in conscious rats." *Neurourol Urodyn* 20(1): 105-13.

Smeth P, Jonaviciu J, Marshall VR. (1996). "Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves and identification of the cellular target of nitric oxide in guinea-pig and human urinary bladder by cGMP immunohistochemistry." *Neurosciencie* 71: 337-48.

Sillen U, Rubenson A, Hjalmas K. (1981). "On the location of the centrally induced hyperactive urinary bladder response to L-dopa in the rat". *Acta Physiol Scand*; 112:137-40.

Smith R, Tanagho E. (1991). "Clinical applications of neurostimulation." En: *Clinical Neuro-Urology*. Cap 39: 2nd ed. Boston: Little, Brown & Co.: 643.

Staskin D, Vardi Y, Siroky M.B. (1988). "Post-prostatectomy continence in the Parkinsonian patient: the significance of poor voluntary sphincter control". *J Urol* 140: 117-8.

Strasser H, Marksteiner R, Margreiter E, Pinggera GM, Mitterberger M, Frauscher F, y cols. (2007). "Autologous myoblasts and fibroblasts versus collagen for treatment of stress urinary incontinence in women: a randomised controlled trial". *Lancet* 30; 369 :2179-86.

Stephenson T, Wein A. (1984). "The interpretation of urodynamics. En: *Urodynamics. Principles, practice and applications*. Churchill Livingstone. Edimburgo."

Stocchi F, Carbone A, Rhone A, Inghilleri M. (1997). "Urodynamic and neurophysiological evaluation in Parkinson's disease and multiple system atrophy." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 62: 507-11.

Streets W. (1998). "Physiology and pharmacology of the bladder and urethra." En: *Campbell's, ed. Urology 7^a Edition* 1: 870-915.

Suchowersky O, Frutado S, Rohs G. (1995). "Beneficial effects of intranasal desmopresin for nocturnal polyuria in Parkinson's disease." *Mov Disord* 10: 337-40.

Tanagho E. (1988). "Anatomía del aparato urinario inferior." *Campbell. Walsh, Guittes, Perlmutter, Stamey. Ed. Panamericana. Buenos Aires. 1: 48-78.*

Thomas A, Abrams P. (2000). "Lower urinary tract symptoms, benign prostatic obstruction and the overactive bladder." *BJU international*. 85(Suppl 3): 57-68.

Tong Y, Hung Y. (1997). "Evidence of adenosine 5'-triphosphate release from nerve and P2x-purinoreceptor mediated contraction during electrical stimulation of rat urinary bladder smooth muscle". *J Urol* 158: 1973-7.

Ungerstedt U. (1968). "6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons." *Eur J Pharmacol* 5: 107-10.

Ursillo R. (1961). "Electrical activity of the isolated nerve-urinary bladder strip preparation of the rabbit." *Am J Physiol* 201: 408-11.

Valentino RJ, Pavcovich LA, Hirata H. "Evidence for corticotrophin-releasing hormone projections from Barrington's nucleus to the periaqueductal gray and dorsal motor nucleus of the vagus in the rat". *J. Comp. Neurol.*, 363: 402.

Vizzard MA, Erickson VL, Card JP, Roppolo JR, de Groat WC. (1995). "Transneuronal labeling of neurons in the adult rat brainstem and spinal cord after injection of pseudorabies virus into the urethra". *J. Comp. Neurol.*, 355: 629.

- Wagner T, Hu T. (1998). "Economic costs of urinary incontinence in 1995." *Urol* 51: 355-61.
- Wakabayasy K, Takahashi H. (1997). "Neuropathology of autonomic nervous system in Parkinson's disease". *European Neurol* 38; suppl 2:2-7.
- Wein A. (2003) "Diagnosis and treatment of the overactive bladder" *Urology* 62, 20-27 (Suppl 2).
- Willis W, Westlund, K. (1997). "Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain". *J. Clinical Neurophysiol.*, 14: 2.
- Winge K, Wederlin LM, Nielsen KK, Stimpel H. (2004). "Effects of dopaminérgica treatment on bladder function in Parkinson's disease". *Neurourol Urodyn*: 23:689-96.
- Woodburn J. (1964). "Anatomy of ureterovesical junction." *J Urol* 92: 431.
- Yaksh TL, Pac, Brent CR. (1986). Micturition in rats: a chronic model for study of bladder function and effect of anaesthetics. *Amer J Physiol*; 251-1177-85.
- Yokoyama O, Yoshiyama M, Namiki M, De Groat WC. (1999). "Glutaminergic and dopaminergic contributions to rat bladder Hyperactivity after cerebral artery occlusion." *Am J Physiol* 276: 935-42.
- Yokoyama T, Huard J. (2001). "Muscle-derived cell transplantation and differentiation into lower urinary tract smooth muscle." *Urology*, 57: 826.
- Yoshimura N, Sasa M, Yoshida O, Takaori S. (1992). "Dopamine D-1 receptor-mediated inhibition of micturion reflex by central dopamine from the substantia nigra." *Neurourol Urodyn* 11: 535-45.
- Yoshimura N, Mizuta E, Kuno S, Sasa M, Yoshida O (1993). "The dopamine D1 receptor agonist SKF 38393 suppresses detrusor hyperreflexia in the monkey with parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)." *Neuropharmacology* 32(4): 315-21.
- Yoshimura N, de Groat WC. (1997). "Neural control of de lower urinary tract". *Intern. J Urol*. 4: 111-14.
- Yoshimura N, Mizuta E, Yoshida O, Kuno S. (1998). "Therapeutic effects of dopamine D1/D2 receptor agonists on detrusor hyperreflexia in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned parkinsonian cynomolgus monkey." *J Pharmacol Exp Ther* 286: 228-33.
- Yoshimura N, Chancellor. (2002). "Current and future pharmacological treatment for overactive bladder". *J Urol* 168, 1897-1913.
- Zuch CL, Nordstroem V, Briedrick LA, Hoering GR, Granholm AC, Brickford PC. (2000). "Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion." *J Comp Neurol*. 427(3): 440-54.

