

Características anatómicas y fisiológicas de los músculos pélvicos en la coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*)

Anatomical and physiological characteristics of pelvic muscles in the female rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)

Yolanda Cruz* Dora Luz Corona-Quintanilla* Margarita Juárez* Margarita Martínez-Gómez**

Abstract

In mammals, the pelvic striated muscles have been linked to the regulation of urinary functions and little is known about the involvement of this muscle in reproductive functions. The objective of this study was to use surgical and electrophysiological techniques to determine the anatomical features and innervation of iliococcygeus and pubococcygeus muscles in adult female rabbits and characterize the reflex electromyographic (EMG) activity in response to genital stimulation. Results show that the iliococcygeus and pubococcygeus are long bilateral muscles with fibers attached to the ilium bone. The muscle fibers are not attached to the pelvic viscera but they run adjacent to the vagina and rectum to be inserted into the sacral vertebrae. The iliococcygeus and pubococcygeus muscles are innervated by branches arising from S3 and S4. The reflex EMG activity was obtained during stimulation of the vaginal orifice skin and the perineal and pelvic vagina. Abdominal vaginal stimulation did not cause an EMG response. Cervical stimulation produced a temporary inhibition in the activity of the iliococcygeus and pubococcygeus. These findings extend the poor descriptions of innervation and anatomy of the striated pelvic musculature shown in the textbooks and atlas of rabbits. They also suggest that the iliococcygeus and pubococcygeous muscles can be activated by reflex action during reproductive processes such as mating and parturition.

Key words: PELVIC FLOOR MUSCLES, INNERVATION, VAGINAL STIMULATION, REFLEX ACTIVITY, GROSS ANATOMY.

Resumen

En mamíferos, la musculatura estriada pélvica se ha relacionado con la regulación de funciones urinarias y poco se sabe de su participación en funciones reproductivas. Los objetivos del presente estudio fueron determinar las características anatómicas y la innervación de los músculos iliococcígeo y pubococcígeo de la coneja adulta, y caracterizar la actividad electromiográfica (EMG) refleja en respuesta a la estimulación genital. Para ello se utilizaron técnicas quirúrgicas y electrofisiológicas. Los resultados muestran que el iliococcígeo y pubococcígeo son músculos bilaterales que se originan en el hueso iliaco; están innervados por ramas que emergen de S3 y S4; sus fibras musculares no se adhieren a las vísceras pélvicas, sino que discurren lateral a la vagina y al recto y se insertan en las vértebras sacras. Durante la estimulación de la piel del orificio vaginal y la vagina pélvica y perineal se presentó actividad EMG refleja en ambos músculos. La estimulación de la vagina abdominal no indujo respuesta EMG. La estimulación cervical produjo inhibición temporal en la actividad del iliococcígeo y pubococcígeo. Estos resultados contribuyen a las escasas descripciones anatómicas de la musculatura pélvica de la coneja que se encuentran en libros de texto y atlas; también sugieren que los músculos pélvicos iliococcígeo y pubococcígeo podrían activarse reflejamente durante procesos reproductivos, como la cópula y el parto.

Palabras clave: MÚSCULOS DEL PISO PÉLVICO, INNERVACIÓN, ESTIMULACIÓN VAGINAL, ACTIVIDAD REFLEJA, ANATOMÍA GRUESA.

Recibido el 10 de febrero de 2010 y aceptado el 10 de agosto de 2010.

*Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, km 1.5, Carretera Tlaxcala-Puebla, 90070, Tlaxcala, Tlaxcala, México.

**Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Correspondencia: Margarita Martínez Gómez, Teléfono/fax: (246) 4 62 15 57, Correo electrónico: marmag@biomedicas.unam.mx

Introduction

Domestic does (*Oryctolagus cuniculus*) have a brief mating coitus coupled with short parturition times when compared with other polytocous animal species, since they can give birth to ten or more kits in a period of three to 12 min (average of 10-min).¹ On the contrary, rats gave birth to a similar number of offspring in nearly an hour.¹ Another distinctive physiologic process in rabbits is urination; both, males and females exhibit various forms of urine expulsion, depending of the surrounding social context. The most frequent urination type observed in individually housed rabbits occur in the common squat form; while in the presence of congeners rabbits tend to release urine jets, show post-micturition dribble or even urinate by spraying. These two last forms of urination have been related to chemical communication.²

It is thought that the varied-efficient functions of the urogenital system in the doe are specifically based on intricate anatomic and physiologic features. One of them would be the striated muscle fibers adjacent to urogenital tract.³ Previous studies have described the anatomic and physiologic characteristics of two perineal striated muscles: ischiocavernosus and bulbospongiosus.⁴ The present research studied two pelvic muscles: iliococcygeus and pubococcygeus. In other species, these structures are known as the *levator ani*, and has been postulated that contributes to regulate the urinary and sexual functions.⁵⁻⁸

Although the domestic doe is widely used to study the female reproductive biology in mammals, neither the topographic anatomy and physiology of its pelvic muscles has been described, nor its role regulating reproductive functions.⁹⁻¹¹ Hence, the aims of this research were to determine the anatomical characteristics and innervations of the iliococcygeus and pubococcygeus muscles in the adult doe, as well as to characterize the reflex electromyographic (EMG) activity in response to genital stimulation.

Materials and Methods

A group of 12 adult virgin (3.5-4 kg) Chinchilla-breed rabbits were used. Female rabbits were housed individually in stainless steel cages of 55 x 60 x 40 cm and kept in a conventional animal facility at 20 ± 2°C and maintained under an artificial light and dark cycle (16L:8D rhythm, the light was switched on at 6:00 am). Rabbits were provided daily with a commercial pelleted diet* and water *ad libitum*. Does were anesthetized with 20% urethane** diluted in distilled water and injected intravenously at 1.5 g/kg. Additional doses were used when necessary.

Introducción

Las conejas domésticas (*Oryctolagus cuniculus*) se caracterizan por tener cópulas y partos breves en comparación con otras especies politocas, pues paren diez o más crías en un periodo de tres a 12 minutos (diez minutos en promedio).¹ En contraparte, las ratas paren el mismo número de crías en casi una hora.¹ Otro proceso fisiológico peculiar de los conejos constituye la micción; tanto machos como hembras presentan diferentes formas de expulsar la orina, dependiendo del contexto social. La forma más común de orinar cuando el animal se encuentra solo es en cuclillas; en presencia de congéneres los animales orinan en chisquete, en goteo o en rocío. Estos dos últimos tipos de expulsión de orina se han relacionado con la función de comunicación química.²

Es probable que las diversas y eficientes funciones del sistema urogenital en la coneja estén basadas en sus especializaciones anatómicas y fisiológicas. Una de éstas sería la musculatura estriada adyacente al tracto urogenital.³ En estudios previos se describieron las características anatómicas y fisiológicas de dos músculos perineales: isquiocavernoso y bulboespongioso.⁴ El presente estudio se enfocó en el análisis de dos músculos pélvicos: iliococcígeo y pubococcígeo. En otras especies, a estos músculos también se les conoce como músculo elevador del ano, se ha propuesto que este contribuye a la regulación de funciones urinarias y sexuales.⁵⁻⁸

Aunque la coneja doméstica es muy utilizada para estudiar la biología reproductiva femenina de los mamíferos, no se ha descrito la topografía anatómica y la fisiología de sus músculos pélvicos, ni su relación con la regulación de funciones reproductivas.⁹⁻¹¹ Los objetivos del presente trabajo fueron determinar las características anatómicas y la innervación de los músculos iliococcígeo y pubococcígeo de la coneja adulta, así como caracterizar la actividad electromiográfica refleja en respuesta a la estimulación genital.

Material y métodos

Se utilizaron 12 conejas adultas vírgenes de la raza Chinchilla (3.5 a 4 kg). Las hembras fueron alojadas en jaulas individuales de acero inoxidable (50 × 60 × 40 cm) y se mantuvieron en bioterio con ciclo luz-oscuridad artificial (L/O 16:8 h, la luz se encendía a las 6:00 am) a 20 ± 2°C. Se les proporcionó alimento* y agua *ad libitum*. Las conejas se anestesiaron con uretano** 1.5 g/kg, diluido al 20% en agua destilada.

*Purina Coneja Chow, México.

**Sigma Chemical, Estados Unidos de América.

The animals used in this research were treated and cared for in adherence of the Consejo Mexicano para el Cuidado y Uso de los Animales Experimentales (NOM NOM-062-ZOO-1999) and the NIH (National Institute of Health) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The experimental project was approved by the Comité de Ética del Cuidado de los Animales of the Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Gross anatomy

The iliococcygeus and pubococcygeus muscles were located based on a previous study.³ Dorsal and ventral aspects were analyzed using a stereoscopic microscope* which allowed observation of muscles to determine their anatomical characteristics (insertion site, length, width and wall thickness), and also the topographic relationship to adjacent structures and innervations. Digital photos of selected sites were taken.

Electrical stimulation

Muscular innervations were confirmed using electrical stimulation techniques. Nerve fibers traveling to the iliococcygeus and pubococcygeus muscles were dissected and sectioned. The caudal ends (below the cuts site) were mounted on bipolar silver chloride electrodes and stimulated through square wave pulses of 0.5-30 Hz, 0.2 ms and 0.2 μ V-2.5 V. Pulses were generated by a stimulator** connected to an isolation unit.*** Unilateral (always to the nerves on the right side) and bilateral stimulation was carried out. It was determined if during stimulation of the iliococcygeus and pubococcygeus a muscle contraction was induced, or if an excitatory response to the adjacent structures of such muscles was elicited.

Reflex electromyographic activity

Electromyograms

An incision of approximately 2 cm long was made at the dorsal region of the skin at the tail-base. Two Teflon-coated stainless steel electrodes 0.1 mm in diameter and insulated except for 1 mm at the tip (stripped of insulation), were inserted into the iliococcygeus and left pubococcygeus muscles. Electrical activity was amplified using a wideband preamplifier † connected to a polygraph.‡ Electromyographic activity was also monitored using an audio connected in parallel to the preamplifier. An electromyographic response was considered when the amplitude of basal activity was elevated not less than 30%.

Cuando fue necesario se administraron dosis adicionales.

Los animales se alojaron y trataron de acuerdo con los lineamientos del Consejo Mexicano para el Cuidado de los Animales (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999) y la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del National Institute of Health. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética del Cuidado de los Animales, de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Anatomía macroscópica

Los músculos iliococcígeo y pubococcígeo fueron localizados de acuerdo con un estudio previo.³ Se realizó análisis con vista dorsal y ventral; con microscopio estereoscópico* se observaron los músculos y se determinaron sus características anatómicas (inserción, longitud, anchura y grosor), sus relaciones topográficas con las estructuras adyacentes y su inervación. Se tomaron fotografías digitales.

Estimulación eléctrica

La inervación fue corroborada mediante la técnica de estimulación eléctrica. Se disecaron los nervios que se dirigieron a las fibras de los músculos iliococcígeo y pubococcígeo y se seccionaron. Se montaron las terminales caudales (abajo del corte) sobre electrodos bipolares de plata clorurada y se estimularon con pulsos cuadrados de 0.5-30 Hz, 0.2 ms y 0.2 μ V-2.5 V. Los pulsos fueron generados por un estimulador** conectado a una unidad de aislamiento.*** Se realizó estimulación unilateral (siempre a los nervios del lado derecho) y bilateral. Se determinó si durante la estimulación los músculos iliococcígeo y pubococcígeo se contraían, o si había movimiento de las estructuras adyacentes a ambos músculos.

Actividad electromiográfica refleja

Electromiogramas

Se realizó incisión de aproximadamente dos cm en la piel de la región dorsal de la base de la cola. En cada músculo (iliococcígeo y pubococcígeo izquierdo) se insertó un par de electrodos de acero inoxidable de 0.1 mm de diámetro y cubierto de teflón, excepto 1 mm en la punta. La actividad eléctrica fue amplificada con un preamplificador† de banda ancha que estaba conectado a un polígrafo.‡ La actividad

*Nikon SMZ-T2, Japón.

**Grass S48, Estados Unidos de América.

***Grass SIU-5, Estados Unidos de América.

†Grass 7P5, Estados Unidos de América.

‡Grass 79E, Estados Unidos de América.

Mechanical stimulation

Perigenital skin and clitoris

A swab was used to stimulate inguinal, perivaginal and perineum skin (between the anus and opening of the vagina) and the skin covering the perianal vagina. Clitoral stimulus was directly achieved with a swab by gentle pressure on the ventral wall of the perineal vagina.

Vaginocervical tract

The vaginal tract was stimulated using a glass rod 0.5 cm in diameter coated with mineral oil. This cylinder was inserted deep into the vaginal body until the desired region was reached (perineal, pelvic, abdominal and cervix) and then removed (Figure 1).

The stimulation type and the level site of the vaginal tract were randomly chosen for each doe. In addition, cutaneous and vaginal stimuli were applied at least in two sequential repetitions. The electrodes were implanted into the muscles 10-min prior to the stimulus. Recordings of the basal (before a stimulus was applied) and induced (during stimulation and two to five min after withdrawn) EMG activity were performed. The interval between one stimulus and other was two to three min when no post-stimulation response was observed. If a muscle responded with an afterdischarge, a waiting time of five to ten min was allowed after ceased.

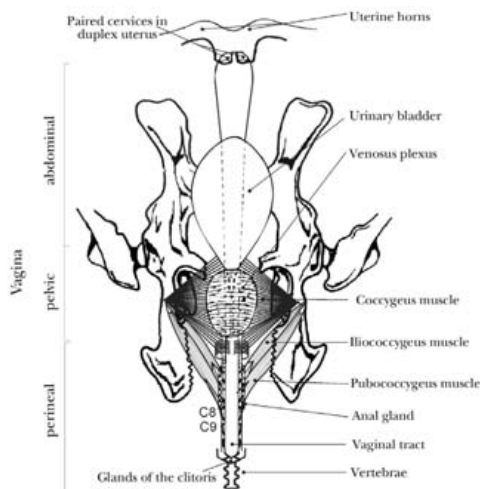


Figura 1. Vista ventral del aparato urogenital de una coneja adulta. Se indican las regiones en las que se dividió la vagina para su estimulación. Parte del hueso pélvico fue removido para mostrar los músculos del piso pélvico.

Figure 1. Ventral view of the vaginal tract of an adult female rabbit showing the different regions into which the vagina was divided for stimulation. Note that part of the pelvic bone was removed in order to show the pelvic floor muscles.

electromiográfica también se detectó mediante el audio conectado en paralelo con el preamplificador. Se consideró como una respuesta electromiográfica cuando la amplitud de la actividad basal se incrementó al menos en 30%.

Estimulación mecánica

Piel perigenital y clitoris

Con un hisopo de algodón se estimuló la piel inguinal, la piel perivaginal, la piel perineal (entre el orificio vaginal y el ano) y la piel que cubre a la vagina perineal. El clitoris fue estimulado directamente con el hisopo y a través de la presión de la pared ventral de la vagina perineal.

Tracto vaginocervical

Se uso un émbolo de vidrio de 0.5 cm de diámetro cubierto con aceite mineral para estimular al tracto vaginal. Se introdujo el émbolo en el tracto vaginal hasta alcanzar el nivel deseado (perineal, pélvica, abdominal y cérvix) (Figura 1) y se retiró.

En cada coneja se eligió de forma aleatoria el tipo de estimulación y el nivel del tracto vaginal a estimular. Además, se realizaron al menos dos repeticiones de la estimulación cutánea y la vaginal. Los electrodos fueron insertados en los músculos diez minutos antes de iniciar la estimulación. Se grabó la actividad electromiográfica basal (antes de aplicar el estímulo) y la inducida (durante la estimulación y dos a cinco minutos después de que se retiró). El intervalo entre un estímulo y otro fue de dos a tres minutos cuando no hubo respuesta post-estimulación. Si el músculo respondió con posdescarga, se esperó de cinco a diez min después de que ésta cesara.

Resultados

Los resultados aquí descritos fueron consistentes entre los animales.

Anatomía macroscópica

Los músculos iliococcígeo y pubococcígeo son bilaterales. Se originaron en la espina ciática del hueso iliaco y se insertaron en las vértebras coccígeas. Se encontraron adyacentes al aparato urogenital, al recto y a la glándula anal; sin embargo, sus fibras no se unieron a las vísceras pélvicas.

Músculo iliococcígeo

Este músculo no se pudo observar desde una vista

Results

The results were consistent among the studied animals.

Gross anatomy

The iliococcygeus and the pubococcygeus muscles are bilateral. They originated at the ischiadic spine of the ileum bone and are inserted onto coccygeal vertebrae. They were found adjacent to the urogenital tract, rectus and anal glands. However, their muscular fibers were not attached to pelvic viscera.

Iliococcygeus muscle

From a dorsal view this muscle could not be seen (Figure 2A). When examined ventrally it was located

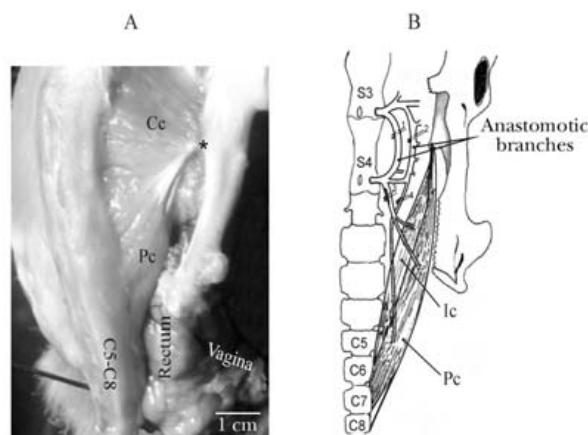


Figura 2. Anatomía e innervación de los músculos iliococcygeo y pubococcygeo en la coneja. En ambas figuras (A y B) se observa el origen del músculo pubococcygeo en la espina ciática (*) y la dirección de sus fibras. Estas discurren dorsolateral y caudal al recto y a la vagina para insertarse en las vértebras C5-C8. El iliococcygeo se localiza ventral al pubococcygeo y por eso no se ve en la vista dorsal (A). El recto y la vagina han sido desplazados ligeramente para mejor visión. En B se muestra una vista ventral de la cavidad pélvica y la innervación. Las líneas punteadas y los números indican los nervios donde se colocaron los electrodos para la estimulación eléctrica. Con el propósito de obtener una mejor visualización de los nervios, otras ramas del sacro 3 y sacro 4 (S3, S4) han sido omitidas. Cc = coccygeus, Pc = pubococcygeo, Ic = iliococcygeo.

Figure 2. Anatomy and innervation of the iliococcygeus and the pubococcygeus muscles. The origin of the pubococcygeus muscle at the ischiadic spine and fiber direction can be seen in both figures (A and B). These muscles run dorsolaterally and caudal to the rectus and vagina to be inserted onto vertebrae C5-C8. The iliococcygeus is ventrally located to the pubococcygeus muscle and therefore is not visible under a dorsal view (A). The rectum and vagina have been slightly displaced to improve vision. Figure B shows a ventral view of the pelvic cavity and its innervations. The dotted lines and its numbers indicate the nerves where electrodes were inserted for electric stimulation. For better visualization of the relevant nerves, sacral branches 3 and 4 (S3, S4) have been omitted. Cc = coccygeus, Pc = pubococcygeus, Ic = Iliococcygeus.

dorsal (Figura 2A). Con vista ventral fue localizado ventrolateral al músculo coccígeo y al músculo pubococcígeo, dorsolateral al recto, caudal a la porción de la vagina pélvica y al plexo venoso y rostral a la porción de la vagina perineal (Figura 2). Las fibras del iliococcígeo emergen en la espina ciática del hueso iliaco (Figura 2A). Estas fibras discurrieron caudalmente y se insertaron mediante dos largos tendones (12 ± 2.2 mm) en las vértebras coccígeas 5 y 6 (C5, C6) (Figura 2B). El músculo iliococcígeo midió, en promedio, 35 ± 0.5 mm de longitud, 2.5 ± 0.8 mm de ancho y 26 ± 0.5 mm de grosor.

Músculo pubococcígeo

El pubococcígeo tiene forma de huso. Se localizó caudal al músculo coccígeo y dorsolateral al iliococcígeo. Se originó en un tendón adosado a la espina ciática del hueso iliaco (Figura 2A). Sus fibras presentaron orientación dorsocaudal y alrededor de 80% de sus fibras se insertaron directamente, sin apariencia tendinosa, en las vértebras coccígeas 6 y 7 (C6, C7); el resto de las fibras se mezcló con un tendón que se inserta en la vértebra coccígea 8 (C8). No hubo tejido conjuntivo que separara las fibras del músculo pubococcígeo de las del coccígeo, pero sí entre el pubococcígeo y el iliococcígeo (Figura 2A). La longitud promedio de este músculo fue de 43 ± 1.8 mm de longitud, 5 ± 1.1 mm de ancho y 26 ± 0.9 mm de grosor.

Inervación de los músculos iliococcígeo y pubococcígeo

Con la anatomía macroscópica se observó que los nervios que se distribuyen en los músculos del piso pélvico emergen de los nervios espinales sacros 3 (S3) y 4 (S4) (Figura 2B). Estos nervios espinales son complejos y de ellos emergen varios nervios que se dirigen a otras estructuras pélvicas, como vísceras. Dos ramas del nervio espinal S3 (1 y 2 en la Figura 2B) se anastomosan con ramas del nervio espinal S4. De estas ramas anastomóticas surgen los nervios enumerados como 3 y 4 en la Figura 2B. El nervio 3 se bifurcó y sus ramas discurrieron caudalmente y se distribuyeron en las fibras de los dos músculos, iliococcígeo y pubococcígeo. El nervio 4 se dirigió a la porción caudal de las fibras del pubococcígeo (Figura 2B).

Estimulación eléctrica unilateral

La estimulación de los nervios que surgen de S3 y S4 que se dirigen a vísceras pélvicas no causó contracción muscular en el iliococcígeo ni en el pubococcígeo. La estimulación de los nervios que surgen de S3 y S4 que

ventrolateral to the coccygeus and pubococcygeus muscles, running dorsolaterally to the rectum and caudally to the perineal vagina and the venous plexus, rostral to the perineal vagina (Figure 2). The iliococcygeal fibers originate at the ischiadic spine of the ileum bone (Figure 2A). These fibres run caudally and are inserted onto the 5th and 6th coccygeal vertebrae (C5, C6), by means of two large tendons (12 ± 2.2 mm) (Figure 2B). On average, the iliococcygeus muscle measured 35 ± 0.5 mm long, 2.5 ± 0.8 mm wide and 26 ± 0.5 mm thick.

Pubococcygeus muscle

The pubococcygeus has a spindle-shaped form and is found running caudally to the coccygeus and dorsodolateral to the iliococcygeus muscle. It originates from a tendon attached to the ischiadic spine of the ileum bone (Figure 2A). Its fibers displayed a dorsocaudal orientation and nearly 80% of them are inserted directly without tendinous support onto coccygeal vertebrae 6th and 7th (C6, C7); the rest of its fibers fused into a tendon inserted onto the coccygeal vertebra 8th (C8). There was no connective tissue which isolated fibers among the pubococcygeus and the coccygeus muscles, but it was apparent between the pubococcygeus and iliococcygeus muscles (Figure 2A). The average length of this muscle was 43 ± 1.8 mm long, 5 ± 1.1 mm wide and 26 ± 0.9 mm thick.

Innervation of the pubococcygeus and iliococcygeus muscles

Gross anatomy allowed us to observe that the innervation of the pelvic floor muscles originate at the sacral nerves, such as sacral 3 (S3) and sacral 4 (S4) (Figure 2B). These spinal nerves are complex and spread out in several branches running into other pelvic structures, such as viscera. Two branches of the spinal nerve S3 (1 and 2 in Figure 2B) anastomoses with branches of spinal nerve S4. From these anastomotic connections, nerves enumerated as 3 and 4 in Figure 2B emerge. Nerve 3 bifurcates and its branches run caudally and are further divided into fibres of the two muscles, iliococcygeus and pubococcygeus. Nerve 4 runs caudally into the fibres of the pubococcygeus (Figure 2B).

Unilateral electrical stimulation

The stimulation of nerves that arise from S3 and S4 running into the pelvic viscera failed to elicit a muscular contraction, for neither the iliococcygeus nor the pubococcygeus muscles. The effect of the independent stimulation of each anastomotic branch

se dirigen a visceras pelvicas no causó contracción muscular en el iliococcygeus ni en el pubococcygeus. La estimulación eléctrica independiente de cada rama anastomótica o de los nervios que emergen de S3 (1 y 2 en la Figura 2B) produjo contracción de los músculos pubococcygeus y coccygeus. La estimulación eléctrica del nervio 3 (Figura 2B), que emerge de S4, ocasionó la contracción de las fibras del pubococcygeus y las del iliococcygeus. La estimulación eléctrica del nervio 4 (Figura 2B), que emerge de la rama anastomótica 2, causó contracción del músculo pubococcygeus. En todos los casos los músculos que respondieron fueron los del lado ipsilateral al nervio estimulado. La estimulación de la porción caudal de los nervios 3 y 4 (Figura 2B) produjo ligero movimiento de abducción de la cola.

Cuando se realizó estimulación bilateral de los nervios que inervan a los músculos iliococcygeus y pubococcygeus (3 y 4 en la Figura 2) se observó que la cola se elevó cerca de un cm y se mantuvo rígida sobre la línea media.

Actividad refleja EMG

Las Figuras 3, 4 y 5 muestran ejemplos de los registros típicos obtenidos.

Estimulación de la piel perigenital y del clítoris

La estimulación mecánica de la piel de la vagina perineal, de la región inguinal y de la base de la cola no produjo respuesta electromiográfica ni en el iliococcygeus ni en el pubococcygeus. La estimulación de la piel perivaginal y la del clítoris provocó potenciales de acción en ambos músculos (Figura 3). La respuesta fue tónica y dependió de la duración del estímulo. En la Figura 3 se muestra un registro obtenido en el músculo iliococcygeus durante la estimulación del clítoris; fue similar el electromiograma registrado en el pubococcygeus durante la estimulación clitoral.

Estimulación vaginocervical

La estimulación genital indujo respuestas fásicas, tónicas y posdescargas en los músculos, iliococcygeus y pubococcygeus. La respuesta electromiográfica dependió de la región del tracto vaginal que se estimuló.

En el músculo iliococcygeus se presentaron potenciales de acción de gran amplitud y de corta duración cuando se estimuló la vagina perineal y pélvica. Cuando la estimulación cesó, al retirar el émbolo, la actividad permaneció durante tres segundos (Figura 4). Sólo al introducir el émbolo hasta la vagina abdominal o al

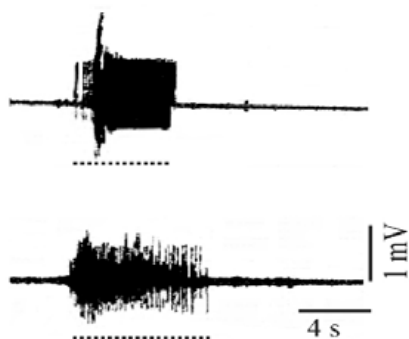


Figura 3. Actividad electromiográfica refleja del músculo iliococcígeo en la coneja como respuesta a la estimulación del clítoris. Se muestran registros electromiográficos del polígrafo. Esta respuesta corresponde a la duración del estímulo (línea punteada).

Figure 3. Reflex EMG activity of the iliococcygeus muscle in a female rabbit in response to clitoris stimulation. Polygraph recordings of EMGs are shown. This response corresponds to stimulus duration (dotted line).

or of the nerves 3 and 4 was as following: the electrical stimulation of the anastomotic branches emerging from S3 (1 and 2 in Figure 2B) was followed by a contraction of the pubococcygeus and coccygeus muscles. The stimulation of nerves that arise from S3 and S4 running into the pelvic viscera failed to elicit a muscular contraction, for neither the iliococcygeus nor the pubococcygeus muscles. The independent stimulation of each anastomotic branch or of the nerves emerging from S3 (1 and 2 in Figure 2B) was followed by a contraction of the pubococcygeus and coccygeus muscles. The electrical stimulation of nerve 4 (Figure 2B) emerging from anastomotic branch 2, provoked a contraction of the pubococcygeus muscle. In all cases, ipsilateral muscle response was observed on the side of the nerve being stimulated. Stimulation of the caudal segment of nerves 3 and 4 (Figure 2B), induced a slight abduction–tail movement.

A bilateral stimulus to nerves innervating the iliococcygeus and the pubococcygeus muscles (3 and 4 in Figure 2) induced tail elevation of nearly one cm along with rigidity displayed over the midline.

Reflex electromyographic activity

Figures 3, 4 and 5 are examples of the typical recordings obtained.

Perigenital skin and clitoral stimulation

Mechanical stimulation of the skin surrounding the perineal vagina, inguinal region and the tail-base failed to induce an electromyographic response neither

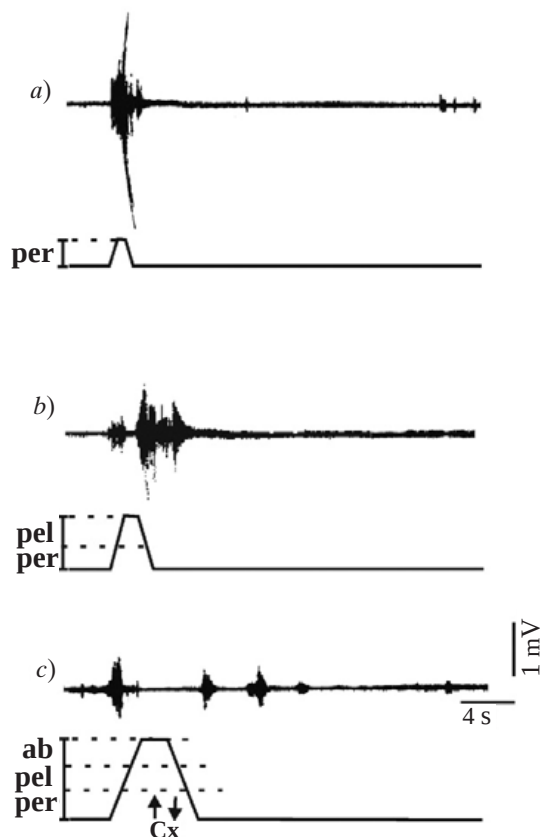


Figura 4. Actividad electromiográfica refleja del músculo iliococcígeo en coneja, como respuesta a la estimulación del tracto vaginal con un émbolo. Los registros, realizados en un polígrafo, se tomaron antes, durante y después de la estimulación de las tres regiones vaginales: a) perineal, b) pélvica y c) abdominal. También se tocó el cérvix (Cx). Las líneas debajo de cada registro representan el tipo de estimulación. La línea inclinada representa la introducción del émbolo; la meseta, cuando el émbolo alcanzó el nivel de la vagina (per = perineal, pel = pélvico, ab = abdominal); y la línea descendente, cuando se retiró el émbolo. El músculo presenta una posdescarga tras retirar el émbolo.

Figure 4. Reflex EMG activity of the iliococcygeus muscle in a female rabbit in response to stimulation of the vaginal tract with a glass rod. The recordings performed on a polygraph before, during and after vaginal stimulation was applied to three levels of the vagina: a) perineal, b) pelvic and c) abdominal. The cervix was also touched (Cx). The dotted lines shown below each EMG represents the type of stimulation. The sloping line represents when the rod was introduced, while the plateau when the rod reached the vaginal level (per = perineal, pel = pelvic, ab = abdominal); and the descending line as the rod was being withdrawn. The muscle presented an afterdischarge following the removal of the glass rod.

cérvix, los músculos iliococcígeo y pubococcígeo se activaron, pero no al retirarlo (Figura 4). Después de la estimulación se presentó un tren de potenciales de acción de larga duración (Figura 4).

Cuando se registró la actividad del músculo pubococcígeo se observó que el patrón de la respuesta a la estimulación vaginocervical fue similar a la descrita para el músculo iliococcígeo. Sin embargo, al retirar

for the iliococcygeus or the pubococcygeus muscles. Stimulation of the perivaginal skin and clitoris induced action potentials in both muscles (Figure 3). The response was characterized as tonic corresponding to the duration of the stimulus. Figure 3 shows a recording of the iliococcygeus muscle during clitoral stimulation; this was similar to the electromyogram recorded for the pubococcygeus muscles during identical stimulation.

Vagino-cervical stimulation

Genital stimulation induced phasic, tonic and afterdischarge responses of the iliococcygeus and the pubococcygeus muscles. Electromyographic response depended on the vaginal level being stimulated.

When the perineal and pelvic vagina was stimulated, action potentials of high amplitude and short duration were obtained in the iliococcygeus muscle. When the stimulus ceased, and as the rod was being withdrawn activity prevailed for three seconds (Figure 4). When the abdominal vaginal and cervix was reached with the rod, activation of the iliococcygeus and the pubococcygeus muscles occurred only when the rod was being inserted; no response occurred while withdrawing the rod (Figure 4). After such stimulation a train of action potentials of large duration occurred (Figure 4).

When the activity of the pubococcygeus muscle was recorded, it was observed that the patterns of response after vagino-cervical stimulation were similar as those being described for the iliococcygeus muscle. Nevertheless, when the rod was withdrawn after cervical stimulation, a tonic afterdischarge of higher amplitude and longer duration (around three-four-min) occurred, than that recorded for the iliococcygeus muscle (Figure 5).

Discussion

The results of this study describe, for the first time, the reflex EMG activity of the iliococcygeus and pubococcygeus muscles of female rabbits in response to stimulation of the genital tract, extending the limited descriptions contained in text books and anatomical atlas on the subject of the characteristics and innervations of such muscles.^{12,13}

Similar to descriptions for other species, including humans,¹⁴⁻¹⁸ the iliococcygeus and pubococcygeus muscles of female rabbits form the *levator ani* muscles. Similarities and differences between these muscles and other species exists; for example, in human beings the *levator ani* is a muscular complex formed by the iliococcygeus, pubococcygeus and puborectal muscles,¹⁹ and their fibers are bound together in a

el émbolo, después de estimular el cérvix, se presentó una posdescarga tónica de mayor amplitud y duración (alrededor de tres a cuatro min) que la que sucedió en el músculo iliococcígeo (Figura 5).

Discusión

Los resultados de este estudio describen por primera vez la actividad EMG refleja de los músculos iliococcígeo y pubococcígeo de la coneja en respuesta a la estimulación del tracto genital y amplían las escasas descripciones en los libros de texto y atlas sobre las características anatómicas de estos músculos y su inervación.^{12,13}

Consistente con las descripciones en otras especies, incluyendo los seres humanos,¹⁴⁻¹⁸ los músculos iliococcígeo y pubococcígeo de la coneja

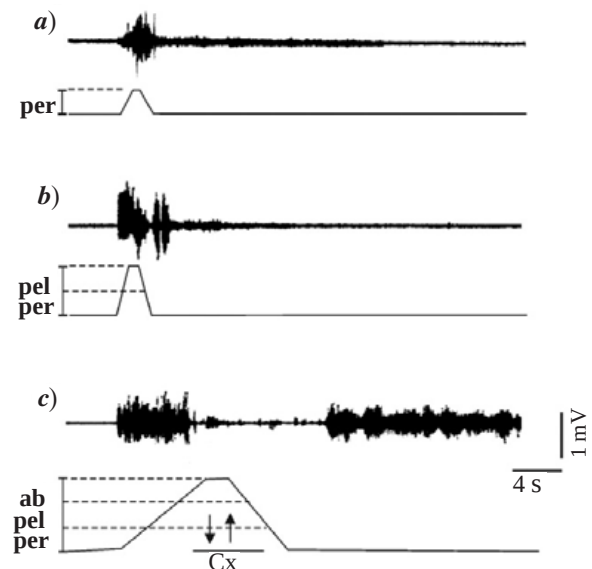


Figura 5. Actividad electromiográfica refleja del músculo pubococígeo en la coneja, como respuesta a la estimulación del tracto vaginal con un émbolo. Los registros, realizados en un polígrafo, se tomaron antes, durante y después de la estimulación de las tres regiones vaginales: a) perineal, b) pélvica y c) abdominal. También se tocó el cérvix (Cx). Las líneas debajo de cada registro representan el tipo de estimulación. La línea inclinada representa la introducción del émbolo, la meseta cuando el émbolo alcanzó el nivel de la vagina (per = perineal, pel = pélvico, ab = abdominal) y la línea descendente cuando se retiró el émbolo. El músculo presenta una posdescarga tras retirar el émbolo.

Figure 5. Reflex EMG activity of the pubococcygeus muscle in a female rabbit in response to stimulation of the vaginal tract with a glass rod. The recordings performed on a polygraph before, during and after vaginal stimulation was applied to three levels of the vagina: a) perineal, b) pelvic and c) abdominal. The cervix was also touched (Cx). The dotted lines shown below each EMG represent the type of stimulation. The sloping line represents when the rod was introduced, while the plateau when the rod reached the vaginal level (per = perineal, pel = pelvic, ab = abdominal); and the descending line as the rod was being withdrawn. The muscle presented an afterdischarge following the removal of the glass rod.

close anatomical relationship making it difficult to define their limits.¹⁹ In addition, the pubococcygeus fibers adhere to the vaginal wall, while fibers of the puborectal muscle are attached to the rectus and anus. Therefore, some researchers call these fibers pubovisceral muscles.⁶ The findings obtained in this study showed that although the pelvic floor muscles of female rabbits are formed by the coccygeus and *levator ani* muscles, the later does not have the fibers adhered to the vaginal wall nor the rectum. Consequently, in rabbits no puborectal muscle exist and the pubococcygeus muscle has no direct relationship with the urogenital viscera. Species like the rat (*Rattus norvegicus*) and squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) neither posses a puborrectal muscle, but the pubococcygeus fibers adhered to the vagina.^{4,17,20}

It has been suggested that in human beings the main function of the pelvic floor is to support the pelvic viscera and maintain urinary continence. A damage of the pelvic floor results in fecal and urinary incontinence, a common dysfunction seen in women.^{7,8,18,21} Under such context, the absence of a direct relationship between the *levator ani* muscle and the rabbit viscera can be a disadvantage. Nevertheless, the urogenital function in rabbits does not appear to be deficient. They are capable not only to maintain urinary continence, but in addition regulate both, the amount of urine expelled and its direction. It is possible that other striated muscles adjacent to the urogenital tract, like the internal obturator and the vulvar constrictor contribute to regulate these functions.

Regarding the innervation of the iliococcygeus and the pubococcygeus muscles of the female rabbit, these findings constitute the first corroborating study using electrophysiological methods. In a previous report it was described that innervation of both muscles originates from spinal nerve S3,³ data corroborated and enhanced in this work. It is considered that S3 and S4 emerge from the foramen arising from the sacral plexus, from which innervation of some pubococcygeus muscle fibers arises (4 in Figure 2B), then the nerve emerging from S4 (3 in Figure 2B) innervates both muscles: the iliococcygeus and the pubococcygeus. Such innervation pattern is also observed in human beings, since the *levator ani* is innervated by two branches, one arising from S3 to S5 and the pudendal nerve.^{22,23} In rats and squirrel monkeys innervation of the *levator ani* proceeds more rostrally, from L6-S1 and S2^{4,14,17} for which the female rabbit presents a nervous organization similar to the human counterpart, more similar that the rat, considered one of the most used laboratory animal.

The nervous circuits operate the activation of spinal and supraspinal reflexes regulating reproductive and non-reproductive processes in the functions of

forman el músculo elevador del ano. Hay similitudes y diferencias de esta musculatura con las de otras especies; por ejemplo, en los seres humanos el elevador del ano es un complejo muscular formado por los músculos iliococcígeo, pubococcígeo y puborrectal,¹⁹ las fibras de éstos se encuentran en estrecha relación anatómica y es difícil definir sus límites;¹⁹ además, las fibras del pubococcígeo se adhieren a la pared vaginal, y las del puborrectal al recto y ano. Por esta razón, algunos investigadores llaman a estas fibras músculos puboviscerales.⁶ Los resultados aquí obtenidos muestran que a pesar de que el piso pélvico de la coneja también está formado por los músculos coccígeo y el elevador del ano, este último no tiene fibras adheridas a la pared vaginal ni al recto. Por tanto, en conejos no existe el músculo puborrectal, y el pubococcígeo no tiene relación directa con las vísceras urogenitales. Especies como la rata y el mono ardilla tampoco tienen el músculo puborrectal, pero las fibras del pubococcígeo sí se adhieren a la vagina.^{4,17,20}

En el ser humano se sugiere que la principal función del piso pélvico consiste en sostener las vísceras pélvicas, así como mantener la continencia urinaria. El daño del piso pélvico produce incontinencia urinaria y fecal, lo cual constituye una disfunción muy común en la mujer.^{7,8,18,21} En este contexto, la ausencia de relación directa de las fibras del elevador del ano con las vísceras en la coneja puede ser una desventaja. Sin embargo, la función urogenital de las conejas no parece ser deficiente. No sólo son capaces de mantener la continencia urinaria, sino que también regulan la cantidad de orina expulsada y la dirección de ésta. Es posible que otros músculos estriados adyacentes al tracto urogenital, como el obturador interno y el constrictor vulvar, contribuyan a la regulación de estas funciones.

Respecto de la innervación de los músculos iliococcígeo y pubococcígeo en la coneja, este es el primer estudio que la corrobora mediante el uso de métodos electrofisiológicos. En un estudio previo se describió que la innervación de los dos músculos proviene de S3,³ dicha información se corrobora y amplía con este trabajo. Si bien del foramen S3 y S4 surge el plexo sacro, del cual emerge la innervación (4 en la Figura 2B) de algunas fibras del pubococcígeo, el nervio que emerge de S4 (3 en la Figura 2B) inerva a ambos músculos: iliococcígeo y pubococcígeo. Este patrón de innervación también se observa en los seres humanos, pues el músculo elevador del ano está innervado por dos nervios, uno que surge de S3 a S5 y el nervio pudendo.^{22,23} En ratas y monos ardilla la innervación del elevador del ano emerge más rostral, desde L6-S1 y S2,^{4,14,17} por lo que la coneja presenta organización nerviosa similar a la de los seres humanos, más parecida que la de la rata, el animal más utilizado en el laboratorio.

the pelvic organs. This study shows that mechanical stimulation of the vaginal skin, pelvic and perineal vagina induces a reflex electromyographic response of the iliococcygeus and the pubococcygeus muscles. Nevertheless, stimulation of the abdominal vagina and cervix not only failed to activate the two muscles, but also induced a temporal inhibitory effect. The nervous circuits underlying these viscerosomatic reflexes are unknown. Certain anatomical studies show that the uterus, cervix, and vagina are innervated by afferent fibers in the hypogastric and pelvic nerves.^{18,24} It is postulated that perhaps these nerves have afferent axons eliciting an electromyographic response of the iliococcygeus and the pubococcygeus muscles, after the vaginal canal is manually stimulated. The efferent via of such reflex would be the motor nerves being described (3 and 4 in Figure 2B).

Vaginal stimulation generates a wide array of effects, such as: neuroendocrine reflexes leading to the release of prolactin and oxytocin hormones,²⁵⁻²⁸ activation of the autonomic nervous system that increases heart rate and blood pressure,²⁹ immobilization and inhibition of the withdrawal reflex to nociceptive stimuli,³⁰⁻³⁴ viscerovisceral reflexes that increase urethral pressure and diminish intravesical pressure,^{35,36} and visceromotor reflexes referred here and also described in rats and human beings.^{14,37-40} These findings support the thought that the function of the pelvic floor muscles is not just of a supportive nature, since it also regulates visceral activity. It has been described that electric stimulation of the pelvic floor muscles inhibited involuntary contractions of the detrusor muscle of the bladder, and could control urgent urinary incontinence.⁴¹ Recent studies maintain the idea that in the female rabbit pelvic muscles such as the pubococcygeus contributes to regulate micturition.⁴²

In the female rabbit the function of electromyographic activity of the iliococcygeus and the pubococcygeus muscles, in response to stimulation of genital structures is unknown, but the fact that these muscles were activated during vaginal stimulation applied with a glass rod, strongly suggest that such response could also be elicited during the coitus, when the buck inserts its penis into the vagina. The muscular contracture of these muscles could raise intra-vaginal pressure, increasing thus the stimulus received by the penis to facilitate ejaculation. In this context, it has been postulated that in women both pelvic muscles and nerves are damaged during childbirth, leading to a post-partum urinary incontinence.⁷ However, there are no available animal studies to determine if the characteristic response of the iliococcygeus and the pubococcygeus muscles vary between nulliparous and multiparous female rabbits after vaginal stimulation.

In the present study, electrical stimulation

Los circuitos nerviosos permiten la activación de reflejos espinales y supraespinales que regulan los procesos reproductivos y no reproductivos de las funciones de los órganos pélvicos. Este estudio muestra que la estimulación mecánica de la piel de la vagina y la vagina pélvica y perineal produce actividad electromiográfica refleja de los músculos iliococcígeo y pubococcígeo. Sin embargo, la estimulación de la vagina abdominal y cérvix no sólo no activó los músculos, sino que los inhibió temporalmente. Los circuitos nerviosos que subyacen a estos reflejos viscerosomáticos son desconocidos. Estudios anatómicos muestran que la inervación de la vagina surge de los nervios hipogástrico y pélvico.^{18,24} Tal vez estos nervios tengan axones aferentes que desencadenan la actividad electromiográfica de los músculos iliococcígeo y pubococcígeo cuando se estimula mecánicamente el tracto vaginal. La vía eferente de este reflejo sería a través de los nervios motores aquí descritos (3 y 4 en la Figura 2B).

La estimulación vaginal genera una amplia gama de efectos, como los reflejos neuroendocrinos que liberan prolactina y oxitocina;²⁵⁻²⁸ la activación del sistema nervioso autónomo, que aumentan la frecuencia cardíaca y presión arterial,²⁹ la inmovilización y la inhibición de los reflejos de retirada al estímulo nociceptivo;³⁰⁻³⁴ los reflejos visceroviscerales, que aumentan la presión uretral y disminuyen la presión vesical;^{35,36} y el reflejo visceromotor aquí referido, que también ha sido descrito en ratas y seres humanos.^{14,37-40} Estos hallazgos apoyan la idea de que la función de los músculos del piso pélvico no sólo es de soporte sino también regula la actividad visceral. Se ha descrito que la estimulación eléctrica de los músculos del piso pélvico inhibe las contracciones involuntarias del detrusor y podría controlar la incontinencia urinaria por urgencia.⁴¹ Estudios recientes apoyan la idea de que, en la coneja, los músculos pélvicos, como el pubococcígeo, contribuyen a la regulación de la micción.⁴²

En la coneja, la función de la actividad electromiográfica de los músculos iliococcígeo y pubococcígeo causada por la estimulación de las estructuras genitales es desconocida, pero el hecho de que estos músculos pélvicos se hayan activado durante la estimulación vaginal aplicada con el émbolo sugiere que también podrían activarse durante la cópula, cuando el macho inserta el pene en la vagina. La contracción de estos músculos podría incrementar la presión intravaginal, aumentando la estimulación que recibe el pene y facilitando así la eyaculación. En este contexto, se ha propuesto que en mujeres los músculos pélvicos y sus nervios se dañan durante los partos vaginales, lo que induce incontinencia urinaria posparto.⁷ Sin embargo, no hay estudios en modelos

provoked tail-wagging. Vaginal stimulation during the coitus could induce elevation of the tail to allow penile intromission. In addition, the fact that the iliococcygeus and the pubococcygeus muscles lack any direct anatomical relationship with the viscera, that does not exclude the possibility that if contracted, an increase of intravaginal and intraurethral pressure might occur contributing to urinary continence, penile stimulation during coitus and to kits expulsion during parturition.

Acknowledgments

Special thanks to Conacyt (40081 YC; 105882 MMG ; 191915-DC), PAPIIT UNAM (228110 MMG) and the Universidad Autonoma de Tlaxcala (UATX-191) for financial support. As well as to Isela Hernandez, German Mendoza y Laura Garcia for excellent technical assistance.

Referencias

- HUDSON R, CRUZ Y, LUCIO RA, NINOMIYA J, MARTINEZ-GOMEZ M. Temporal and behavioral patterning of parturition in rabbits and rats. *Physiol Behav* 1999; 66:599-604.
- BELL DJ. Social olfaction in lagomorphs. *Sym Zool Soc Lond* 1980; 45:141-164.
- MARTINEZ-GOMEZ M, LUCIO RA, CARRO M, PACHECO P, HUDSON R. Striated muscles and scent glands associated with the vaginal tract of the rabbit. *Anat Rec* 1997; 247:486-493.
- CRUZ Y, ZEMPOALTECA R, LUCIO RA, PACHECO P, HUDSON R, MARTINEZ-GOMEZ M. Pattern of sensory innervation of the perineal skin in the female rat. *Brain Res* 2004; 1024:97-103.
- GRABER B, KLINE-GRABER G. Female orgasm: role of the pubococcygeus. *J Clin Psychiatry* 1979; 40:34-39.
- DELANCEY JO, KEARNEY R, CHOU O, SPEIGHTS S, BINNO S. The appearance of levator ani muscle abnormalities in magnetic resonance images after vaginal delivery. *Obstet Gynecol* 2003; 100:46-53.
- SMITH B RA, HOSKER LG, WARREL WD. The role of pudendal nerve damage in the etiology of genuine stress incontinence in women. *Br J Obs Gynecol* 1989; 96:29-32.
- MCMURRAY G, CASEY HJ, NAYLOR AM. Animal models in urological disease and sexual dysfunction. *J Sex Med* 2008; 5:1088-1096.
- GONZALEZ-MARISCAL G, CUAMATZIE, ROSENBLATT JS. Hormones and external factors: are they "on/off" signals for maternal nest-building in rabbits? *Horm Behav* 1998; 33:1-8.
- ANGULO J, CUEVAS P, CUEVAS B, SANDEEP G, SAENZ DE TEJADA I. Mechanisms for the inhibition of genital vascular responses by antidepressants in a female rabbit model. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310:141-149.

animales para determinar si las características de la respuesta de los músculos iliococcígeo y pubococcígeo a la estimulación vaginal difiere entre hembras nulíparas y multíparas.

En el presente estudio la estimulación eléctrica produjo movimientos de la cola. La estimulación vaginal durante el apareamiento podría inducir la elevación de la cola y así permitir la inserción peneana. Además, el hecho de que los músculos iliococcígeo y pubococcígeo no tengan relación anatómica directa con las vísceras no excluye la posibilidad de que su contracción aumente la presión intravaginal e intrauretral, contribuyendo a la continencia urinaria, a la estimulación del pene durante el apareamiento y a la expulsión de las crías durante el parto.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (proyectos Conacyt 40081 YC y 105882 MMG ; beca 191915-DC), PAPIIT UNAM (228110 MMG) y de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATX-191); asimismo, a Isela Hernández, Germán Mendoza y Laura García, por su excelente asistencia técnica.

- MYUNG SC, LEE SY, YUM SH, PARK SH, KIM SC. Contractile changes of the clitoral cavernous smooth muscle in female rabbits with experimentally induced overactive bladder. *J Sex Med* 2008; 5:1088-1096.
- BARONE R, PAVAUX C, BLIN PC, CUQ P. Atlas of rabbit anatomy. Paris: Masson et Cie, 1973:1-203.
- POPESKO P, RAIJTOVÁ V, HORÁK J. A color atlas of the anatomy of small laboratory animals. London: Wolfe Publishing Ltd., 1979:115-123.
- PACHECO P, MARTINEZ-GOMEZ M, WHIPPLE B, BEYER C, KOMISARUK BR. Somato-motor components of the pelvic and pudendal nerves of the female rat. *Brain Res* 1989; 490:85-94.
- DUBROSVKY B, FILIPINI D. Neurobiological aspects of the pelvic floor muscles involved in defecation. *Neurosci Biobehav Rev* 1990; 14:157-168.
- SHAFIK A. Levator ani muscle: new physioanatomical aspects and role in the micturition mechanism. *World J Urol* 1999; 17:266-73.
- PIERCE LM, REYES M, THOR KB, DOLBER PC, BREMER RE, KUEHL TJ *et al.* Innervation of the levator ani muscles in the female squirrel monkey. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188:1141-1147.
- LIEN KC, MONEY B, DELANCEY JOL, ASHTON-MILLER JA. *Levator ani* muscle stretch induced by simulated vaginal birth. *Am Coll Obs Gynecol* 2004; 103:31-40.
- BARBER MD, BREMER RE, THOR KB, DOLBER PC, KUEHL TJ, COATES KW. Innervation of the female levator ani muscles. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187:64-71.
- BREMER RE, BARBER MD, COATES KW, DOLBER PC, THOR KB. Innervation of the levator ani and

- coccygeus muscles of the female rat. *Anat Rec* 2003; 275:1031-1041.
21. KLUTKE CG, SIEGEL CL. Functional female pelvic anatomy. *Urol Clin North Am* 1995; 22:487-498.
 22. SNOOKS SJ, SWASH M. The innervation of the muscles of continence. *Ann R Coll Surg Engl* 1986; 68:45-49.
 23. WALL LL. The muscles of the pelvic floor. *Clin Obstet Gynecol* 1993; 36:910-925.
 24. BOWER EA. The activity of post-ganglionic sympathetic nerves to the uterus of the rabbit. *J Physiol* 1966; 183 (3):748-767.
 25. FERGUSON J KW. A study of the motility of the intact uterus at term. *Surg Gynecol Obstet* 1941; 73:359-366.
 26. MOOS F, RICHAR P. Level of oxytocin release induced by vaginal dilatation (Ferguson reflex) and vagal stimulation (vago-pituitary reflex) in lactating rats. *J Physiol* 1975; 70:307-314.
 27. CASTRO-VAZQUEZ A, MCCANN SM. Cyclic changes in the reflex release of prolactin following cervicovaginal stimulation. *Neuroendocrinol* 1979; 28:3-10.
 28. NORTHROP LE, ERSKINE MS. Selective oxytocin receptor activation in the ventrolateral portion of the ventromedial hypothalamus is required for mating-induced pseudopregnancy in the female rat. *Endocrinology* 2008; 149:836-842.
 29. GOMEZ LE, ORTEGA C, DURAN I, CUEVA-ROLON R. Neural mechanisms accounting for the increase in blood pressure and heart rate during vagino-cervical stimulation. *J Auton Nerv Syst* 1996; 60:154-162.
 30. NAGGAR AN, KOMISARUK BR. Facilitation of tonic immobility stimulation of the vaginal cervix in the rat. *Physiol Behav* 1977; 19:441-444.
 31. KOMISARUK BR, WALLMAN J. Antinociceptive effects of vaginal stimulation in rats: neurophysiological and behavioral studies. *Brain Res* 1977; 137:85-107.
 32. GOMORA P, BEYER C, GONZALEZ-MARISCAL G, KOMISARUK BR. Momentary analgesia produced by copulation in female rats. *Brain Res* 1994; 656:52-58.
 33. CUEVA-ROLON R, GOMEZ LE, KOMISARUK BR, MUÑOZ-MARTINEZ EJ. Inhibition of withdrawal responses by pelvis nerve electrical stimulation. *Brain Res* 1995; 679:267-273.
 34. KOMISARUK BR, SANSONE G. Neural pathways mediating vaginal function: The vagus nerves and spinal cord oxytocin. *Scand J Psychol* 2003; 44:241-250.
 35. LINDSTRÖM S, FALL M, CARLSSON C, ERLANDSON BE. The neurophysiological basis of bladder inhibition in response to intravaginal electrical stimulation. *J Urol* 1983; 129:405-410.
 36. SHAFIK A, EL-SIBAI O. Effect of vaginal distention on vesicourethral function with identification of the vagino-vesicourethral reflex. *J Urol* 2001; 165:887-889.
 37. MARTINEZ-GOMEZ M, CHIRINO R, BEYER C, KOMISARUK BR, PACHECO P. Visceral and postural reflexes evoked by genital stimulation in urethane-anesthetized female rats. *Brain Res* 1992; 575:279-284.
 38. SHAFIK A. Vaginocavernosus reflex. Clinical significance and role in sexual act. *Gynecol Obstet Invest* 1993; 35:114-117.
 39. SHAFIK A. Vagino-levator reflex: description of a reflex and its role in sexual performance. *Eur J Obstet Gynecol* 1995; 60:161-164.
 40. CRUZ Y, HUDSON R, PACHECO P, LUCIO RA, MARTINEZ-GOMEZ M. Anatomical and physiological characteristics of perineal muscles in the female rabbit. *Physiol Behav* 2002; 74:1-8.
 41. MANZO J, ESQUIVEL A, HERNANDEZ M, CARRILLO P, MARTINEZ-GOMEZ M, PACHECO P. The role of pubococcygeus muscle in urinary continence in the male rat. *J Urol* 1997; 157: 2402-2406.
 42. CORONA-QUINTANILLA DL, CASTELAN F, FAJARDO F, MANZO J, MARTINEZ-GOMEZ, M. Temporal coordination of pelvic and perineal striated muscle. *J Urol* 2009; 181:1452-1458.