



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

**EFFECTO DE LA EXPERIENCIA REPRODUCTIVA SOBRE LA
SENSIBILIDAD ESTROGÉNICA DE LOS MÚSCULOS ESTRIADOS
PUBOCOCCÍGEO Y BULBOESPONJOSO DE LA CONEJA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Kenia López García

Codirectores

Dr. Francisco Castelán

Dra. Leticia Nicolás Toledo

Miembros del Comité Tutorial

Dra. Margarita Martínez Gómez

Dr. Ismael Jiménez Estrada

Tlaxcala, Tlax.

Septiembre, 2010

Esta Tesis se realizó bajo la codirección del Dr. Francisco Castelán y la Dra. Leticia Nicolás Toledo, y la asesoría del Dr. Ismael Jiménez Estrada, la Dra. Margarita Martínez Gómez y el Dr. Pablo Pacheco Cabrera. La asistencia técnica brindada por la Q.F.B. Laura García Rivera fue fundamental para la realización de este proyecto.

El trabajo experimental se realizó en el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Para su desarrollo y realización se contó con el financiamiento de CONACYT (105882 a MMG y 218156 a KLG), DGAPA-UNAM (228110 a MMG), CIC-UNAM (a FC) y ECOES (Beca de movilidad Santander-Serfin a KLG). La Maestría en Ciencias Biológicas forma parte del Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

Agradecimientos a título personal

Cuando llegó el momento de escribir este apartado tenía a algunas personas en mi mente. Las personas más cercanas y aquellas que no tanto pero que en el momento menos esperado pudieron darme una sonrisa, una palabra o un consejo de apoyo. A todos ustedes, ¡gracias! Estoy segura que saben a quienes me refiero.

A mis padres y a mis hermanos por su apoyo incondicional y a los cuales extraño cada domingo familiar. A Martín, gracias por tu apoyo, compañía y comprensión. A mis amigos, los que siempre han estado ahí (en las buenas, en las malas y en las alegrías y tristezas que las acompañaron y las acompañan). A mis sinodales presentes cada seis meses durante mis evaluaciones en el transcurso de esta etapa de mi vida. Gracias por las llamadas de atención, las insistencias, su conocimiento y sobre todo por ese cálido saludo las mañanas que coincidíamos en el laboratorio y los pescaba justo a la hora de su llegada.

No, no lo he olvidado, pero antes de agradecerle quiero dejar clara una cosa (aunque se que no le gustan las explicaciones) y es que en esta sección he intentado dejar a un lado hacer sólo oraciones simples. A mi tutor, gracias. Se que durante estos dos años he sido un dolor de cabeza constante. Gracias por tu apoyo, tus consejos y tu resistencia. Ahora vienen tres años más, si tienes suerte y no me demoro más. Espero que sigamos creciendo. Estoy orgullosa de nuestro, hasta hora, pequeño grupo. ¡Para adelante!

RESUMEN

La experiencia reproductiva (cópula, gestación, parto y lactancia) disminuye la concentración sérica de estradiol (E2), y esto modifica procesos fisiológicos dependientes de estrógenos en la rata. Los subtipos α y β del receptor de estrógenos (RE) son necesarios para la mayoría de los efectos del E2 en la musculatura estriada. Uno de ellos es la contracción muscular. Nuestro grupo de investigación ha reportado que la multiparidad (cuatro partos) induce cambios en las propiedades contráctiles del músculo pélvico pubococcígeo (mPc) y del perineal bulboesponjoso (mBe) de la coneja. Además hemos encontrado diferencias urodinámicas asociadas con modificaciones en la actividad EMG del mPc y del mBe. La distensión de la musculatura estriada pélvica y perineal ocasionada por cuatro partos consecutivos puede explicar esos cambios. Pero el papel que los cambios hormonales asociados con la experiencia reproductiva pudieran tener sobre los músculos estriados que participan en micción y reproducción es aún desconocido. El objetivo de este estudio fue determinar la concentración sérica de E2, la expresión del RE α y RE β , y las características histológicas del mPc y del mBe en conejas vírgenes y multíparas. Los resultados obtenidos en esta Tesis muestran que la experiencia reproductiva modificó la concentración sérica de estradiol (E2), y la expresión de los subtipos α y β del receptor de estrógenos (RE) en el mPc y el mBe. Esta modificación en la sensibilidad estrogénica estuvo acompañada por cambios histológicos. Las fibras estriadas del mPc de las conejas multíparas tuvieron un mayor número de núcleos periféricos y una mayor área transversal. El mBe no presentó diferencias significativas en esos parámetros. Nuestros resultados sugieren que la fluctuación de E2 y el cambio en la sensibilidad estrogénica del mPc y mBe, podrían estar asociados con los cambios histológicos y fisiológicos observados en la musculatura pélvica y perineal de la coneja multípara.

ABSTRACT

Changes in hormonal status have been reported after reproductive experience in rodents. Serum estradiol (E2) is modified in rats after one or multiple deliveries, which affect estradiol-dependent processes occurring in its target tissues. Most of E2 actions are achieved by its interaction with estrogen receptors (ER). Both subtypes α and β are expressed in striated muscles, where they mediate striated muscle processes as carbohydrate metabolism, degeneration/regeneration, and contractility. Pelvic- and perineal-striated muscles are critical for feminine micturition, and vaginal delivery impairs their physiology. In the domestic rabbit, we have previously found that four consecutive deliveries changes the physiological characteristics of isolated pelvic (pubococcygeous, Pcm) and perineal (bulbospongiosus, Bsm) muscles. In addition, recording of EMG activity of Pcm and Bsm has changed in multiparous, which is coincident with urodynamic changes in comparison with virgin females. Pelvic and perineal trauma induced by four consecutive vaginal deliveries could be the main explanation for those effects. However, the role of hormonal status due to reproductive experience is unknown. The aim of this study was to measure the serum E2, and both the expression of ER (α and β) and some histological characteristics of Pcm and Bsm from virgin and multiparous (4 deliveries) rabbits. Serum E2 was similar in multiparous than in virgin females age-matched. An augmentation in the number of ER α immunoreactive peripheral nuclei was found in the striated fibers of the Pcm of multiparous, but it was not the case for those from the Bsm. For both Pcm and Bsm, there was more ER β immunoreactive peripheral nuclei in multiparous against virgin females. Modification in estrogen sensitivity of both Pcm and Bsm was accompanied by changes in their histological characteristics. There was more peripheral nuclei in the Pcm from multiparous than in that from virgin group, while there was no difference in the Bsm. Cross-sectional area (CSA) was higher for the Pcm of multiparous females. Distribution of striated fiber-CSA showed an evident shift to wider fiber than does in virgin females. Such differences were not found in the Bsm. Our results suggest that estrogen status due to reproductive experience and estrogen sensitivity modification in pelvic and perineal muscles could be associated with histological, and, probably, physiological changes in those muscles.

ÍNDICE

RESUMEN vi

ABSTRACT vii

ÍNDICE viii

1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	13
2.1 Musculatura estriada pélvica y perineal	13
2.2 Multiparidad: fisiología y anatomía de la musculatura estriada pélvica y perineal	15
2.3 Musculatura estriada y estrógenos	18
2.4 Estrógenos	20
2.5 Receptor de estrógenos	24
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVOS	29
5.1 Objetivo general	29
5.2 Objetivos particulares	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1 Animales	30
6.2 Cuantificación de estradiol	30

6.3 Fijación, disección e inclusión del mPc y mBe	32
6.4 Tinción de hematoxilina y eosina (H-E)	32
6.5 Marcaje inmunohistoquímico anti-receptor de estrógenos	33
6.6 Análisis histológico	33
6.7 Análisis estadístico	34
7. RESULTADOS	35
7.1 Parámetros morfométricos	35
7.2 Concentración sérica de estradiol	35
7.3 Expresión del receptor de estrógenos en el mPc y mBe	38
7.4 Experiencia reproductiva y expresión de los subtipos α y β del receptor de estrógenos en el mPc	39
7.5 Experiencia reproductiva y expresión de los subtipos α y β del receptor de estrógenos en el mBe	40
7.6 Experiencia reproductiva y características histológicas del mPc	42
7.7 Experiencia reproductiva y características histológicas del mBe	44
8. DISCUSIÓN	47
8.1 Experiencia reproductiva y concentración de estradiol	47
8.2 Experiencia reproductiva y expresión del receptor de estrógenos en el mPc y mBe	49
8.3 Experiencia reproductiva y características histológicas del mPc y mBe	54
9. MODELO	58
10. CONCLUSIONES	61
11. PERSPECTIVAS	62

12. REFERENCIAS	64
13. GLOSARIO DE TÉRMINOS	72
14. PUBLICACIONES	74

1. INTRODUCCIÓN

La reproducción en hembras de mamíferos incluye una serie de procesos fisiológicos y conductuales que implican un alto costo energético y riesgos para la salud. La multiparidad definida como la experiencia reproductiva que incluye al menos dos episodios de gestación, parto y lactancia tiene claras ventajas en la adecuación de las hembras. En la mujer, el costo de tal adecuación se encuentra asociado con algunas disfunciones fisiológicas de la musculatura pélvica como prolapsos vaginales e incontinencia urinaria (IU).

La musculatura estriada pélvica y perineal, determinante para la fisiología del aparato urogenital femenino en el humano y varias especies de mamíferos, es una de las estructuras dañadas por el parto. Durante este proceso se distienden las fibras estriadas y/o nervios de esta musculatura incluso hasta su ruptura. Los episodios de preñez, parto y lactancia también involucran múltiples cambios endocrinos que pudieran favorecer el daño y/o la recuperación de la musculatura estriada. Entre estos cambios encontramos una exposición a diferentes niveles de secreción y sensibilidad de hormonas como progesterona, lactógenos, glucocorticoides y estrógenos, entre otras moléculas, que condicionan la fisiología de sus órganos blanco (Matt y cols. 1986, Bridges y Byrnes 2006; Byrnes y cols. 2009). El estradiol (E2) ejerce efectos múltiples sobre la musculatura estriada y es posible suponer que la fluctuación en su concentración altere la fisiología de esa musculatura. En este contexto, resulta interesante analizar el efecto de la multiparidad sobre la fluctuación de la concentración sérica de E2 y, al mismo tiempo, analizar la expresión de su receptor (receptor de estrógenos, RE) en la musculatura estriada pélvica y perineal. Un buen modelo experimental para hacerlo es la coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*), ya que la anatomía y organización de la musculatura pélvica y perineal hacen más accesible su disección en comparación con la de otras especies, como la rata.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Musculatura estriada pélvica y perineal*

La musculatura estriada pélvica y perineal provee del soporte a la mayoría de los órganos pélvicos (Klutke y Siegel 1995). El músculo detrusor y del esfínter uretral interno y externo dependen de la musculatura pélvica y perineal que ahí converge (Bernstein 1997). El parto vaginal y la menopausia, entre otros, son reconocidos como factores de riesgo asociados con el daño de la musculatura pélvica y perineal (Bidmead y Cardozo 1998).

En la mujer, el músculo pélvico pubococígeo (mPc) forma parte del complejo muscular elevador del ano (*levator ani*), también llamado como músculos del piso pélvico, junto con los músculos puborrectal e iliococígeo. El *levator ani* participa en la micción, la defecación y algunas funciones sexuales como la cópula y el parto. Con su origen en la rama púbica postero-inferior el mPc se inserta en línea media de los órganos viscerales y cresta anococígea. Éste a su vez es innervado por el nervio pudendo (Barber 2005). El músculo bulboesponjoso (mBe), uno de los músculos perineales del triángulo urogenital, es innervado por el enlace neurovascular pudendal (Barber 2005). Este músculo es importante para el soporte de la vagina distal donde su fisiología es importante en procesos como la reproducción y la micción (Barber 2005).

En la mujer, la musculatura estriada pélvica y perineal está directamente involucrada en el proceso de micción, un proceso fisiológico que consta de dos eventos coordinados: el almacenamiento y la expulsión de la orina de la vejiga a través de la uretra. Alrededor de estos eventos se encuentra la actividad neuromuscular, incluyendo la actividad del músculo liso de la vejiga y el esfínter externo de la uretra del conducto urinario inferior (Peschers y cols. 2001). La musculatura del piso pélvico que incluye el músculo pubococígeo, iliococígeo y puborrectalis forma el músculo elevador del ano (Herschorn 2004) donde se conoce que la contracción del mPc mantiene la continencia urinaria (Madill y McLean 2006).

En la coneja doméstica, modelo de estudio utilizado por nuestro grupo de investigación, dos de los principales músculos estriados involucrados en la continencia de la

orina, la cópula y el parto son el mPc y mBe (Cruz y cols. 2002, Corona-Quintanilla y cols. 2009). Similar a lo que sucede en la mujer y diferente a la rata hembra -modelo experimental más utilizado en estudios de biología de la reproducción y fisiología- (Martínez-Gómez y cols. 1997). En la coneja, el mPc (músculo pélvico) se origina en la espina ciática del isquion donde la mayoría de sus fibras se insertan sin apariencia tendinosa en la vértebra coccígea 6. El resto de las fibras se insertan mediante tendón en las vértebras coccígeas 7 y 8 (Martínez-Gómez y cols. 1997, Cruz y cols. 2002). El mBe (músculo perineal) se encuentra situado justo debajo del constrictor vestibular, y está constituido por dos pares de músculos que convergen con el músculo isquiocavernoso para unirse con el tendón de la línea media ventral de la vagina (Martínez-Gómez y cols. 1997, Cruz y cols. 2002) (fig. 1).

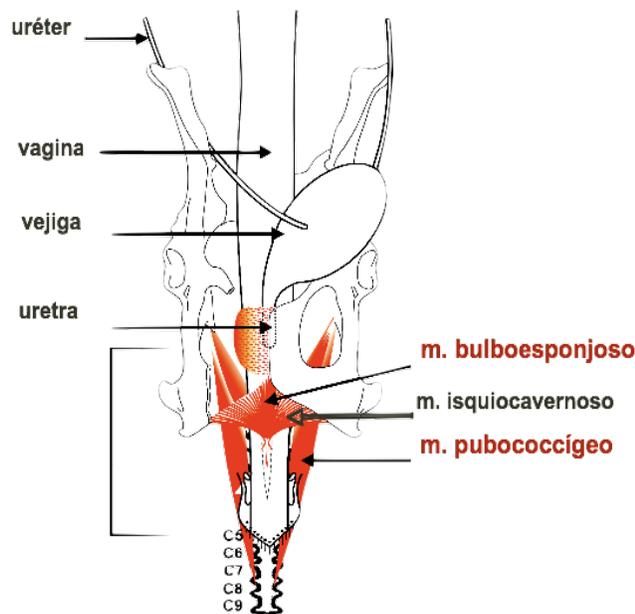


Figura 1. Musculatura estriada pélvica y perineal de la coneja doméstica. Se indica la localización de los músculos bulboesponjoso, isquiocavernoso y pubococcígeo (Modificada de Martínez-Gómez y cols. 1997).

Estudios en modelos experimentales, como la coneja doméstica, han demostrado la participación de músculos pélvicos y perineales en el proceso de la micción. El mPc participa

durante la fase de almacenamiento y los músculos mBe e isquiocavernoso (mIs), durante la fase de expulsión de la orina (fig. 2) (Corona-Quintanilla y cols. 2009).

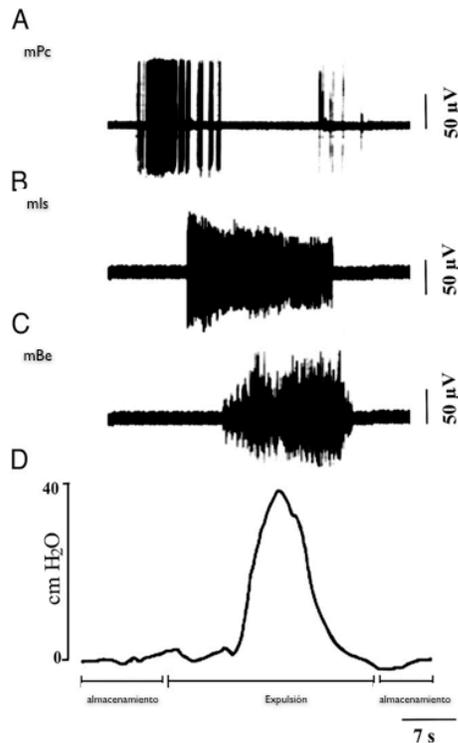


Figura 2. Actividad electromiográfica (A-C) de músculos pélvicos (A) y perineales (B y C) y cistometrogramas (D) durante la micción de la coneja. La actividad de cada músculo se presenta en diferentes etapas del ciclo de vaciamiento (almacenamiento y expulsión). s, segundos. Modificada de Corona-Quintanilla y cols. 2009.

2.2. Multiparidad: fisiología y anatomía de la musculatura estriada pélvica y perineal

El parto y otros eventos como la gestación y la fluctuación hormonal durante el ciclo de vida (Lukacz y cols. 2006) pueden dañar el conjunto de músculos estriados involucrados en cubrir y ayudar a sostener la vejiga en la mujer. Si los músculos del piso pélvico, la vagina y los ligamentos que mantienen la vejiga se debilitan, se modifica la posición anatómica de este órgano lo que provoca una mayor presión sobre ella. Estos músculos, que proveen de una fuerza ordinaria a la uretra, realizan una débil contracción ajustada que origina que la orina gotee durante momentos de esfuerzo cuando están dañados (Wook Bai y cols. 2004).

A pesar de que se ha descrito la participación de dichos músculos en algunos procesos como la erección del clítoris y la continencia urinaria (Cruz y cols. 2002) se sabe relativamente poco sobre su anatomía en la mujer y la participación en el proceso de

reproducción. Los estudios clínicos a través de biopsias (Blakeman y cols. 2000, Fu y cols. 2003) han aportado información sobre los posibles mecanismos que desencadenan el desorden de la incontinencia urinaria (IU). Otra forma de realizar investigaciones más profundas debido a las limitaciones que representan la ubicación anatómica de la región involucrada, junto con los músculos que ahí participan, es utilizando modelos animales que nos permiten realizar un análisis minucioso y bajo condiciones controladas de experimentación.

Datos obtenidos por nuestro grupo de investigación han demostrado que la multiparidad (cuatro partos) en la coneja doméstica modifica la histología del aparato urogenital inferior (Rodríguez-Antolín y cols. 2008), el cual es el sustrato anatómico que subyace a la cópula, la micción y el parto. Fajardo y cols. (2008) encontraron que la contractilidad de las fibras que componen a los mBe y mPc, se ve disminuida al modificar la proporción de fibras rápidas, intermedias y lentas en hembras multíparas. La proporción de los tres tipos de fibras (tipo I, oscuras; tipo IIA, intermedias y tipo II, claras) en el grupo experimental (multíparas) es menor independientemente de la región del músculo analizada (de inserción, media y de origen) lo que da como resultado un cambio en la respuesta de la fuerza de contracción ejercida ante un estímulo de contracción simple y otro tetánico (fig. 3).

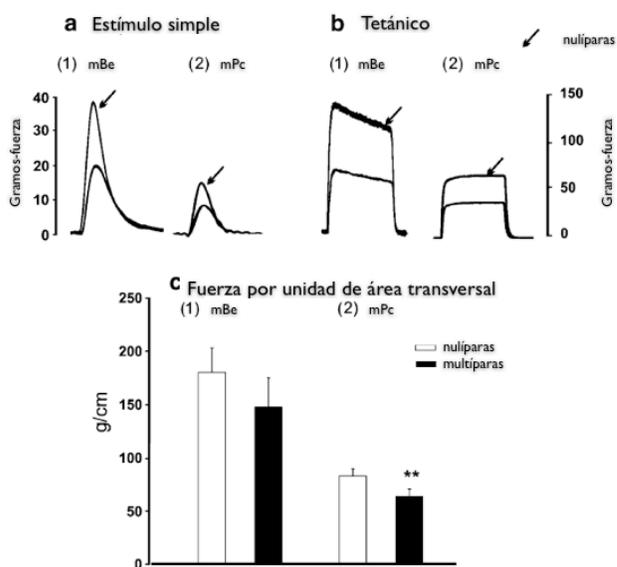


Figura 3. Registro de contracción de los músculos bulboesponjoso y pubococcígeo en hembras nulíparas y multíparas. a) respuesta simple y b) tetánica del mBe y mPc. c) Fuerza desarrollada por el mBe y mPc por unidad de área transversal en conejas nulíparas y multíparas. Sólo el mPc mostró diferencias significativas en éste parámetro (** $P < 0.001$, Mann-Whitney U test). Modificada de Fajardo y cols. 2008.

De acuerdo a estos resultados, es posible suponer que el cambio en la proporción de fibras de estos músculos modifique su actividad durante la micción (Martínez-Gómez y cols. enviado). En la coneja virgen, la actividad de los músculos mPc y mBe muestra una coordinación temporal durante ese proceso. El mPc se activa durante la fase de almacenamiento, mientras que el mBe (y el mIs) lo hace durante la fase de expulsión (Corona-Quintanilla y cols. 2009). Este patrón de actividad está alterado en hembras multíparas, junto con algunos parámetros urodinámicos, lo que indica que la multiparidad causa una modificación de la función urodinámica. Esta modificación provoca una actividad reducida y no coordinada de los mPc, mBe e mIs durante la micción (fig. 4) (Martínez-Gómez y cols. enviado).

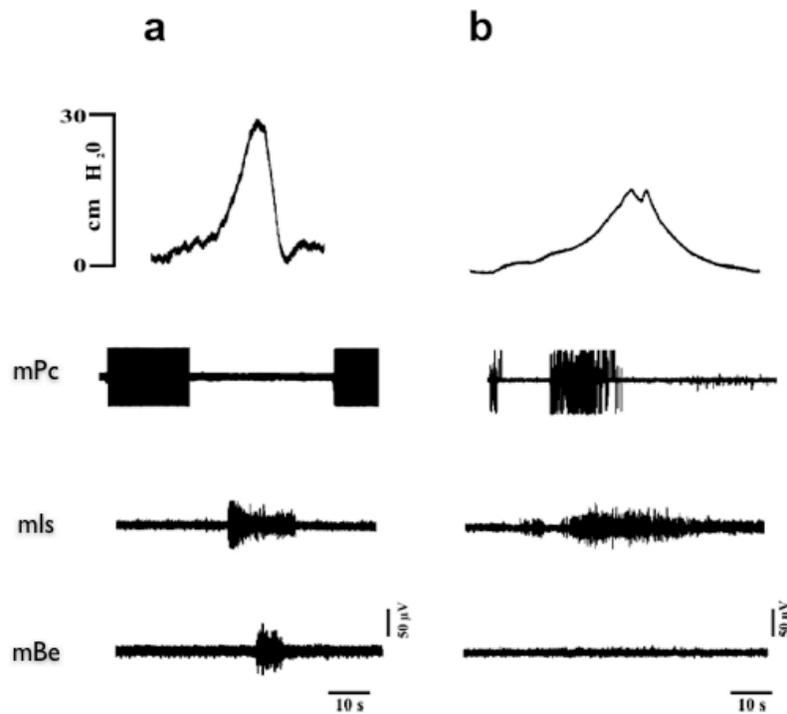


Figura 4. Registro simultáneo de cistometrogramas y electromiogramas de músculos pélvicos y perineales en conejas vírgenes (A) y multíparas (B). Se observa que en las hembras multíparas el cistometrograma y los electromiogramas son diferentes en comparación con las hembras vírgenes. Así mismo, el patrón temporal de actividad de los músculos pierde su actividad coordinada. Modificada de Martínez-Gómez y cols. enviado.

2.3. *Musculatura estriada y estrógenos*

Se ha observado que la musculatura estriada es un órgano diana de las hormonas gonadales (Brown 2008). Dentro de los esteroides sexuales, se ha encontrado que los estrógenos afectan la actividad enzimática (Beckett y cols. 2002) incidiendo sobre la activación y proliferación de células satélite en ratas ovariectomizadas (Enns y Tiidus 2008). Hasta ahora, gran parte de los mecanismos por el cual estas hormonas actúan sobre la función del músculo esquelético son aún inciertos (Sipilä y Poutamo 2003).

La capacidad de síntesis de estrógenos a lo largo de la vida de las hembras es variable. Estudios recientes proponen que los cambios hormonales tienen un efecto sobre la capacidad del músculo esquelético para regular su plasticidad y su masa (McClung y cols. 2006). Los mioblastos del músculo esquelético, los miotubos y las fibras maduras expresan receptores de estrógenos funcionales, sugiriendo que el músculo esquelético es sensible a la señalización de éstas hormonas esteroides (Kahlert y cols. 1997; Sartook 1984). Smith y cols. (1989) encontraron receptores de estrógenos (RE) en músculos del *levator ani* de mujeres con IU por medio de marcaje inmunohistoquímico. Debido a que la concentración de estrógenos afecta el tamaño del músculo y como consecuencia la generación de fuerza por parte de éstos (Moran y cols. 2007), resulta importante el estudio de la presencia de los receptores de estrógenos (REs) en los músculos involucrados en el control de la continencia urinaria, así como la correlación en la alteración de su distribución debido al daño muscular causado durante todo el proceso reproductivo hasta el parto.

La fluctuación en los niveles séricos de estrógenos y progesterona son responsables de los cambios en la prevalencia de síntomas urinarios y han sido el resultado de diversas investigaciones urodinámicas (Zhu y cols. 2004). Existe evidencia epidemiológica que implican la menopausia y la subsecuente deficiencia de estrógenos en patogénesis de un importante número de quejas incluyendo la incontinencia urinaria por estrés (IUS) y las recurrentes infecciones urinarias (Hextall 2000). Es posible suponer entonces, que el factor

hormonal es importante para el mantenimiento de la histología y la fisiología de los órganos reproductivos y la musculatura adyacente.

Los estrógenos pertenecen a la familia de las hormonas esteroides y ejercen una gran variedad de efectos sobre el crecimiento, desarrollo y diferenciación de diversos tejidos. La acción primaria de su regulación estaba enfocada principalmente a órganos reproductivos, sin embargo, ahora se sabe que pueden regular diversos procesos en tejidos como hueso, hígado, el sistema cardiovascular, cerebro y músculo (Katzenellenbogen y cols. 2000). Hormonas como los estrógenos, juegan un papel importante en el aparato urinario inferior femenino a lo largo de la vida adulta (Hextall 2000). Los estrógenos, son hormonas esteroides que controlan una gran variedad de procesos fisiológicos entre los que se encuentran los reproductivos y los no reproductivos (Lee y McEwen, 2001). Por una parte, al ser esta hormona de importancia para la regulación de energía y sustratos metabólicos, las alteraciones enzimáticas que pudiera ocasionar sobre algunas rutas de señalización implicadas en la oxidación de lípidos y metabolismo de la glucosa pueden ocasionar un daño serio sobre la fisiología de la musculatura estriada (Flatt 1988; Gayles y cols. 1997; Brown 2008).

Dentro de los procesos que incluye la experiencia reproductiva (cópula, gestación, parto y lactancia) encontramos una alteración en la fluctuación hormonal posterior al parto. Un ejemplo es la fluctuación de la concentración sérica de estradiol (E2) a lo largo del ciclo estral y durante la gestación que es alterada por un amplio conjunto de respuestas sensibles a estrógenos asociadas a los diversos ciclos de estro durante la vida de las hembras que lo presentan (Bridges y Byrnes 2006). En la rata se ha reportado una disminución en la concentración sérica de estradiol asociada con la experiencia reproductiva después de uno (Bridges y Byrnes 2006) o múltiples partos (fig. 5) (Matt y cols. 1986) teniendo un efecto sobre la expresión del receptor de estrógenos en la hipófisis (Bridges and Byrnes 2006).

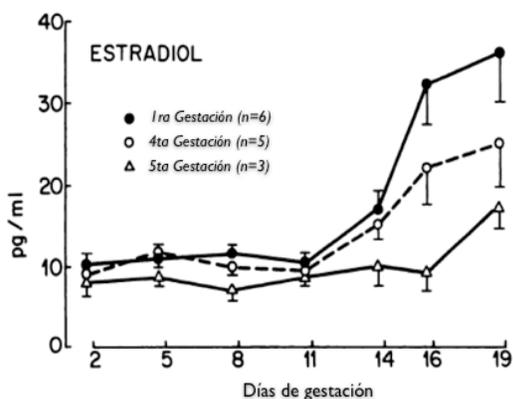


Figura 5. Concentración de estradiol sérico en ratas de 1, 4 y 5 períodos consecutivos de gestación. Cada punto en la gráfica representa la media \pm SE de todos los animales en cada grupo. Modificada de Matt y cols. 1986.

La coneja doméstica *Oryctolagus cuniculus* es una de las especies de mamíferos que presenta un mecanismo de ovulación refleja (Moralí y Beyer 1979) lo que le permite un estro por periodos prolongados si no llegara a aparearse. Durante la vida reproductiva de la coneja, los niveles de progesterona se encuentran elevados durante la gestación y disminuyen justo después del parto restableciéndose tiempo después y durante la lactancia. Los niveles de estradiol y testosterona alcanzan un pico al momento del parto y se encuentran altos durante la segunda mitad de la lactancia (González-Mariscal y cols. 1994).

La coneja doméstica se reproduce de manera múltiple y durante la etapa de posparto puede reproducirse casi inmediatamente después de dar a luz. Esto nos indica, que bajo condiciones naturales, las coneja está preñada y lactando al mismo tiempo, haciendo a éstas útiles para la investigación del efecto de la multiparidad desde un punto de vista hormonal sobre la musculatura estriada pélvica y perineal (Castellini y cols. 2003).

2.4. Estrógenos

La terapia de remplazo con estrógenos es un tratamiento para mujeres postmenopáusicas y adolescentes amenorreicas con el fin de intentar mantener la densidad del hueso y la función ovárica. Los efectos de los estrógenos sobre el hueso han sido extensamente estudiados, sin embargo, sus efectos en otros tejidos que responden a ellos como el músculo esquelético, están siendo recientemente establecidos (Piccone y cols. 2004). La deficiencia de hormonas ováricas está relacionada con alteraciones en la regulación de energía

y el metabolismo de diversos sustratos. En roedores, la ovariectomía (OVX) está asociada con la acumulación de grasa corporal y la resistencia a la insulina (Ahmed-Sorour y Bailey 1980, Richard 1986). El E2 es capaz de prevenir esos cambios después del remplazo en animales OVX (Richard 1986). Estos datos sugieren que las hormonas ováricas, particularmente el E2, regula la energía y el metabolismos de algunos sustratos (Beckett y cols. 2002).

El músculo esquelético es de primaria importancia en la regulación de energía y el metabolismo. Un cambio en su morfología y/o actividad metabólica resultaría en una modificación de su actividad. La musculatura estriada presenta receptores a estrógenos, lo que le permite responder a sus efectos. Entre otros factores, la masa y función contráctil de la musculatura estriada en la mujer es regulada por la concentración sérica de E2 (tablas 1 y 2).

Tabla 1. Resumen de los efectos directos de los estrógenos sobre músculo esquelético en la mujer (Brown 2009)

Efectos directos de los estrógenos en músculo esquelético en la mujer:

- Probable mantenimiento de la masa muscular en mujeres jóvenes premenopáusicas
 - Protección de lesión muscular en mujeres premenopáusicas
 - Probable alteración de la función contráctil con menos estrógenos
 - Metabolismo muscular (favorece la utilización de lípidos como fuente de energía, conduciendo a una mayor resistencia)
-

Tabla 2. Resumen de los efectos indirectos de los estrógenos en músculo esquelético en la mujer (Brown 2009)

Influencia de los estrógenos sobre otros sistemas que afectan la masa del músculo esquelético:

- Los estrógenos afectan la cantidad y distribución de la masa lipídica. Niveles bajos de estrógenos está asociada con un incremento en la masa lipídica.
 - Los estrógenos ejercen un fuerte efecto de conducta sobre la actividad espontánea. Niveles bajos de estrógenos están asociados con una disminución en los niveles de actividad física.
 - Un incremento en la masa lipídica junto con una disminución en la actividad física predispone a las mujeres a perder masa muscular y crear resistencia secundaria a la inactividad.
-

La principal función de la musculatura estriada es la actividad locomotora y el mantenimiento del tono postural. Las fibras musculares son las unidades contráctiles básicas del músculo esquelético y están rodeadas individualmente por una capa de tejido conectivo formando paquetes que dan estructura al músculo esquelético (Chargé y Rudnicki 2004). Un limitado número de estudios han examinado el efecto del remplazo de estrógenos en el tamaño y la masa del músculo en animales en crecimiento. En la rata, se ha encontrado que la ovariectomía (Lara-García, en proceso) y la castración (Alvarado y cols. 2008) modifican la histología del músculo pubococcígeo (mPc). El músculo esquelético, además de ser rico en tejido conectivo, es altamente vascularizado para proveerle de los nutrientes esenciales y que éste pueda desarrollar sus funciones fisiológicas. Las miofibras maduras están conectas a una sola motoneurona y expresan características moleculares para la función contráctil con la participación de diferentes isoformas de MHC (cadenas pesadas de miosina) y enzimas metabólicas (Chargé y Rudnicki 2004).

El músculo esquelético es susceptible a daño después de alguna lesión directa (ej. actividad física intensiva, laceraciones) o como resultado de causas indirectas donde podemos encontrar la disfunción neurológica o defectos genéticos innatos. Si estos daños no son reparados, dichas lesiones podrían promover la pérdida de masa muscular, la deficiencia locomotora y en el peor de los casos la muerte. De esta manera, el mantenimiento de la funcionalidad de la musculatura estriada está dada por su capacidad de regeneración (Chargé y Rudnicki 2004). Los estrógenos tienen la capacidad de regular diversos procesos asociados con el incremento de la masa muscular estriada y su regeneración. Esto muestra su función potencial como modulador de la regeneración muscular (Charge y Rudnicki 2004; Levin 2001).

La formación del músculo esquelético (miogénesis) es un proceso dinámico que incluye diversas etapas en las cuales los mioblastos (células mononucleadas no diferenciadas) proliferan para entrar en el ciclo celular y formar fibras musculares estriadas maduras. El E2 es una hormona importante en la regulación de los primeros pasos de diferenciación muscular. Esta hormona induce un incremento en la señalización de algunos factores reguladores del

crecimiento muscular como Myf5 y MyoD vía activación del RE α (Galluzzo y cols. 2009). A pesar de que el RE α se ha asociado de manera general a los efectos genómicos, la activación de estas proteínas involucra la activación de efectos no genómicos donde encontramos la activación y el mimetismo de la ruta de AKT (Galluzzo y cols. 2009).

La función contráctil de la musculatura estriada en ratas ovariectomizadas, como resultado de la deficiencia de estrógenos, es recuperada con terapia de reemplazo hormonal (HRT) (Brown 2008). Estudios en modelos animales ovariectomizados han aportado información relevante acerca los efectos del déficit de estradiol sobre la musculatura estriada. La respuesta del músculo esquelético a los estrógenos parece variar dependiendo de la composición del tipo de fibras en un músculo. En el soleo, un músculo compuesto en su mayoría por fibras lentas, se ha encontrado que el remplazo con estrógenos reduce el tamaño de todas las fibras, rápidas y lentas, pero la expresión de MHC no se ve afectada. En el plantaris rápido, compuesto en su mayoría por fibras rápidas, por el contrario, el remplazo con estrógenos reduce el tamaño sólo de las fibras rápidas (IIx, IIb) y reduce la expresión de MHC (Piccone y cols. 2004). En base a estos resultados, es necesario un estudio que nos permita distinguir los efectos que son mediados por los receptores de estrógenos presentes en el músculo esquelético y aquellos secundarios de la interacción de los estrógenos con otras hormonas.

La HRT es una terapia muy utilizada en mujeres después de la menopausia, hoy en día, se utiliza como tratamiento en mujeres con incontinencia urinaria (IU). Durante la menopausia se presenta una subsecuente disminución de estrógenos, esta disminución ha sido implicada en la etiología de un gran número de problemas incluyendo la IU por estrés y las recurrentes infecciones urinarias (Hextal 2000). El efecto específico de la terapia de estrógenos puede deberse a la expresión diferencial de los genes que codifican para los receptores de estrógenos (REs) lo cual depende del estado fisiológico del tejido blanco (Fu y cols. 2003).

La expresión de los REs ha sido determinada en musculatura estriada de especies como la rata (Alonso y cols. 2006), ratón (Barros y cols. 2006), conejo (Gustafsson y cols. 1984) y humano (Paz y cols. 2001 y Knutsson y cols. 2002), entre otros. Por lo que puede deducirse

que el estradiol tiene efectos sobre órganos blanco distintos a los reproductivos (Patten y cols. 2004). La información acerca del papel que los estrógenos desempeñan en la fisiología del músculo estriado es muy diversa. Datos obtenidos de modelos animales han propuesto que el estradiol induce la expresión de factores de transcripción que participan en la proliferación de mioblastos (Kahlert y cols. 1997) y en la fusión de éstos para formar las fibras musculares estriadas (Galluzzo y cols. 2009). En la rata, la privación de estrógenos parece incrementar la vulnerabilidad de la musculatura estriada frente al estrés oxidativo (Persky y cols. 2000). Además, se ha encontrado que el estradiol influye sobre la contractilidad de la fibra muscular al incrementar la fuerza de los enlaces de miosina (Moran y cols. 2007) y al tener una influencia no sólo en la activación sino también en la proliferación de células satélite (Enns y Tiidus 2008).

Diferentes rutas de señalización son dependientes de los estrógenos: la ruta de la proteína kinasa B y la de la fosfatidil inositol 3-kinasa la cual estimula el crecimiento y síntesis de proteínas son sólo algunas de ellas (Patten y cols. 2004; Sitnick y cols. 2006). Durante el transporte de glucosa en músculo estriado, estudios en ratones han demostrado que la presencia del RE β disminuye la expresión de un importante transportador de glucosa (GLUT4) y por consiguiente aumenta la resistencia a la insulina vía activación de la fosfatidil inositol 3-kinasa (Barros y cols. 2006).

2.5. Receptor de estrógenos

El receptor de estrógenos (RE) es una proteína perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares, la cual incluye también otros receptores de hormonas esteroides como el de la vitamina D, de retinol, de hormonas tiroideas y algunos receptores huérfanos (Evans 1988). Se conocen principalmente dos subtipos de receptores de estrógenos que son el α y el β (RE α , RE β), producto de la expresión de dos genes distintos (ESR1 y ESR2 respectivamente) (Pelletier y El-Alfy 2000). Estos receptores funcionan como factores de transcripción activados por ligando y modulan la actividad transcripcional de algunos genes mediante su unión a elementos de respuesta estrogénicos (EREs). Además del mecanismo genómico se ha

reportado otro no genómico. Éste último involucra la activación de cascadas de señalización intracelular asociadas al incremento en la liberación de óxido nítrico (ON), la homeostasis del calcio, la acumulación de AMPc y la activación del factor de crecimiento insulínico (IGF), entre otros (Alonso y cols. 2006; Driggers y Segars 2002; Segars y Driggers 2002).

Actualmente se reconocen cuatro mecanismos mediante los cuales el RE regula el crecimiento y la diferenciación celular (Hall y cols. 2001):

- a) Activación dependiente del ligando: la unión de ligando activa al RE induciendo su interacción con el ADN y la activación transcripcional de genes blanco.
- b) Activación independiente de ligando: varias cinasas de las redes de señalización de factores de crecimiento logran activar al RE y sus proteínas correguladoras en ausencia de ligando.
- c) Activación independiente de la unión del complejo hormona-receptor a su elemento de respuesta específico sobre el ADN: el RE unido a su ligando puede activar promotores mediante su unión a otros factores de transcripción, como AP-1, utilizando los sitios de unión a ADN de éstos.
- d) Señalización no-genómica (RE de membrana): activación de otras cascadas de transducción de señales por medio de un receptor estrógeno-regulado anclado a la membrana (GPR30).

En el músculo esquelético los mioblastos, los miotubos y las fibras maduras expresan receptores de estrógenos funcionales, lo que sugiere que el músculo esquelético es sensible a la señalización estrogénica (Kahlert y cols. 1997; Saartok 1984). La expresión del REs, puede ocurrir a la alza o a la baja dependiendo del tejido y/o del subtipo de receptor en cuestión. En ratas preñadas se ha encontrado que la expresión del REs tanto en musculatura estriada como en adipocitos presenta una regulación a la alta respecto a la concentración de estradiol (Alonso y cols. 2006).

Una pérdida de estrógenos altera la recuperación del músculo esquelético en desuso. Sin embargo, los componentes específicos sensibles a estas hormonas y que ayudan a la recuperación del músculo no han sido descritos (McClung y cols. 2006). En el conejo se ha reportado que la concentración de REs está asociada con el tipo de fibra que compone el músculo (Gustafsson y cols. 1984; Saartok 1984). Lo cual está relacionado con la función y respuesta mecánica de éstos ante un estímulo específico.

3. JUSTIFICACIÓN

La musculatura estriada pélvica y perineal es determinante para la fisiología del aparato urogenital inferior femenino en el ser humano y varias especies de mamíferos. Durante el parto ocurren cambios morfológicos e histológicos en las fibras estriadas y/o nervios de ambas musculaturas, que en la mujer se asocian con la aparición de prolapsos e incontinencia urinaria. La gestación, el parto y la lactancia son eventos de la experiencia reproductiva de las hembras de mamíferos en los que también ocurren cambios endocrinos que pudieran favorecer el daño y/o la recuperación de ambas musculaturas. Sin embargo, la información al respecto es escasa. Este proyecto pretende evaluar los cambios en la concentración sérica de E2 y la expresión del receptor de estrógenos el mPc y el mBe asociados con la experiencia reproductiva (cuatro partos) de la coneja. De manera complementaria se evaluarán algunas características histológicas que pudieran evidenciar modificaciones estructurales relacionadas con ambos parámetros estrogénicos. Se espera que la información obtenida contribuya a determinar la sensibilidad estrogénica de la musculatura estriada pélvica y perineal en función de la experiencia reproductiva.

4. HIPÓTESIS

La experiencia reproductiva de cuatro partos modifica la sensibilidad estrogénica y las características histológicas de los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja doméstica.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar la concentración sérica de estradiol (E2) y la expresión del receptor de estrógenos (RE) en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de conejas intactas y multíparas (4 partos).

5.2. Objetivos particulares

En conejas vírgenes y multíparas,

1. Determinar la concentración sérica de E2.
2. Determinar la expresión de los subtipos α y β del RE en los músculos pubococcígeo (mPc) y bulboesponjoso (mBe).
3. Determinar las características histológicas de los mPc y mBe.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Animales

Se utilizaron conejas jóvenes de 10-12 meses de edad de la raza chinchilla (*Oryctolagus cuniculus*), mantenidas en condiciones estándar (16 h/ 8 h de luz y oscuridad; 22 ± 2 °C) en el bioterio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (Universidad Autónoma de Tlaxcala) y alojadas en jaulas individuales de acero inoxidable (50 x 60 x 40 cm) con alimento Purina (dieta restringida, 135 g/día base) y agua *ad libitum*. El grupo control estuvo constituido por hembras vírgenes (V, n=6) y el grupo experimental por hembras multíparas (M, n=6). La primera cópula del grupo M se llevó a cabo a los seis meses de edad. Las conejas fueron apareadas durante las primeras 24 h posteriores a cada parto. En los primeros tres partos, las crías fueron destetadas a los 20 días. En el último parto las crías fueron sacrificadas en las primeras 24 h. En ambos grupos, V y M, las conejas fueron sacrificadas ~ 12 meses de edad, 21 días después del último parto. Este protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Tlaxcala y la directiva para la manipulación de investigación animal del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

6.2. Cuantificación de estradiol

Las muestras sanguíneas (1.5 mL) se obtuvieron por punción de una de las venas de la oreja en ambos grupos: multíparas (M) y vírgenes (V). La figura 6 indica el patrón de obtención de las muestras. El día cero correspondió a la primera muestra antes de la primera cópula (AER). La obtención de las muestras sanguíneas continuó cada seis días hasta terminar el primer periodo de gestación y luego hasta el término de los cuatro partos. Para el grupo V, las muestras se obtuvieron cada seis días durante al menos dos meses y en el momento del sacrificio. Los resultados de este último grupo fueron comparados con el grupo M de acuerdo a la edad de la coneja en la que se obtuvieron las muestra. La última muestra tomada correspondió al día del sacrificio, día 21 después del último parto. El suero se separó por centrifugación (15 min a 10000 rpm) y se almacenó a -30 °C hasta su cuantificación.

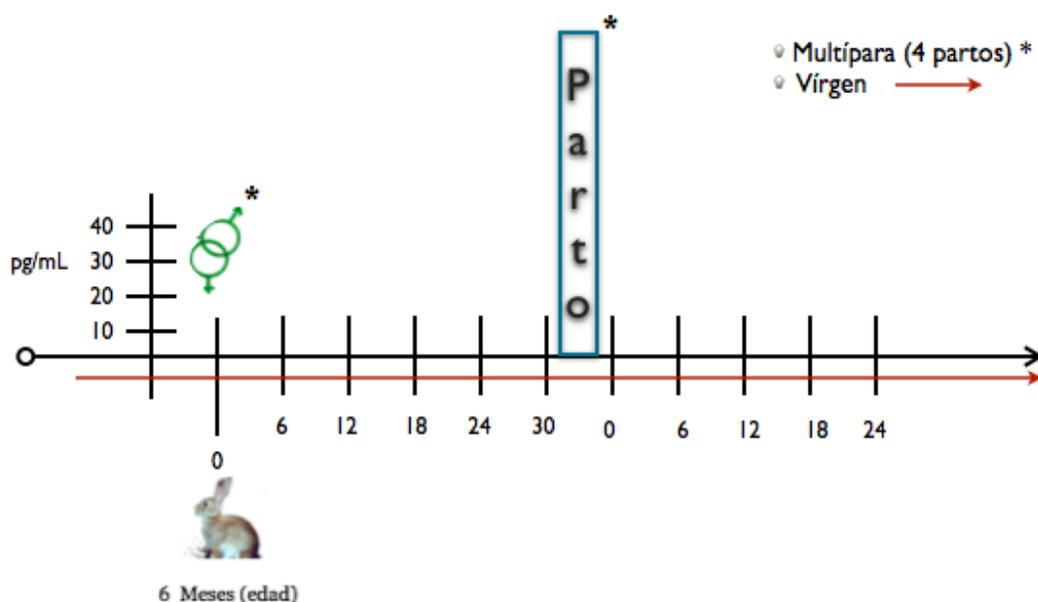


Figura 6. Cronograma de la toma de muestra sanguínea en conejas vírgenes y multíparas. La línea roja corresponde a la toma de muestra en las hembras vírgenes indicando una continuidad sin procesos de gestación. (*Parto)

Para la extracción de esteroides totales, 100 μ L de suero fueron extraídos con 1 mL de éter dietílico. El suero y el éter fueron mezclados en proporción 1:10, agitados por 30 s e incubados en frío (1h a -30 °C) para permitir la separación de fases. La fase orgánica fue recolectada y el éter evaporado a 37 °C. El residuo se lavó con metanol absoluto y fue concentrado en el fondo del tubo mediante centrifugación (5 min, 12000 rpm). Después de evaporar el metanol, cada residuo fue resuspendido en 55 μ L del buffer de dilución de esteroides (PBS 50 mM, pH 7.4, 0.1% gelatina).

La concentración de estradiol sérico fue determinada mediante ELISA y de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Calbiotech y Monobind Inc). La cuantificación de cada muestra se hizo por duplicado.

6.3. Disección, fijación e inclusión del mPc y del mBe

Las conejas fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (60 mg/Kg, ip). El animal fue colocado en posición supina dorsal. Se realizó una incisión sobre la línea media desde la cavidad abdominal hasta la vagina perineal. Los músculos abdominales y el tejido adiposo fueron extraídos. Los huesos isquion y pubis, así como los músculos obturador externo e interno, fueron extraídos ligando venas y arterias que irrigan el plexo venoso para evitar hemorragias severas hasta diseccionar los músculos mPc y mBe.

Los tejidos fueron colocados en un porta-muestras de plástico anudando ambos extremos con hilo de sutura y con la medida aproximada a la que poseían antes de ser extraídos. La fijación de los tejidos se hizo por inmersión en solución de Bouin-Duboscq (ácido pícrico 0.44 %, formalina 9.86 %, ac. acético 6.66 %, etanol 53.33 %) durante 24 h. Posteriormente, se colocaron en alcohol etílico al 70 % durante una noche. La deshidratación continuó con alcohol etílico de concentraciones ascendentes (80, 96 y 100 %), enseguida fueron aclarados en una solución previa de etanol-xileno y otra de xileno. Ya deshidratado, el tejido fue incluido en Paraplast *X-tra* (Sigma-Aldrich).

6.4. Tinción de hematoxilina y eosina (H-E)

Se analizaron cortes de 7 μ m de grosor obtenidos en un microtomo Leica (RM2135) de la región media de cada músculo. Los cortes fueron desparafinados sumergiéndolos serialmente en xileno y alcohol etílico de concentraciones descendentes (100, 96, 80 y 70 %) y agua. Después de la desparafinación, los cortes fueron sumergidos en hematoxilina de Harris durante 30 min. Posteriormente se sumergieron en agua corriente, alcohol ácido (alcohol absoluto y ácido acético, 1:1), agua destilada, etanol amoniacal (alcohol absoluto y amoniaco, 1:1) y agua destilada. Los cortes fueron teñidos con eosina durante 10 min, lavados con agua destilada y sumergidos serialmente en etanol 96 %, etanol 100 %, etanol-xileno (1:1) y xileno. Finalmente, las preparaciones fueron cubiertas con Cytoseal-60 (Richard-Allan Scientific), observadas con el objetivo 40X en un microscopio de luz visible (Nikon ECLIPSE E600) y fotografiadas con una cámara OLYMPUS a una resolución de 5.1 megapíxeles. Se analizaron

cuatro fibras de cuatro campos por músculo para cada una de las conejas (16 fibras por coneja) (ver apartado 6.6).

6.5. Marcaje inmunohistoquímico anti-receptor de estrógenos

Se utilizaron cortes transversales (7 μ m) obtenidos en un microtomo Leica (RM2135). Posteriormente fueron sometidos a un tratamiento para reexponer los antígenos de la preparación (citrato de sodio 10 mM pH 6, durante 72 h a 4 °C y 5 min a 90 °C). Con el fin de bloquear las peroxidases endógenas, los cortes se incubaron en una solución de peróxido de hidrógeno al 3 % en PBS (Na_2HPO_4 7.6 mM, NaH_2PO_4 2.66 mM y NaCl 0.15 M, pH 7.4) durante 30 min. Después de la incubación los cortes se lavaron con PBS. Posterior al lavado, los cortes se incubaron en una solución de bloqueo de uniones inespecíficas (5 % de suero normal de cabra (NGS) en PBS / triton X100) durante 1 h. A continuación los cortes fueron incubados (72 h, 4°C) con el primer anticuerpo (anti-RE α , *Abcam*, 1:250; anti-RE β , *Novus Biologicals*, 1:250) diluido en PBS / triton X100. Transcurrida esta incubación se hicieron tres lavados con PBS / triton X100 para posteriormente incubar con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón hecho en cabra y biotinilado, diluido 1:250 en PBS // triton X100) durante 2 h a temperatura ambiente . El marcaje inmunohistoquímico fue revelado con el kit ABC (Vector Lab) utilizando diaminobencidina como sustrato. Al término de la inmunohistoquímica, los cortes fueron deshidratados en alcohol etílico de 60, 80, 96, 100 %, aclarados con una solución de etanol-xileno y xileno. Las preparaciones fueron cubiertas con un medio de montaje (Cytoseal 60) y un cubreobjetos. Éstas fueron observadas con el objetivo de 40X en un microscopio de luz visible (Nikon ECLIPSE E600®) y fotografiadas con una cámara OLYMPUS a una resolución de 5.1 megapíxeles. Se analizaron cuatro fibras de cuatro campos por músculo para cada una de las conejas (16 fibras por coneja) (ver apartado 6.6).

6.6. Análisis histológico

El análisis histológico (conteo de los núcleos y medición del área de las fibras musculares) se realizó utilizando una cuadrícula de 6 x 4 cuadrantes, misma que fue colocada

sobre la fotografía en en monitor. El conteo se llevó a cabo en la fibra ubicada cada cinco cuadrantes por campo (magnificación 40X). El análisis cuantitativo se realizó utilizando el programa AxioVision Rel. 4.3 (fig. 7). Se analizaron cuatro fibras de cuatro campos por músculo para cada una de las conejas (16 fibras por coneja).

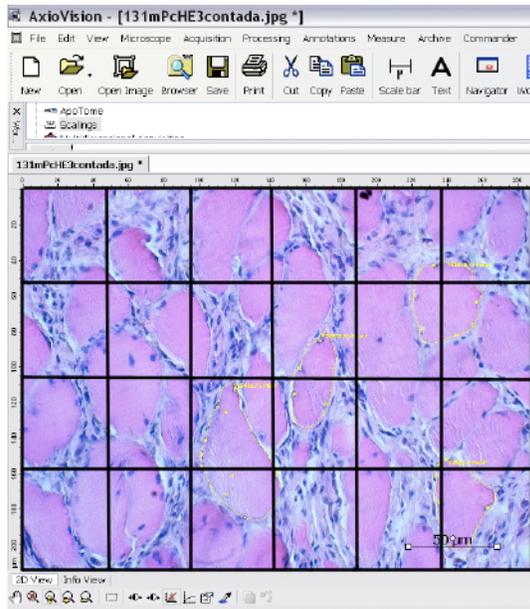


Figura 7. Esquema del sistema de conteo de núcleos (H-E) y núcleos inmunorreactivos al RE (inmunohistoquímica). Muestra la cuadrícula utilizada para el conteo (6x4 cuadrantes).

6.7. Análisis estadístico

Los datos de los parámetros morfométricos, la concentración sérica de estradiol al día del sacrificio, los núcleos inmunorreactivos al receptor de estrógenos, y el área transversal de las fibras en ambos músculos fueron analizados utilizando una prueba de t de Student para grupos independientes. Los niveles de E2 sérico durante la experiencia reproductiva fueron analizados con una ANOVA de una vía para muestras repetidas, seguido de una prueba *posthoc* de Newman-Keuls para identificar las diferencias entre grupos ($P < 0.05$). Para el análisis de los histogramas de área transversal de a fibra se utilizó una prueba F de Fisher para identificar las diferencias ($P < 0.05$) entre rangos. En todos los casos se utilizó el programa estadístico Prism v.4c para Mac.

7. RESULTADOS

7.1. Parámetros morfológicos

La tabla 3 muestra los parámetros morfológicos analizados de las conejas vírgenes (V) y multíparas (M).

Tabla 3. Parámetros morfológicos de las conejas utilizadas en este estudio. Las medidas reportadas para cada uno de los músculos se tomaron antes de ser extraídos. V, hembras vírgenes (n=6); M, hembras multíparas (n=6). t de Student, * $P < 0.05$. NA, no aplica.

	<i>Edad (meses)</i>	<i>Crias Por Parto</i>	<i>Peso (Kg)</i>	<i>mPc longitud (cm)</i>	<i>mPc ancho (cm)</i>	<i>mBe longitud (cm)</i>	<i>mBe ancho (cm)</i>
V	11.97±0.10	NA	4.19 ± 0.15*	3.16 ± 0.08	0.61 ± 0.02	1.80 ± 0.11	0.70 ± 0.02
M	12.11±0.46	7.21±0.45	3.65 ± 0.18	3.44 ± 0.10	0.59 ± 0.02	1.88 ± 0.07	0.66 ± 0.01

7.2. Concentración sérica de estradiol

La concentración sérica de estradiol (E2) fue cuantificada en conejas vírgenes y multíparas mediante ELISA, previa extracción de esteroides totales para evitar reacciones cruzadas entre las IgG séricas y el anti-estradiol hecho en conejo. Con el fin de conocer la eficiencia de recuperación del protocolo de extracción, se añadieron 300 pg/mL de uno de los estándares de E2 incluido en el kit a un suero de conejo de concentración conocida (26 pg/mL). Después de la extracción y la cuantificación se encontró una eficiencia de recuperación de ~ 55 %.

La figura 8 muestra la concentración de E2 antes y durante las cuatro gestaciones consecutivas de dos conejas. La concentración sérica de E2 fluctúa a lo largo de cada periodo. En relación a los niveles observados antes de cada cópula, los del día 6 de cada gestación disminuyeron. Después los niveles de E2 fluctuaron hasta alcanzar un nivel máximo el día 30 de gestación. El patrón que muestran los niveles de E2 a lo largo de los periodos de gestación parece más evidente en las primeras dos gestaciones que en la tercera y la cuarta.

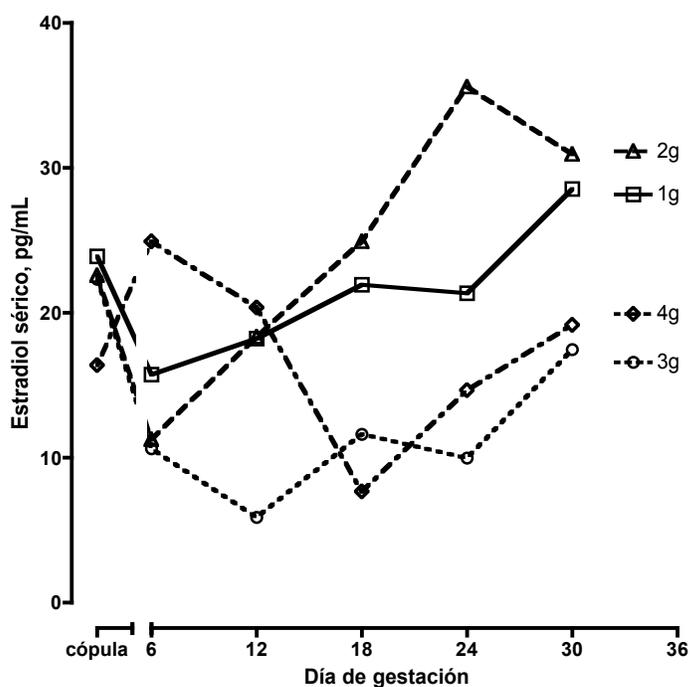


Figura 8. Concentración de estradiol durante la experiencia reproductiva de la coneja. Concentración sérica de estradiol (E2) durante cuatro gestaciones consecutivas (1, 2, 3 y 4g) en la coneja doméstica. Las muestras se obtuvieron cada seis días. Los datos representan el valor promedio de al menos dos experimentos independientes y cuantificados por duplicado. (n=2).

Considerando los datos obtenidos en el estudio piloto (fig. 8), se cuantificó el E2 de las muestras del día 6 y 30 de la primera y cuarta gestación de todas las conejas. Los resultados obtenidos (fig. 9) evidenciaron un incremento significativo en la concentración de E2 del día 30 (34.22 ± 5.6 pg/mL) con respecto a la del día 6 de la segunda gestación (18.7 ± 3.24 pg/mL; $P > 0.05$). Este incremento no se observó en la cuarta gestación (día 30, 20.23 ± 2.99 vs. día 6, 25.45 ± 1.61 pg/mL; $P > 0.05$). Los niveles de E2 alcanzados al término de la segunda etapa de preñez fueron mayores que los encontrados antes de la primera cópula (AER, 20.85 ± 1.37 pg/mL; $P > 0.05$), el día 30 de la cuarta gestación (20.23 ± 2.99 pg/mL; $P < 0.05$) y 21 días después del cuarto parto (M, 18.1 ± 2.46 pg/mL; $P < 0.05$).

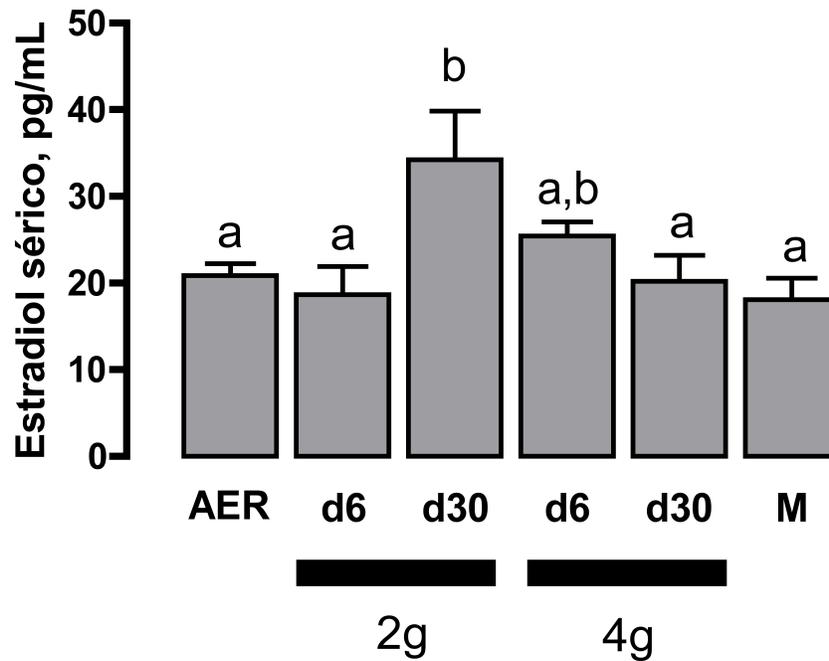


Figura 9. Concentración sérica de E2 antes, durante y después de la experiencia reproductiva en la coneja. Las muestras fueron obtenidas antes de la primera cópula (AER), en los días 6 (d6) y 30 (d30) de la segunda (2g) y cuarta gestación (4g), y 21 días después del cuarto parto (M). Los datos representan la media \pm e.e. de seis individuos, en los que la concentración de E2 fue determinada al menos en dos experimentos independientes. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA (una vía) para muestras repetidas, seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls. Las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los grupos se indica mediante diferentes letras minúsculas.

La concentración de E2 sérico cuantificada el día del sacrificio de las conejas vírgenes y multíparas fue similar (fig. 10, 15.93 ± 2.27 vs. 18.1 ± 2.46 pg/mL; $P > 0.05$).

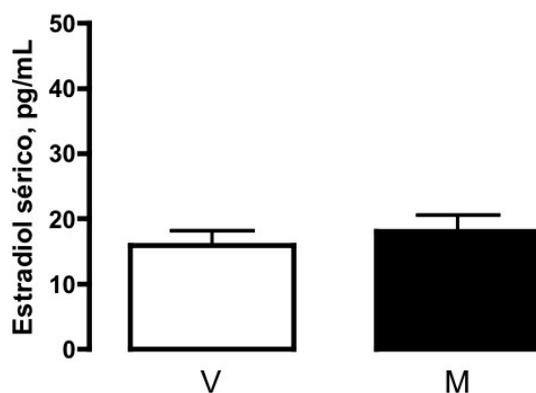


Figura 10. Concentración sérica de E2 en conejas vírgenes (V) y multíparas (M). Las muestras fueron obtenidas el día del sacrificio que para el grupo V fue al año de edad y para el M 21 días después del cuarto parto (aproximadamente a un año de edad). Los datos representan la media \pm e.e. de seis individuos por grupo, en los que la concentración de E2 fue determinada al menos en dos experimentos independientes. Los datos fueron analizados mediante una t de Student para grupos independientes ($P = 0.5026$).

7.3. Expresión del receptor de estrógenos en el mPc y el mBe

La expresión del receptor de estrógenos (RE) fue evaluada mediante marcaje inmunohistoquímico anti-RE α y anti-RE β . La figura 11 muestra la expresión del RE α (fig. 11B) y del RE β (fig. 11E) en el mPc así como en el mBe (RE α , fig. 11C y RE β , fig. 11F). El marcaje inmunorreactivo se observó en los núcleos de las fibras musculares y en los de células del tejido conectivo. La especificidad del marcaje se determinó utilizando útero como control positivo para ambos subtipos del receptor (Press y cols. 1986, Vermeirsch y cols. 1998). La inmunorreactividad anti-RE α y anti-RE β se observó en tejido uterino (fig. 11A y B, respectivamente). Tal marcaje no se observó cuando el procedimiento de inmunohistoquímica se hizo en ausencia del anticuerpo primario correspondiente (datos no mostrados).

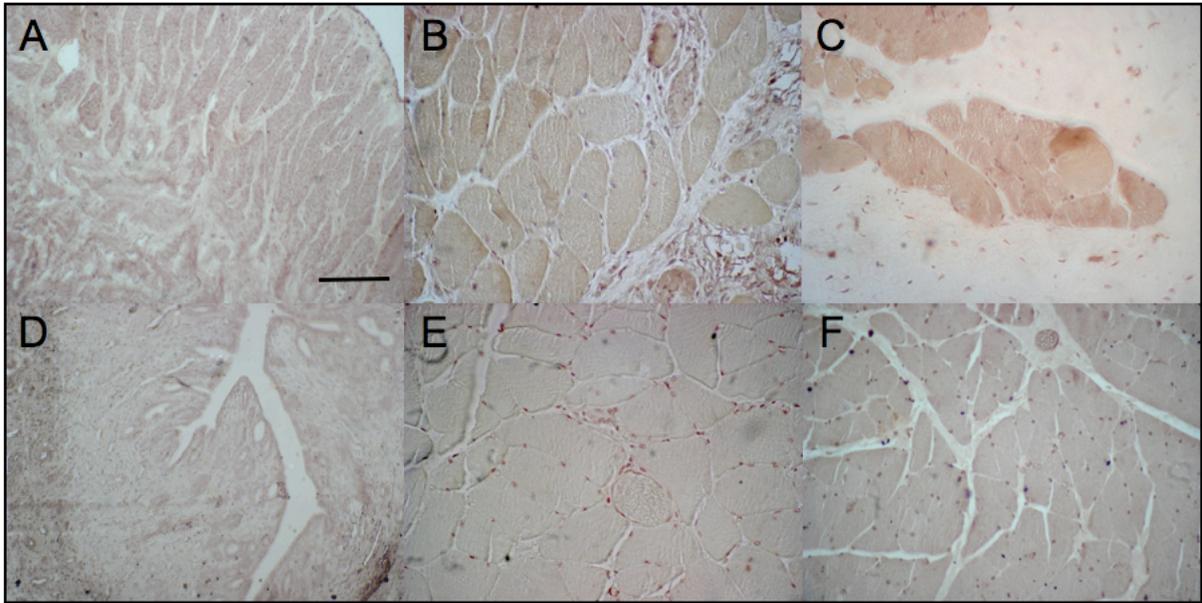


Figura 11. Expresión del receptor de estrógenos (RE) α y β en los músculos pubococcígeo (mPc) y bulboesponjoso (mBe) de conejas vírgenes. Cortes transversales de 7 μ m de útero (A, D), mPc (B, E) y mBe (C, F). Inmunorreactividad anti-RE α (A -C) y anti-RE β (D - F). Escala, 50 μ m.

7.4. Experiencia reproductiva y expresión de los subtipos α y β del receptor de estrógenos en el mPc

La experiencia reproductiva incrementó el número de núcleos periféricos inmunorreactivos anti-RE α en comparación con lo observado en conejas vírgenes (fig. 12A, C E; 2.80 ± 0.24 vs. 1.59 ± 0.18 ; $P = 0.0029$). Un resultado similar se observó para el número de núcleos inmunorreactivos anti-RE β (fig. 12B, D y F; V, 2.08 ± 0.22 vs. M, 1.06 ± 0.09 , $P=0.0018$).

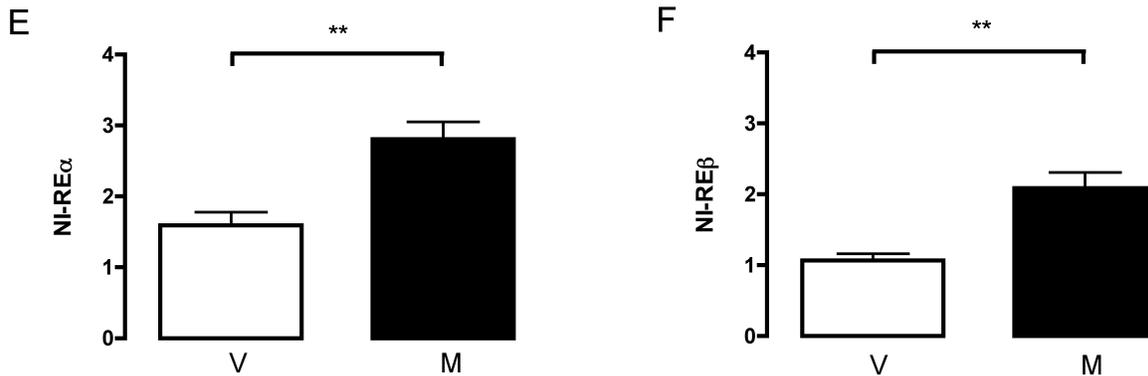
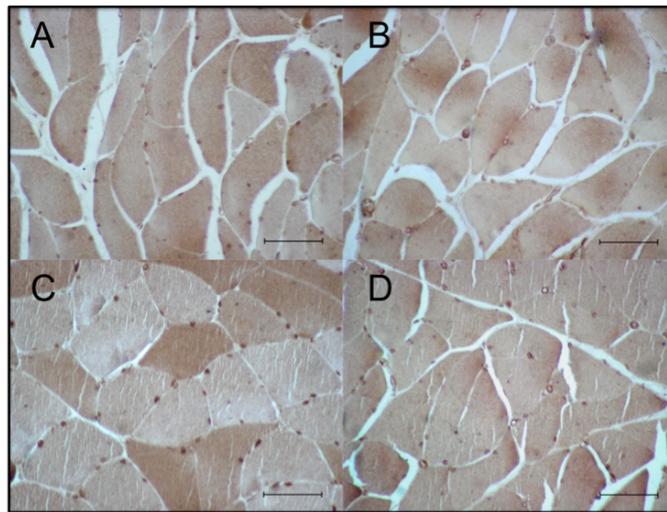


Figura 12. Expresión de los subtipos α y β del receptor de estrógenos (RE) en el músculo pubococcígeo (mPc) de conejas vírgenes (V) y múltiparas (M). Cortes transversales ($7 \mu\text{m}$) de conejas V (A y B) y M (C y D) en el que se observan núcleos inmunorreactivos anti-RE α (A y C), y anti-RE β (B y D). Escala, $50 \mu\text{m}$. Número de núcleos periféricos inmunorreactivos anti-RE α (E) y anti-RE β (F). Los datos corresponden a la media \pm e.e. de 16 fibras por coneja (V, $n=6$; M, $n=6$). Los datos fueron analizados mediante una t de Student para grupos independientes; ** $P < 0.01$. NI, núcleos periféricos inmunorreactivos.

7.5. Experiencia reproductiva y expresión de los subtipos α y β del receptor de estrógenos en el mBe

El número de núcleos inmunorreactivos anti-RE α (fig. 13A, C y E) fue similar en el mBe de conejas V y M (1.16 ± 0.05 vs. 1.54 ± 0.18 ; $P = 0.3095$). En cambio el número de núcleos inmunorreactivos anti-RE β (fig. 13B, D y F) fue mayor en el grupo M (1.52 ± 0.15) que en el V (1.00 ± 0.10 ; $P = 0.0434$).

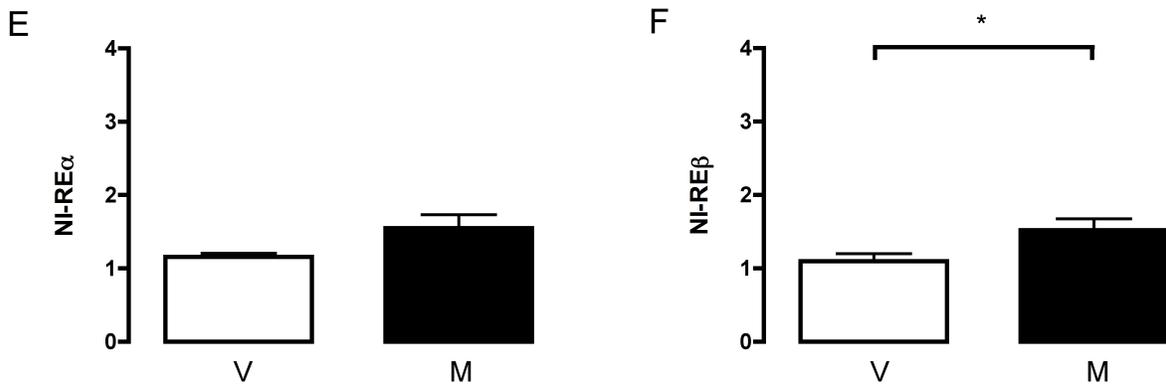
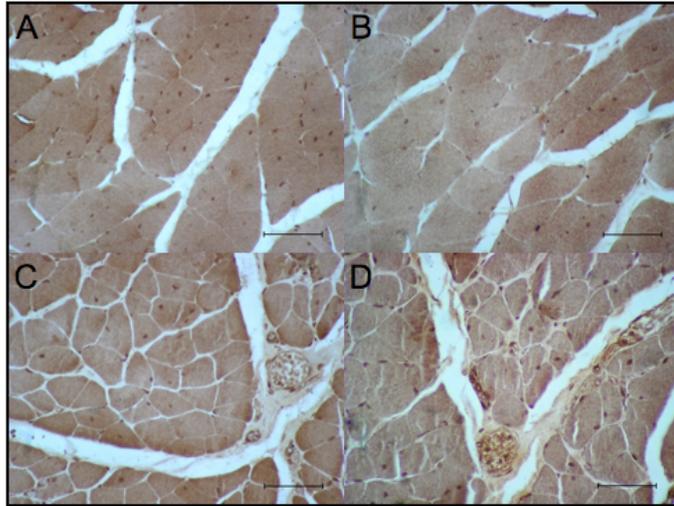


Figura 13. Expresión de los subtipos α y β del receptor de estrógenos (RE) en el músculo bulboespongioso (mBe) de conejas vírgenes (V) y múltiparas (M). Cortes transversales (7 μ m) de conejas V (A y B) y M (C y D) en el que se observan núcleos inmunorreactivos anti-RE α (A y C), y anti-RE β (B y D). Escala, 50 μ m. Número de núcleos periféricos inmunorreactivos anti-RE α (E) y anti-RE β (F). Los datos se representan y analizan como en la *Figura 12*. NI, núcleos periféricos inmunorreactivos.

7.6. *Experiencia reproductiva y características histológicas del mPc*

El análisis histológico se hizo mediante la tinción de hematoxilina-eosina (H-E). La multiparidad modificó el tamaño y la forma (más redondas) de las fibras estriadas del mPc (fig. 14). Otra característica encontrada en las fibras estriadas del mPc de las conejas fue una mayor cantidad de núcleos periféricos.

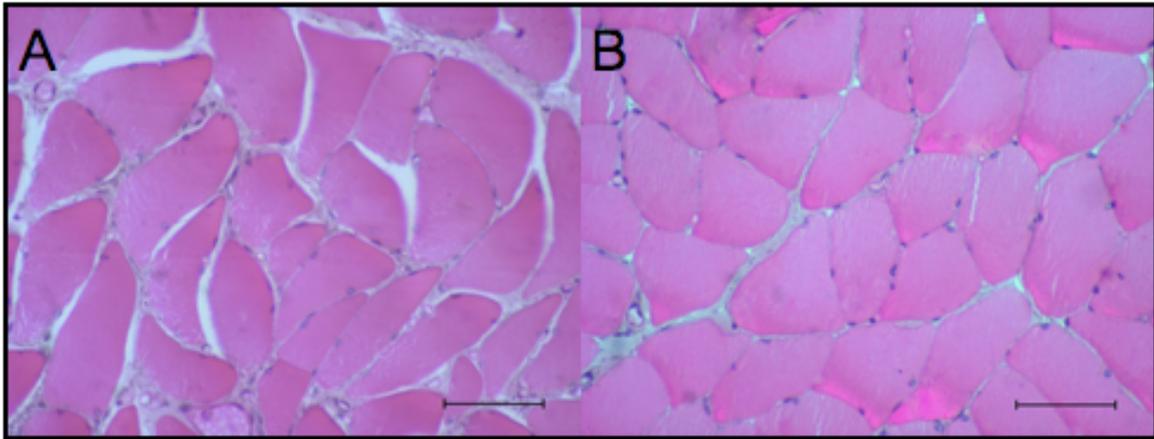


Figura 14. Histología del músculo pubococcígeo (mPc) de conejas vírgenes (V) y multíparas (M). Cortes transversales (7 μm) de conejas V (A) y M (B) teñidos con hematoxilina-eosina . Escala, 50 μm .

En promedio, el área transversal de las fibras del mPc fue mayor en las conejas multíparas que en las vírgenes (fig. 15; 2432 ± 46.58 vs 1773 ± 139.5 μm^2 ; $P = 0.0012$). El histograma de áreas evidenció un cambio en la distribución de áreas asociado con la experiencia reproductiva (fig. 16). En este sentido se encontró una mayor proporción de fibras en los intervalos de área mayores que 1500 μm^2 . Este efecto se complementó con una reducción en la proporción de fibras mayores que 500 pero menores que 1500 μm^2 .

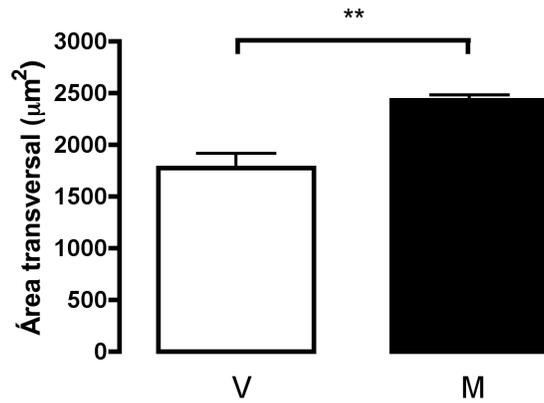


Figura 15. Área transversal de las fibras del músculo pubococcígeo (mPc) de conejas vírgenes (V) y múltiparas (M). Los datos representan la media \pm e.e. de 16 fibras analizadas por coneja. (V, n= 6; M, n= 6). Los datos fueron analizados mediante una t de Student para grupos independientes; ** $P < 0.01$.

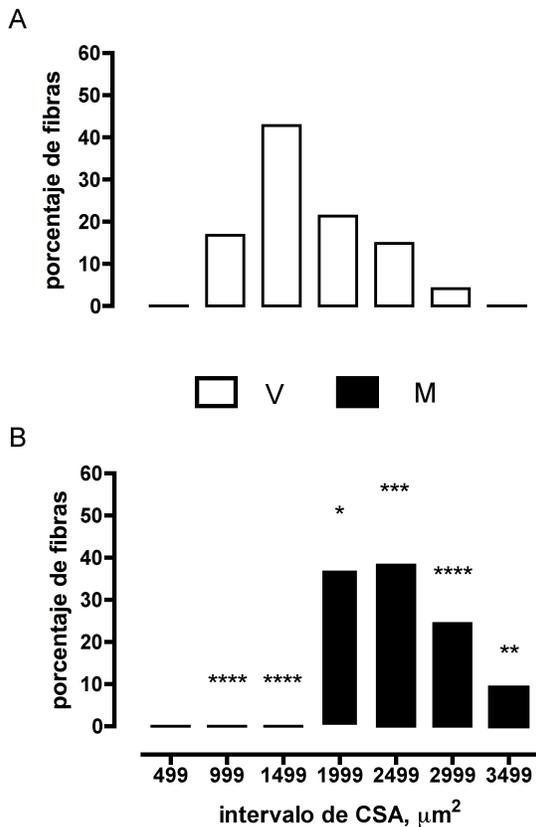


Figura 16. Área transversal de las fibras del músculo pubococcígeo de conejas vírgenes (V, barras claras) y múltiparas (M, barras negras) distribuidas en rangos de 500 μm^2 . Los datos representan la frecuencia absoluta expresada como porcentaje de fibras contenidas en cada intervalo. (V, n= 6; M, n= 6). F de Fisher, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ y **** $P < 0.001$.

El análisis histológico se complementó con la cuantificación de núcleos periféricos por fibra teñidos con H-E (fig. 17). Las hembras multíparas tuvieron un número mayor de núcleos que las conejas vírgenes (3.70 ± 0.36 vs. 2.19 ± 0.27 ; $P = 0.0077$).

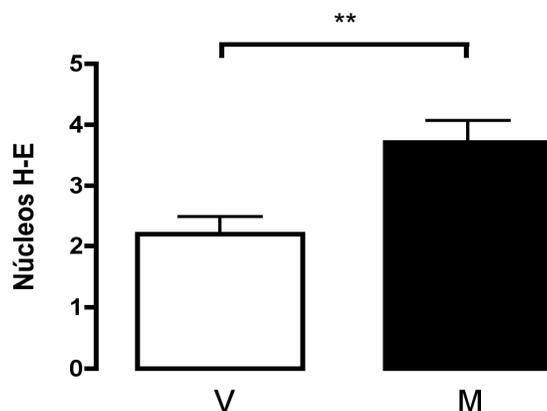


Figura 17. Núcleos periféricos por fibra en el músculo pubococcígeo (mPc) de conejas vírgenes (V) y multíparas (M). Núcleos periféricos de fibras musculares teñidos con hematoxilina-eosina (H-E). Los datos representan la media \pm e.e. de 16 fibras analizadas por coneja. (V, n= 6; M, n= 6). Los datos fueron analizados mediante una t de Student para grupos independientes; ** $P < 0.01$.

7.7. Experiencia reproductiva y características histológicas del mBe

El análisis histológico se hizo, al igual que para el mPc, mediante la tinción de H-E. La multiparidad no tuvo cambios evidentes en el tamaño de las fibras pero si en su forma (fig. 18). También se observó en el mBe del grupo M una mayor cantidad de núcleos periféricos en las fibras estriadas, en comparación con el grupo V.

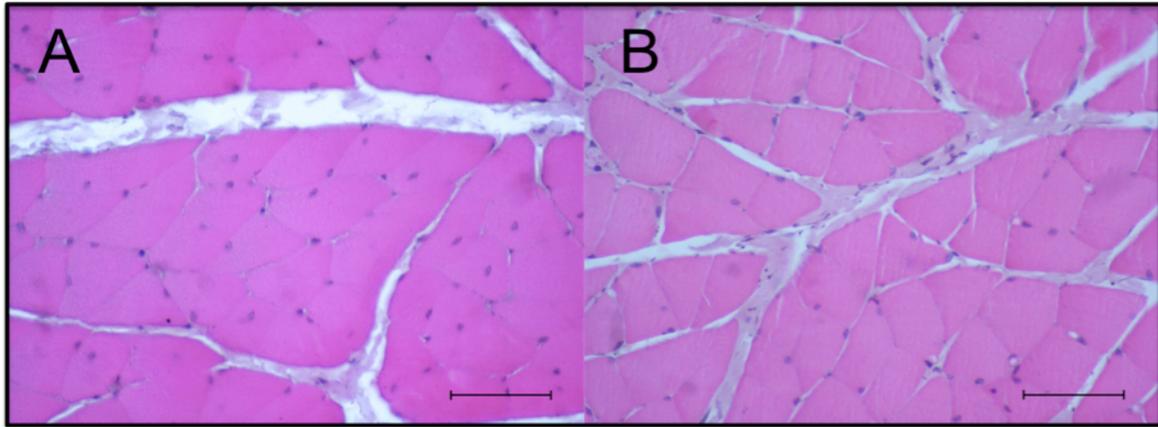


Figura 18. Histología del músculo bulboesponjoso (mBe) de conejas vírgenes (V) y múltiparas (M). Cortes transversales (7 μm) de conejas V (A) y M (B) teñidos con hematoxilina-eosina . Escala, 50 μm .

El área transversal de las fibras del mBe de las conejas vírgenes y las múltiparas (fig. 19) fue similar (1061 ± 128.9 vs $816 \pm 46.39 \mu\text{m}^2$, $P= 0.1040$). El análisis de la distribución de áreas indicó una mayor proporción de fibras con área mayor entre los rangos de 1500 -1999 y 2000-2499 μm^2 en las hembras múltiparas respecto a las hembras vírgenes (fig. 20A). El grupo M presentó fibras de entre 2000-2499 μm^2 ausentes en el grupo V (fig. 20B).

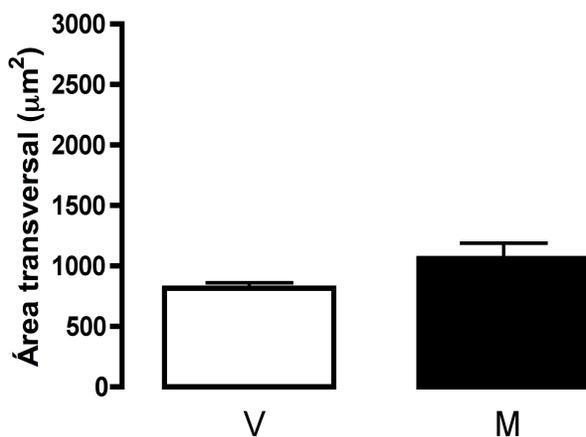


Figura 19. Área transversal de las fibras del músculo bulboesponjoso de conejas vírgenes (V) y múltiparas (M). Los datos representan la media \pm e.e. de 16 fibras analizadas por coneja. (V, n= 6; M, n= 6).

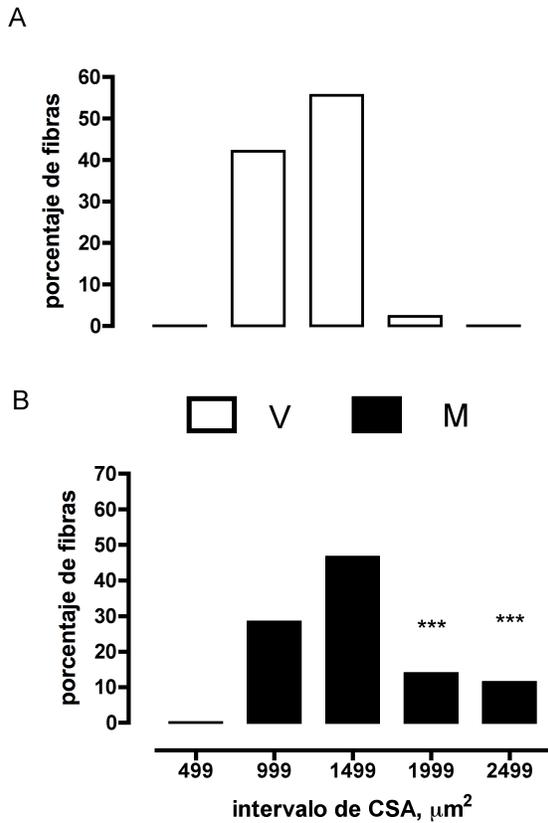


Figura 20. Área transversal de las fibras del músculo pubococcígeo de conejas vírgenes (V, barras claras) y múltiparas (M, barras negras) distribuidas en rangos de $500 \mu\text{m}^2$. Los datos representan la frecuencia absoluta expresada como porcentaje de fibras contenidas en cada intervalo. (V, n= 6; M, n= 6). F de Fisher, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ y **** $P < 0.001$.

El número de núcleos periféricos por fibra en hembras múltiparas no fue diferente del observado en el mBe de las conejas vírgenes (fig. 21; 1.65 ± 0.11 vs 1.43 ± 0.13 ; $P = 0.2466$).

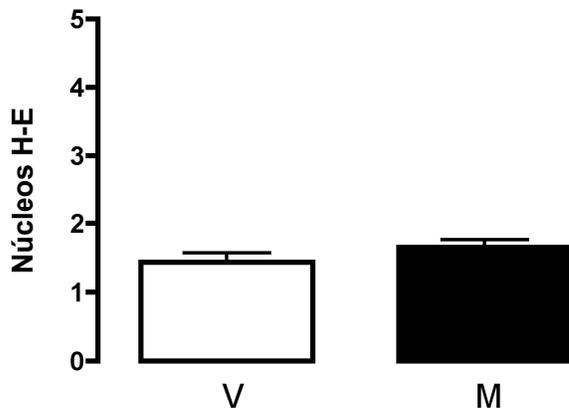


Figura 21. Núcleos periféricos por fibra en el músculo bulboesponjoso (mBe) de conejas vírgenes (V) y múltiparas (M). Núcleos periféricos de fibras musculares teñidos con hematoxilina-eosina (H-E). Los datos representan la media \pm e.e. de 16 fibras analizadas por coneja. (V, n= 6; M, n= 6). Los datos fueron analizados mediante una t de Student para grupos

8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta Tesis muestran que la experiencia reproductiva modificó la concentración sérica de estradiol (E2), y la expresión de los subtipos α y β del receptor de estrógenos (RE) en un músculo estriado pélvico (el pubococcígeo) y otro perineal (el bulboesponjoso). El cambio de estos parámetros estrogénicos estuvo asociado con cambios histológicos observados en esos músculos. En conjunto estos hallazgos sugieren que la experiencia reproductiva promueve un cambio en la sensibilidad estrogénica, que es capaz de alterar la fisiología de músculos pélvicos y perineales en la coneja.

8.1. Experiencia reproductiva y concentración de estradiol

En hembras de mamíferos, la experiencia reproductiva incluye la cópula, la gestación, el parto y la lactancia. Todos estos eventos son promovidos por procesos fisiológicos y conductuales en los que la comunicación hormonal es fundamental. Datos obtenidos en diversas hembras de mamíferos han reportado la fluctuación de varias hormonas durante la experiencia reproductiva (González-Mariscal 1994; Xiao y Da 2010; Riveros y cols. 2009; Matt y cols. 1986; Bridges & Byrnes 2006). Entre esas se encuentra el E2. Los resultados mostrados en la figura 8 sugieren que la concentración de E2 sérico cambia durante las cuatro gestaciones de la coneja Chinchilla. En comparación con los niveles de E2 antes de la primera cópula, se observó una reducción en el E2 sérico a los seis días de gestación. En los días siguientes, se observó un patrón ascendente que alcanzó un máximo el día 30 de gestación. Si bien esos resultados corresponden al patrón de sólo dos conejas, éstos son consistentes con lo reportado en conejas primíparas de raza Nueva Zelanda (Orstead y cols. 1988 ; González-Mariscal y cols. 1994; Negatu y McNitt 2002). La figura 8 sugiere que la fluctuación de E2 durante la segunda gestación fue similar a la de la primera. Pero este no pareció ser el caso para la tercera y la cuarta en la que el máximo de E2 pareció menor que en las primeras dos gestaciones. Un resultado similar se ha observado en la rata (Matt y cols. 1986). Considerando los resultados de la figura 8 y la bibliografía relacionada con ella, se procedió a cuantificar los niveles de E2 en los días 6 y 30 de la segunda y cuarta gestación, durante la experiencia

reproductiva de la coneja.

La concentración máxima de E2 en la segunda gestación no se observó al término de la cuarta (fig. 9). Este hallazgo es novedoso y es la primera vez que se reporta para la coneja. La concentración máxima de E2 pudiera estar relacionada con el intenso estro posparto observado después de dos partos en la coneja (Beyer y Rivaud 1969). Sin embargo, esto podría ser diferente para los siguientes partos. En este contexto, hemos observado que la proporción de conejas que requieren más de una sesión copulatoria (para aceptar al macho incrementa después de dos partos (tabla 4). Es probable que esa disminución en la receptividad de la hembra se encuentre asociada con la pérdida del pico de E2 en la tercera y cuarta gestación. En este sentido, otras funciones dependientes de esa concentración máxima de E2 podrían verse modificadas.

Tabla 4. Porcentaje de hembras que requirieron más de una sesión copulatoria previo a cada gestación.

<i>Gestación</i>	<i>%, (proporción) de hembras</i>
0 (vírgenes)	17, (1/6)
1	17, (1/6)
2	66, (4/6)
3	50, (3/6)

Cambios en la concentración de E2 han sido reportados en ratas multíparas y primíparas. Los niveles de E2 son menores para la cuarta y quinta gestación en comparación con los de la primera (Matt y cols. 1986) y estos coinciden con una disminución en la concentración de prolactina en la lactancia. En comparación con ratas nulíparas, las primíparas tienen niveles reducidos de E2 sérico (en el proestro) que promueven un incremento en la expresión del RE α hipofisiario y una disminución en la concentración sérica de prolactina, (Bridges y Byrnes 2006). En esta especie es probable que la disminución en la secreción de E2 esté relacionada con modificaciones en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, a diferencia de lo que ocurre en la mujer en donde está más relacionada con la función ovárica (Bridges y Byrnes 2006). En la

coneja, es necesario estudiar con detalle los mecanismos que pudieran promover los cambios en la secreción de E2 que ocurren durante la experiencia reproductiva. Al respecto, una falla ovárica es difícil de suponer considerando que no hay diferencia entre el E2 sérico de las conejas múltiparas en comparación con las vírgenes (fig. 10).

Las alteraciones observadas en la secreción de E2 durante la experiencia reproductiva no se observaron 21 días después del cuarto parto en las conejas múltiparas (fig. 10). Se ha encontrado por Larionov y cols. que el músculo estriado es capaz de sintetizar E2 mediante una aromatasa interna (Larionov y cols. 2003), misma que podría estar influyendo directamente sobre la modulación de la expresión de sus receptores en éste órgano blanco. En este modelo, esta modulación diferencial en ambos músculos puede deberse no sólo de la concentración de E2 producida por la fuente principal (ovarios), sino también de aquella que pudiera estar siendo producida en el músculo y utilizada mediante un tipo de comunicación autocrina.

8.2. Experiencia reproductiva y expresión del receptor de estrógenos en el mPc y mBe

Se ha encontrado que una modificación en la concentración sérica de E2 afecta la fisiología de sus órganos blanco, incluida la musculatura estriada (Alonso y cols. 2006, Morán y cols. 2006, Moran y cols. 2007). En este trabajo se encontró que el mPc y el mBe expresan los subtipos α y β del RE (fig. 11), tal como se ha reportado para la musculatura estriada, de las extremidades, de especies como la rata, el ratón (Yu y Leung 1982, Alonso y cols. 2006, Barros y cols. 2006, McClung y cols. 2006, Moran y cols. 2006) y el cerdo (Kalbe y cols. 2007), entre otros. La mayoría de los trabajos donde analizan el efecto del E2 y la modulación de la expresión de sus receptores se han llevado a cabo en músculos de las extremidades como el soleo y el EDL (extensor largo de los dedos). El nuestro es el primer trabajo que identifica la expresión de ambos subtipos del receptor en un músculo pélvico y otro perineal. Una de las terapias utilizadas para el tratamiento de desórdenes en el aparato urogenital que incluyen la incontinencia urinaria por estrés (IUS), el síndrome de vejiga hiperactiva y las recurrentes infecciones urinarias, entre otras, es la Terapia de Reemplazo Hormonal (HRT). Aunque se cree

que ésta terapia es útil, no hay información precisa sobre la eficacia de su uso como tratamiento en éstos padecimientos. El trasfondo de la administración de la HRT en la uroginecología es la identificación de ambos subtipos (α y β) del RE y del receptor de progesterona en estructuras que sostienen el piso pélvico, la vagina y la uretra, entre otras (Rechberger y Skorupski 2007). Las hormonas esteroideas no son el único factor que pudieran estar apoyando la etiología de la incontinencia urinaria (IU), sino que también el parto por vía vaginal. Datos de estudios con modelos naturales y de simulación del parto han sugerido que el daño en los nervios y los músculos del piso pélvico que conlleva el parto por vía vaginal promueve el desarrollo de incontinencia urinaria (Snooks y cols. 1990). Si bien ahora se sabe que ambos factores (mecánico y hormonal) son importantes para el mantenimiento de la integridad de las estructuras que participan en procesos reproductivos y de la micción, es importante analizar los cambios y los efectos que ocurren durante la experiencia reproductiva haciendo un énfasis en el factor hormonal y su capacidad para mantener la funcionalidad de sus órganos blanco. Los resultados mostrados en esta tesis proporcionan evidencia de la musculatura pélvica (mPc) y perineal (mBe) de la coneja como blanco directo para los estrógenos. En este sentido, la coneja resultaría un buen modelo para evaluar el impacto de la fluctuación de estrógenos sobre la fisiología de los músculos estriados asociados con el aparato urogenital femenino.

En la coneja doméstica, se ha encontrado que los músculos mPc y el mBe son importantes para la cópula, el parto (Cruz y cols. 2002) y la micción (Corona-Quintanilla 2009). De acuerdo a los resultados de este trabajo, se ha demostrado que ambos músculos son sensibles a estrógenos porque expresan ambos subtipos del RE. Aunque la expresión de los REs es similar para ambos músculos, la experiencia reproductiva modifica diferencialmente la expresión de ambos subtipos del RE (fig. 12 y fig. 13). En comparación con las conejas vírgenes, las multíparas tuvieron un incremento en la expresión del subtipo β en el mPc y el mBe; la expresión del subtipo α sólo incrementó en el mPc. Este hecho sugiere que la multiparidad modula de manera diferencial la sensibilidad estrogénica para cada músculo. De manera general, existen dos tipos de modulación (a la alta y a la baja) en la expresión de

receptores respecto a la concentración de su ligando. Si bien la concentración de E2 fue similar en las conejas vírgenes y multíparas, es probable que el E2 involucrado en modular la expresión de sus receptores pudiera estar siendo producida en sitios fuera del ovario. Al respecto, Larionov y cols. (2003) reportaron que el músculo estriado es capaz de sintetizar E2 mediante una aromatasa interna misma que podría estar influyendo directamente sobre la modulación de la expresión de sus receptores en éste órgano blanco.

Los datos presentados en esta Tesis muestran que el mPc y el mBe presentan una sensibilidad estrogénica (RE α y RE β) diferente. Ambos músculos son capaces de responder de manera distinta a las variaciones de la concentración sérica de E₂ circulante y posiblemente local. Al estar en una posición anatómicamente cercana (mPc, músculo pélvico; mBe, músculo perineal) sólo existe un incremento en del subtipo α (núcleos inmunorreactivos al RE α) en el mPc a diferencia de lo encontrado en el mBe en hembras multíparas. Que el mBe de las hembras multíparas sólo presente un incremento en el número de núcleos inmunorreactivos para el subtipo β no indica que éste sea menos sensible a los efectos de los estrógenos. En términos de regeneración, es probable que éste último tenga una recuperación más rápida o que ésta no se haya presentado aún. Ésto pudiera estar relacionado con el contenido de fibras de tipo II. Las fibras rápidas de tipo II (selectivamente las fibras de tipo IIx) muestran una mejor recuperación frente a la denervación que las fibras lentas (tipo I) (Mendler y cols. 2008).

De acuerdo a la función que desempeña cada subtipo del RE es probable que la regulación en su expresión sea tejido-específico como se ha observado en cuanto al tipo de fibra que constituye a un músculo. El músculo, es un tejido heterogéneo que está constituido por tres tipos de fibras principalmente: fibras de tipo I (lentas), de tipo IIa (intermedias) y IIx (rápidas). Se ha demostrado que los músculos compuestos en su mayoría por fibras de tipo I presentan una mayor concentración del RE (Gustafsson y cols. 1984). En base a la respuesta del mPc y el mBe ante un estímulo tetánico reportado por Fajardo y cols. (2008), el mPc puede ser caracterizado como un músculo lento, compuesto en su mayoría por fibras de tipo I, y el mBe como un músculo intermedio conformado principalmente por fibras de tipo IIa y IIx

pero también por fibras de tipo I. Nuestros resultados concuerdan con lo obtenido por Gustafsson y cols (1984). El mPc de las hembras multíparas presenta un mayor número de núcleos periféricos inmunorreactivos tanto al RE α como al RE β . En este caso, la multiparidad es un factor que incrementa la expresión de ambos subtipos del RE sólo en este músculo pélvico y no en el perineal. En el mBe sólo se presentó un incremento en el número de núcleos periféricos inmunorreactivos al subtipo β . La modificación en la expresión del subtipo α podría ser un indicador de cambios plásticos asociados con el tipo de fibra que componen al músculo y/o con procesos de regeneración muscular. Durante el proceso de regeneración muscular, existe la activación de un conjunto de marcadores moleculares como Pax7, MyoD y miogenina entre otros, que son capaces de indicar la etapa del proceso de regeneración en la que se encuentra un músculo. La regulación de la expresión de éstos marcadores en el proceso de regeneración de la musculatura estriada son mediados vía RE α (Galluzzo y cols. 2009, Tiidus y Enns. 2009).

Hasta ahora, es inexistente la información acerca de la regulación en la expresión del RE β respecto al tipo de fibra que componen un músculo. La condición de multiparidad es capaz de incrementar la presencia de núcleos inmunorreactivos al RE β en la musculatura estriada pélvica (mPc) y perineal (mBe). Barros y cols. (2006) encontraron que la señalización estrogénica a través del RE β es insuficiente para movilizar transportadores de glucosa 4 (GLUT4) a la membrana. Por lo que en hembras multíparas, es posible suponer que una regulación a la alza del RE β en músculos estriados 52 esté asociado con cambios en la homeostasis de la glucosa como aquellos observados por González y cols. (2002) durante la gestación.

Con base en los resultados obtenidos podemos suponer que el mPc es más sensible a los cambios en la variación de la concentración sérica de E2 a los 21 días después del último parto en hembras multíparas. Hasta aquí se puede concluir que la modulación de los subtipos del RE es independiente para cada tejido. Sin embargo, es importante integrar los diferentes factores que involucran la actividad de los receptores como aquellos receptores que pueden ser ocupados, su sensibilidad y la disponibilidad del ligando para crear un panorama completo de

la actividad biológica que éste sistema pudiese estar ejerciendo. Una mayor expresión del RE α indica la activación no sólo de la vía canónica, relacionada con éste subtipo de receptor, sino también de algunas rutas de señalización involucradas con el proceso antiapoptótico (AKT) y de regeneración celular importantes en los primeros pasos de la diferenciación muscular (expresión de MyoD, MHC y formación de mioblastos) (Galluzo y cols. 2009). Debido a que el RE β no ejerce un efecto considerable sobre la recuperación y resistencia a la fatiga de la musculatura estriada en las hembras (Glenmark y cols. 2004), la pérdida en el patrón de coordinación de los mPc y mBe durante el proceso de micción en hembras múltiparas (Martínez-Gómez y cols. en preparación) y el cambio en la fuerza de contracción en respuesta a dos diferentes estímulos eléctricos (Fajardo y cols. 2008) podría estar relacionada con la regulación directa de la expresión del subtipo α . El estado de la inervación de ambos músculos es otro factor que influye sobre la respuesta de éstos a diversos estímulos y su actividad fisiológica. Un ensayo que identifique la integridad de su inervación podría esclarecer si el efecto sobre la fisiología de ambos músculos en hembras múltiparas se debe sólo al estado hormonal, a una alteración en su inervación o a ambos sucesos.

En la coneja el mPc y el mBe son importantes para la fisiología de la reproducción (Cruz y cols. 2002) y de la micción (Corona-Quintanilla y cols. 2009). En este modelo se ha observado que la multiparidad altera el patrón de micción a través de un mecanismo que desorganiza la actividad de ambos músculos (Martínez-Gómez y cols. enviado). En comparación con las conejas vírgenes, la contracción del mPc y del mBe en las conejas múltiparas es menor y se presenta en fases en las que no se presentaban convirtiendo una actividad coordinada de los músculos participantes en una respuesta desorganizada dentro del proceso de la micción. Ésto pudiera ser explicado por la variación en el tipo de fibras existente entre los músculos de ambos grupos (Fajardo y cols. 2008). En la rata, la ovariectomía reduce la fuerza de contracción muscular y la restitución hormonal la restablece mediante un mecanismo que involucra la fuerza de los enlaces de miosina (Moran y cols. 2006). Los patrones en la expresión de las cadenas pesadas de miosina (MHC) define la velocidad de contracción de un músculo y es un factor importante para que desarrolle su función. Velders y

cols. (2008) encontraron que la composición de MHC de la musculatura estriada es afectada por los estrógenos de una manera específica al tipo de fibra y que estos efectos son mediados principalmente vía RE β . Si en la coneja existe una disminución en el pico máximo de E₂ en la cuarta gestación respecto a la segunda, es posible que en base a los resultados obtenidos se sugiera que la sensibilidad diferencial de los mPc y mBe presentada puede modificar las propiedades contráctiles de ambos músculos en la coneja. Sin embargo, deben evaluarse modificaciones en la inervación, la composición y el proceso de recuperación/regeneración para cada músculo.

8.3. Experiencia reproductiva y características histológicas del mPc y mBe

El músculo esquelético es un tejido muy heterogéneo y con la capacidad de adaptarse a los diferentes cambios que puedan presentarse. La necrosis de las fibras musculares es una de las primeras etapas del daño muscular. Ésta es generalmente provocada por una alteración en las miofibras del sarcolema que resulta en un incremento en su permeabilidad. Este hecho pudiera estar explicando el cambio en las características histológicas del mPc de hembras multíparas. El área transversal de las fibras del mPc en las hembras multíparas es mayor respecto al de las vírgenes. Una forma redondeada en las fibras estriadas de ambos músculos pudiera ser un indicio del aumento en la permeabilidad de las miofibras del sarcolema y del daño muscular provocado por los diferentes factores que involucra la experiencia reproductiva. El mPc de las hembras multíparas no sólo presentan diferencias significativas en la media del área transversal de sus fibras sino que existe un cambio en la distribución de éstas por rangos. Existe un desplazamiento de las fibras hacia los rangos con mayor área en ambos músculos de las hembras multíparas siendo mas evidente para el mPc. Este desplazamiento ocurre de igual manera en el área transversal de las fibras estriadas del mPc en ratas ovariectomizadas (Lara-García y cols. enviado).

La fuerza de contracción muscular es determinada por el área transversal fisiológica del músculo o de las fibras musculares y es el reflejo del número de sarcómeros que están trabajando en paralelo. Los músculos con una mayor proporción de fibras de mayor área

transversal desarrollan una mayor fuerza isométrica y específica por unidad de área (Harridge 2007). El incremento en el número de fibras con una menor área transversal está asociado con la etapa de recuperación por reinervación, por lo que su incremento es un indicador del nivel de recuperación en el que se encuentra el músculo (Mendler y cols. 2008). Este suceso es más notable en el mPc, por lo que se puede suponer que su recuperación en respuesta al daño que pudo haber causado el trauma del parto es más rápida en éste músculo en comparación con el perineal (mBe).

Otro indicador del proceso de degeneración/regeneración es un incremento en el número de núcleos. En la coneja doméstica, la experiencia reproductiva incrementa el número de núcleos periféricos de las fibras musculares del mPc. Cualitativamente, también se encontró un incremento en el número de núcleos en el tejido conectivo e incluso en el interior de las fibras musculares (datos no mostrados). Por lo que es posible deducir, en base al incremento en el número de núcleos inmunorreactivos al RE, que los nuevo núcleos en el mPc expresan alguno o los dos subtipos del RE. El mBe no presentó un incremento en el número de núcleos periféricos, por lo que es posible que el incremento en la expresión del RE β se esté llevando a cabo en los núcleos ya existentes por una sobreexpresión o movilización del receptor hacia esos núcleos. Los estrógenos tienen la capacidad de regular diversos procesos asociados con la masa del músculo esquelético y su regeneración, lo que indica su potencial como modulador en la recuperación del músculo en la atrofia por desuso (Levin 2001). La primera fase de una lesión muscular va usualmente acompañada por la activación de células mononucleadas, principalmente células inflamatorias y células miogénicas como las *stem cells* y las células satélite (Tidball 1995) por lo que los núcleos marcados en tejido conectivo y el interior de las fibras pudieran estar correspondiendo a dichas células. El crecimiento y la reparación del músculo están directamente relacionados con la activación de ese grupo de precursores miogénicos (ej. células satélite). Se ha demostrado que los estrógenos, junto con la testosterona, tienen un efecto positivo en la activación de algunos factores de crecimiento como el factor de crecimiento parecido al de la insulina (IGF-1) el cual es un potente activador de las células satélite en músculo (Durand 2009). La activación y la proliferación de las

células satélite funcionan como mecanismos adaptativos y de reparación local. Éstas pueden ser activadas para regenerar o incrementar el tamaño de las fibras musculares. Cada etapa de la reparación muscular es caracterizada por la expresión de una serie de diferentes marcadores. Cuando las células satélite se encuentran inactivas existe la expresión de marcadores superficiales celulares como CD34, Pax7 y un regulador miogénico (Myf5). La activación de las células satélite es caracterizada por la activación de MRF y MyoD, un par de marcadores miogénicos tardíos. MyoD es una proteína con una función clave en la diferenciación muscular, es conocida como uno de los factores reguladores miogénicos (MRFs) la cual es expresada sólo en células satélite activas. En nuestro grupo hemos determinado la expresión de MyoD en el mPc y mBe de las conejas utilizadas este proyecto. Los resultados obtenidos evidenciaron que el mBe de las hembras múltiparas tiene una mayor expresión de MyoD que el grupo de vírgenes. Pero éste no fue el caso para el mPc (López-García en proceso). Por lo que un mayor marcaje de dicha proteína en el mBe, en comparación con el mPc, podría estar indicando la fase del ciclo de reparación en la que se encuentran las fibras musculares. Esta respuesta particular del mBe respecto al mPc indica una sensibilidad diferencial al daño neuromuscular o/y hormonal a causa de la experiencia reproductiva. La regeneración muscular es un proceso que incluye diversas etapas a) una reacción inflamatoria (activación de macrófagos), b) la activación, diferenciación y fusión de células satélite y c) la maduración de las miofibras (Ciciliot y Schiaffino 2010).

La utilización de la coneja doméstica como modelo de estudio nos permite conocer y dar una aproximación de lo que pudiese estar sucediendo en la mujer cuando presenta uno o múltiples partos. La edad y la multiparidad están asociadas con una disminución en la concentración sérica de estradiol así como con la presencia de trastornos fisiológicos donde encontramos la incontinencia urinaria (IU). La IU se presenta cuando los músculos del piso pélvico pierden la fuerza de contracción, modifican la posición anatómica de la vejiga y/o pierden la coordinación para controlar el proceso de micción. Los estudios en mujeres, como resultado del análisis de de biopsias, no han aportado la información suficiente para determinar si la alteración en la fisiología de los músculos pélvicos y perineales se debe sólo al

daño mecánico durante la labor de parto y/o a una alteración en los niveles hormonales como consecuencia de la fluctuación hormonal característica que se presenta durante los procesos de gestación, parto y lactancia y que podrían estar siendo modificados después de la exposición repetida a esos sucesos. Por eso, la utilización de la coneja doméstica como modelo de estudio, nos permiten conocer más al respecto poniendo al alcance los tejidos y órganos de estudio que en la mujer son de difícil acceso. Aunque la rata es el modelo de estudio más utilizado, los músculos analizados en éste trabajo están más desarrollados en la coneja doméstica. La característica de la coneja doméstica como modelo de reproducción la hace un modelo propio para el estudio de los efectos de la multiparidad sobre el estado hormonal del individuo y la fisiología de algunos órganos y tejidos. Si bien con éstos resultados se sabe que la musculatura estriada pélvica (mPc) y perineal (mBe) es sensible a estrógenos y que son dañados por la labor del parto vía vaginal, la descripción de las etapas del posible daño y regeneración podrían aportar información relevante para la aplicación de alguna terapia celular específica que incluso podría ser preventiva.

9. MODELO

Durante la experiencia reproductiva coinciden dos factores relacionados con los hallazgos presentados en esta tesis. El mecánico debido, principalmente, a los cuatro partos consecutivos que tuvieron las conejas multíparas, y el endocrino debido a las fluctuaciones hormonales asociadas con los episodios de cópula, gestación, parto y lactancia. Dentro del factor mecánico deben considerarse la compresión, distensión y ruptura de las fibras nerviosas relacionadas con la actividad de los músculos pélvicos (pubococcígeo) y perineales (bulboesponjoso) que participan en el proceso de micción de la coneja (Corona-Quintanilla y cols. 2009). El cambio en la actividad electromiográfica de cualquiera de ellos, o de ambos, pudiera explicar la pérdida de su coordinación durante el proceso de micción en la coneja multípara (Martínez-Gómez y cols. enviado). También es posible que el (los) parto(s) afecten su mecánica contráctil, tal y como nuestro grupo ha descrito previamente (Fajardo y cols. 2008). La contribución del factor mecánico también pudiera modificar la función de la vejiga, la uretra y el conducto vaginal, lo que explicaría los cambios encontrados en algunas variables urodinámicas en las conejas multíparas de cuatro partos (Martínez-Gómez y cols. enviado).

La experiencia reproductiva involucra una serie de cambios endocrinos relacionados con los episodios de cópula, gestación, parto y lactancia. En esta tesis hemos evaluado la concentración sérica de estradiol (E2) en función de la experiencia reproductiva de cuatro partos. Nuestros datos evidenciaron un pico en la concentración máxima de esta hormona en el día 30 de la segunda gestación, similarmente a lo reportado para la primera gestación de la coneja (Orstead y cols. 1988 ; González-Mariscal y cols. 1994; Negatu y McNitt 2002). Esta concentración máxima no se encontró en la cuarta gestación. Es posible que la pérdida del pico de secreción de estradiol al final de la cuarta gestación esté relacionada con cambios que relacionados con el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Dentro de las vías que pudieran ser afectadas encontramos la producción de hormona luteinizante (LH), la función ovárica y las vías de retroalimentación del E2 hacia las neuronas productoras de gonadotropinas (GnRHs) y/o los gonadotropos liberadores de GnRH. Es probable que la disminución de la receptividad

que se presenta en las conejas después de tres partos, esté relacionada con una reducción en la concentración sérica de E2.

La pérdida del pico de secreción de estradiol afectaría a la vejiga y músculos estriados como la uretra y los pélvicos y perianales. Pero éste es un evento que podría resultar breve en términos temporales, ya que veinte días después del cuarto parto no se encontraron diferencias en la concentración sérica de estradiol entre las conejas vírgenes y las multíparas. Por lo anterior resulta difícil suponer la consecuencia de este cambio hormonal en aquellos tejidos en los que la información existente se ha realizado en animales ovariectomizados durante períodos de tiempo prolongados. Sin embargo, el incremento en la expresión del receptor de estrógenos en el mPc y el mBe de las conejas multíparas, sugiere que ambos sensores una disminución en la concentración sérica de E2, o bien, que sensores una disminución en la concentración de E2 sintetizada, quizá por un proceso de aromatización (Larionov y cols. 2003), en el propio músculo.

La modulación diferencial de la expresión de los subtipos α y β del RE coincidió con modificaciones diferenciales en características histológicas como el área transversal de la fibra (CSA) y el número de mionúcleos en el mPc y el mBe. El incremento en el CSA promovido por la experiencia reproductiva y encontrado para ambos músculos, pudiera estar asociado con los cambios en las propiedades contráctiles reportadas por Fajardo y cols. (2008). El incremento en el número de mionúcleos observado en el mPc de las conejas multíparas sugiere el desarrollo de un proceso de degeneración/regeneración muscular, que pudiera ser distinto para el mBe. Considerando que un incremento en el CSA y en el número de mionúcleos en el mPc son indicadores de un proceso de daño muscular, podría especularse que la pérdida del pico máximo de E2 al final de la cuarta gestación estaría condicionando la etapa de regeneración del mPc y/o del mBe, y con ello probables cambios en las propiedades contráctiles de ambos.

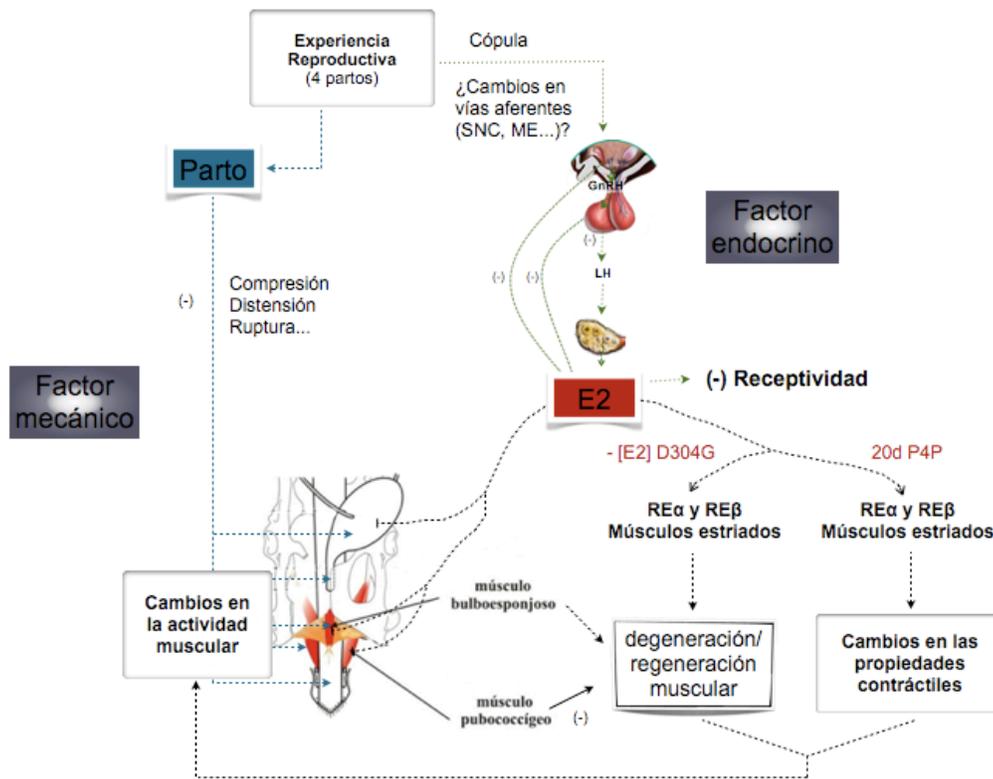


Figura 22. Modelo esquemático de los factores presentes durante la experiencia reproductiva de la coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*) que pudieran estar influyendo sobre su conducta y fisiología de la musculatura estriada pélvica (músculo pubococcígeo, mPc) y perineal (músculo bulboesponjoso, mBe).

10. CONCLUSIONES

- a) En la coneja, la experiencia reproductiva de cuatro partos modificó la sensibilidad estrogénica de los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso.
- b) La experiencia reproductiva que incluye cuatro gestaciones consecutivas sugiere una fluctuación de la concentración sérica de estradiol en cada una de ellas; la concentración máxima se cuantificó el día 30 de gestación. Este pico de estradiol no se observó al término de la cuarta gestación en comparación con el de la segunda. Veinte días después del cuarto parto, la concentración sérica de estradiol fue similar al de las conejas vírgenes.
- c) Los músculos estriados pubococcígeo y bulboesponjoso expresan los subtipos α y β del receptor de estrógenos. La expresión de ambos subtipos se identificó en las los núcleos de las fibras musculares y en los del tejido conectivo de cada músculo. En el pubococcígeo la experiencia reproductiva (21 días después del cuarto parto) incrementó la expresión de los subtipos α y β del receptor. En el bulboesponjoso sólo se observó un incremento en la del subtipo β .
- d) La experiencia reproductiva (21 días después del cuarto parto) modificó características histológicas en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso. En el primero se encontró un incremento en el área transversal de la fibra, mientras que en el segundo no se encontró diferencia aunque la distribución del área transversal se encontró desplazada hacia rangos en que no se cuantificaron fibras en el grupo control. El número de mionúcleos por fibra incrementó en el pubococcígeo y no hubo cambios en el bulboesponjoso.

11. PERSPECTIVAS

Los datos obtenidos en esta Tesis mostraron que la experiencia reproductiva altera la concentración sérica de estradiol durante la gestación y modifica la expresión del receptor de estrógenos en los músculos mPc y mBe de las conejas con cuatro partos. La expresión diferencial de los subtipos α y β del receptor de estrógenos coincidió con modificaciones histológicas en ambos músculos. A continuación se enumeran algunas perspectivas derivadas de este trabajo.

Considerando que no hay diferencias en la concentración de estradiol antes de la primera cópula y después de cuatro partos, es difícil suponer que haya diferencias en la función ovárica. Si esto fuera así, entonces, ¿por qué el patrón de secreción de estradiol es diferente en la tercera y cuarta gestación respecto de las dos primeras? La cuantificación de hormona luteinizante (LH) y progesterona durante los períodos de gestación aportarían información relevante. La primera es la responsable de la secreción de estradiol por el ovario. La disminución de la segunda coincide con la elevación del estradiol sérico al final de cada gestación. Un cambio en la secreción de estas dos hormonas después de dos partos aportaría datos acerca de la regulación neuroendocrina de la secreción de estradiol y su relación con la experiencia reproductiva.

Una de las predicciones de este trabajo era que la concentración sérica de estradiol determinaría la expresión de sus receptores en los músculos analizados. Al momento de la disección de los músculos, la concentración de estradiol de las conejas vírgenes y multíparas fue similar. Sin embargo la expresión del receptor de estrógenos incrementó al menos para uno de los subtipos evaluados en cada músculo. Este hallazgo sugiere que tal modulación pudiera no depender del estradiol sistémico. En este sentido resultaría útil evaluar si el músculo estriado es capaz de sintetizar estradiol, que mediante una comunicación autocrina pudiera modular la expresión de sus receptores. Una alternativa sería determinar la expresión de aromatasa en cada uno de los músculos.

Los resultados presentados en este trabajo evidenciaron que la experiencia reproductiva (cuatro partos consecutivos) promueve modificaciones histológicas y de parámetros estrogénicos que pudieran estar relacionadas con un proceso de regeneración del mPc pero no del mBe. Considerando lo anterior, sería factible evaluar la expresión diferencial de marcadores moleculares asociados con la lesión y regeneración de músculos pélvicos (mPc) y perineales (mBe) en conejas vírgenes y multíparas. Esta aproximación aportaría información relevante acerca del grado de daño y regeneración de músculos estriados involucrados en el almacenamiento y expulsión de orina. El daño y/o regeneración de tales músculos podría(n) estar relacionado(s) con los cambios observados en actividad electromiográfica de estos músculos durante la micción en conejas multíparas (Martínez-Gómez y cols. enviado). De manera más general, los resultados de este proyecto contribuirían al conocimiento de los procesos celulares de otras patologías relacionadas con la degeneración muscular.

12. REFERENCIAS

- Ahmed-Sorour H y Bailey CJ.** 1980. Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis: Interaction with insulin, glucagon and epinephrine. *Horm Res* 13:396-403.
- Alonso A,** Fernández R, Ordoñez P, Moreno M, Patterson AM y González C. 2006. Regulation of estrogen receptor alpha by estradiol in pregnant and estradiol treated rats. *Steroids* 71: 1052-1061.
- Alvarado M,** Cuevas E, Lara-García M, Camacho M, Carrillo P, Hudson R y Pacheco P. 2008. Effect of gonadal hormones on the cross-sectional area of pubococcygeus muscle fibers in male rat. *The anatomical record* 291: 586-592.
- Barber MD.** 2005. Contemporary views on female pelvis anatomy. *Cleveland clinic journal of medicine.* Volume 72. S4: S3-S11.
- Barros PA,** Machado UF, Warner M y Gustafsson JA. 2006. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ER α and ER β . *PNAS.* Vol. 103 no. 5: 1605-1608.
- Beckett T,** Tchernof A y Toth M. 2002. Effect of ovariectomy and estradiol replacement on skeletal muscle enzyme activity in female rats. *Metabolism,* Col 51, no. 11: 1397-1401.
- Bernstein IT.** 1997. The pelvic floor muscles: muscle thickness in healthy and urinary-incontinent women measured by perineal ultrasonography with reference to the effect of pelvic floor training. *Estrogen receptor studies. Neurourol Urodyn;* 16(4): 237-75.
- Beyer C y Rivaud N.** 1969. Sexual behavior in pregnant and lactating domestic rabbits. *Physiol Behav* 4, 753-7.
- Bidmead J y Cardozo LD.** 1998. Pelvic floor changes in older woman. *British Journal of Urology.* 82, Suppl. 1: 18-25.
- Blakeman PJ,** Hilton P y Bulmer JN. 2000. Oestrogen and progesterone receptor expression in the female lower urinary tract, with reference to oestrogen status. *BJU International* 86, 32-38.

-
- Bridges RS y Byrnes EM.** 2006. Reproductive experience reduces circulating 17β -estradiol and prolactin levels during proestrus and alters estrogen sensitivity in female rats. *Endocrinology* 147(5): 2575-2582.
- Brown M.** 2008. Skeletal muscle and bone: effect of sex steroids and aging. *Adv Physiol Educ* 32: 120-126.
- Brown M.** 2009. Estrogen receptor (ER) α , ER β and Aromatase knock-out effects on lower limb muscle mass and contractile function in female mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* En prensa. Doi:10.1152/ajpendo.90696.
- Byrnes EM, Babb JA y Bridges RS.** 2009. Differential expression of oestrogen receptor α following reproductive experience in young and middle-aged female rats. *Journal of Neuroendocrinology* 21: 550-557.
- Castellini C, Dal Bosco A y Mugnai C.** 2003. Comparison of different reproduction protocols for rabbit does: effect of litter size and mating interval. *Livest Prod Sci* 83:131–134.
- Chargé SBR y Rudnicki MA.** 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 84: 209-238.
- Ciciliot S y Schiaffino S.** 2010. Regeneration of mammalian skeletal muscle: basic mechanisms and clinical implications. *Current Pharmaceutical Design* 16, 906-914.
- Copas P, Bukovsky A, Asbury B, Elder RF, and Caudle MR.** 2001. Estrogen, progesterone and androgen receptor expression in levator ani muscle and fascia. *Journal of women's health & gender-based medicine.* Volume 10, No. 8: 785-795.
- Corona-Quintanilla DL, Castelán F, Fajardo V, Manzo J y Martínez-Gómez M.** 2009. Temporal coordination of pelvic and perineal striated-muscle activity during micturition in female rabbits. *The Journal of Urology* Vol. 181: 1452-1458.
- Cruz Y, Hudson R, Pacheco P, Lucio RA y Martínez-Gómez M.** 2002. Anatomical and physiological characteristics of perineal muscles in the female rabbit. *Physiology & behavior* 75: 33-40.

-
- Driggers PH y Segars JH.** 2002. Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. Part II: the role of growth factors and phosphorylation. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism* Vol. 13 no. 10.
- Durand R.** 2009. Testosterone and estrogen increase satellite cells. *Muscular Development Online Magazine*.
- Enns DL y Tiidus PM.** 2008. Estrogen influences satellite cell activation and proliferation following downhill running in rats. *J Appl Physiol* 104: 347-353.
- Evans RM.**1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, Vol 240, 4854: 889-895.
- Fajardo V,** Pacheco P, Hudson R, Jiménez I y Martínez-Gómez M. 2008. Differences in morphology and contractility of the bulbospongiosus and pubococcygeus muscles in nulliparous and multiparous rabbit. *Int. Urogynecol J.* DOI 10.1007/s00192-007-0541-3.
- Flatt JP.** 1988. Importance of nutrient balance in body weight regulation. *Diabetes Metab Rev* 4: 571-581.
- Fu X,** Rezapour M, Wu X, Li L, Sjögren y Ulmsteen U. 2003. Expression of estrogen receptor- α and - β in anterior vaginal walls of genuine stress incontinent women. *Int Urogynecol J* (2003) 14: 276-281.
- Gayles EC,** Pagliassotti MJ, Prach PA, Koppenhafer TA y Hill JO. 1997. Contribution of energy intake and tissue enzymatic profile to body weight gain in high-fat-fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 272: R188-R194.
- Galluzzo P,** Rastelli Ch, Bulzomi P, Acconcia F, Pallottini V y Marino M. 2009. 17β -Estradiol regulates the first steps of skeletal muscle cell differentiation via ER α -mediated signals. *Am J Physiol Cell Physiol.* doi:10.1152/ajpcell.00188.
- Glenmark B,** Nilsson M, Gao H y Gustafsson. 2004. Difference in skeletal muscle function in males vs. females: role of estrogen receptor- β . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E1125-E1131.

-
- Gonzalez C**, Alonso A, Balbin M, Diaz F, Fernandez S, Patterson AM. 2002. Effects of pregnancy on insulin receptor in liver, skeletal muscle and adipose tissue of rats. *Gynecol. Endocrinol.* 16, 193–205.
- González-Mariscal G**, Díaz-Sánchez V, Melo AI, Beyer C y Rosenbatt JS. 1994. Maternal behavior in New Zealand white rabbits: quantification of somatic events, motor patterns, and steroid plasma levels. *Physiol. Behav.* 55, 1081-1089.
- Gustafsson JA**, Saartok T, Dahlberg E, Snochowski M, Haggmark I y Eriksson E. 1984. Studies on steroid receptors in human and rabbit skeletal muscle- clues to the understanding of the mechanism of action of anabolic steroids *Prog Biol Res* 142: 261-290.
- Hall JM**, Couse JF, Korach KS. 2001. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J. Biol Chem*;276(40):36869-368672.
- Harridge SDR**. 2007. Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function. *Exp Physiol* 92.5 pp 783–797.
- Herschorn S**. 2004. Female pelvic floor anatomy: the pelvic floor, supporting structures, and pelvic organs. *Rev Urol, suppl.* 6: S2.
- Hextall A**. 2000. Estrogens and lower urinary tract function. Elsevier: 83-92.
- Kahlert S**, Grohé C, Karas RH, Löbbert K y Neyses L. 1997. Effects of estrogen on skeletal myoblast growth. *Biochem Bioph Res Co.* 232: 373-378.
- Kalbe C**, Mau M, Wollenhaupt K y Rehfeldt. 2007. Evidence for estrogen receptor α and β expression in skeletal muscle of pigs. *Histochem Cell Biol* 127: 95-107.
- Katzenellenbogen BS**, Choi I, Delage-mourroux R, Ediger TR, Martini PGV, Montano M, Sun J, Weis K, Katzenellenbogen JA. 2000. Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 74: 279–285.
- Klutke CG y Siegel C L**. 1995. Functional female pelvis anatomy. *Urologic clinics of north america.* Volume 22, no. 3.
- Knutsson A**, Glenmark B, Bodin K, Jansson E y Enmark E. 2002. Estrogen receptor alpha and beta in human skeletal muscle. *FASEB J.* 16: A396.

-
- Lara-García M**, Alvarado M, Cuevas E, Cortés-Sol A, Domínguez A, Tovar A y Pacheco P. Androgenic-estrogenic sensitivity of pubococcygeus muscle fibres in female rats. Enviado.
- Larionov AA**, Vasyliov DA, Mason JI, Howie AF, Bernstein LM y Millyer WR. 2003. Aromatase in skeletal muscle. *Journal of Steroid Biochemistr & Molecular Biology* 84: 485-492.
- Lee SJ y McEwen BS**. 2001. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 41: 569-91.
- Levin ER**. 2001. Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J Appl Physiol*. 91: 1860-1867.
- López-García K**. Marcadores moleculares asociados con regeneración de la musculatura estriada pélvica y perineal de conejas multíparas. En proceso.
- Lukacz ES**, Lawrence JM, Contreras R, Nager ChW, y Luber KM. 2006. Parity, mode of delivery and pelvic floor disorders. *Obstetrics & gynecology*. Volume 107, no. 6.
- Madill SJ y McLean L**. 2006. Relationship between abdominal and pelvic floor muscle activation and intravaginal pressure during pelvic floor muscle contractions in healthy continent women. *Neurourol Urodyn* 25: 722.
- Martínez-Gómez M**, Lucio RA, Carro M, Pacheco P y Hudson R. 1997. Striated muscles and scent glands associated with the vaginal tract of the rabbit. *Anat Rec*. 247: 486-95.
- Martínez-Gómez M**, Mendoza G, Corona-Quintanilla DL, Fajardo V, Nicolás L y Castelán F. Multiparity-induced urodynamic dysfunction through an uncoordinated activity of pelvic and perineal striated-muscle in rabbits. Enviado.
- Matt DW**, Lee J, Sarver PL, Judd HI y Lu JKH. 1986. Chronological changes in fertility, fecundity and steroid hormone secretion during consecutive pregnancies in ageing rats. *Biol Reprod*. 34: 478-487.
- McClung JM**, Davis JM, Wilson MA, Goldsmith y Carson JA. 2006. Estrogen status and skeletal muscle recovery from disuse atrophy. *Appl Physiol*. 100: 2012-2023.

-
- Mendler L**, Pintér S, Kiricsi M, Baka Z y Dux L. 2008. Regeneration of Reinnervated Rat Soleus Muscle Is Accompanied by Fiber Transition Toward a Faster Phenotype. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. Volume 56(2): 111–123.
- Moralí G y Beyer, C.** 1979. Neuroendocrine control of mammalian estrous behavior. In: Beyer, C. (Ed.) *Endocrine control of sexual behavior*. Raven Press, New York, pp. 33-75.
- Moran AL**, Nelson SA, Landisch RM, Warren GL y Lowe DA. 2007. Estradiol replacement reverses ovariectomy-induced muscle contractile and myosin dysfunction in mature female mice. *J Appl Physiol* 102: 1387-1393.
- Moran AL**, Warren GL y Lowe DA. 2006. Removal of ovarian hormones from mature mice detrimentally affects muscle contractile function and myosin structural distribution. *J Appl Physiol* 100: 548-559.
- Negatu Z y McNitt JI.** 2002. Hormone profiles and nest-building behavior during the periparturient period in rabbit does. *Animal reproduction science* 72, 125-135.
- Orstead KM**, Hess DL y Spies HG. 1988. Pulsatile patterns of gonadotropins and ovarian steroids during estrus and pseudopregnancy in the rabbit. *Biology of reproduction* 38, 733-743.
- Patten RD**, Pourati I, Aronovitz MJ, Baur J, Celestin F, Chen X, Michael A, Haq S, Neudling S, Grohe C, Force T, Mendelsohn ME y Karas RH. 2004. 17Beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phosphor-inositide-3kinase/Akt signaling. *Circ Res* 95: 692-699.
- Paz da LHBC**, Falco de V, Teng NC, Reis dos LM, Pereira RMR y Jorgetti V. 2001. Effect of 17 β -estradiol or alendronate on the bone densitometry, bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 34: 1015-1022.
- Pelletier G y El-Alfy M.** 2000. Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4835-40.

-
- Persky AM**, Green PS, Stubley L, Howell CO, Zaulyanov L, Brazeau GA y Simpkins JW. 2000. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 223: 59-66.
- Peschers UM**, Vodusek DB, Fanger G, Schaer GN, DeLancey JO y Schuessler B. 2001. Pelvic muscle activity in nulliparous volunteers. *Neurourol Urodyn*; 20: 269.
- Piccone CM**, Brazeau GA y McCormick KM. 2004. Effect of oestrogen on myofibre size and miosin expression in growing rats. *Exp Physiol* 90.1 pp 87-93.
- Press MF**, Nousek-Goebel NA, Bur M y Greene GL. 1986. Estrogen receptor localization in the female genital tract. *American Journal of Physiology*. Vol.123 No. 2 280:292.
- Rodríguez-Antolín J**, Xelhuanzi N, García M, Cuevas E, Hudson R y Martínez-Gómez M. 2008. General tissue characteristics of the lower urethral and vaginal walls in the domestic rabbit. *IU Journal*.
- Saartok T**. 1984. Steroid receptors in two types of rabbit skeletal muscle. *Int J Sports Med* 15: 130-136.
- Rechberger T y Skorupski P**. 2007. The controversies regarding the role of estrogens in urogynecology. *Folia histochemica et citobiologica*. Vol 45, Supp 1 77:21.
- Richard D**. 1986. Effects of ovarian hormones on energy balance and brown adipose tissue thermogenesis. *Am J Physiol* 250: R245-249.
- Riveros JL**, Urquieta B, Bonacic C, Hoffmann Bernd, Bas F y Schuler G. 2009. Endocrine changes during pregnancy, parturition and post-partum in guanacos (*Lama guanicoe*). *Animal reproduction science* 116, 318-325.
- Segars JH y Driggers**. 2002. Estrogen action and cytoplasmic signaling cascades. Part 1: membrane-associated signaling complexes. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism* Vol. 13 no. 8.
- Sipilä S y Poutamo J**. 2002. Muscle performance, sex hormones and training in perimenopausal and post-menopausal women. *Scand J Med Sci Sports* 13: 19-25.
- Sitnick M**, Foley AM, Brown M y Spangenburg EE. 2006. Ovariectomy prevents the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle mass. *J Appl Physiol* 100: 286-293.
-

-
- Smith ARB**, Hosker GL y Warrel DW. 1989. The role or partial denervation of the pelvic floor in the aetiology of prolapse and stress incontinence. *Br J Obstet Gynaecol* 96: 24-8.
- Snooks SJ**, Swas M, Mathers SE y Henry MM. 1990. Effect of vaginal delivery on the pelvic floor: A 5-year follow-up. *Br J Surg* 77: 1358-60.
- Tidball JG**. 1995. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exercise* 27: 1022-1032.
- Velders M**, Solzbacher M, Scleipen B, Laudénbach U, Fritzmeier KH y Diel P. 2008. Estradiol and genistein antagonize the ovariectomy effects on skeletal muscle myosin heavy chain expression via ER- β mediated pathways. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, doi: 10.1016/j.jsbmb.2110.03.059.
- Vermeirsch H**, Simoens P, Lauwers H y Coryn M. 1998. Immunohistochemical detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. *Theriogenology* 51: 729-743.
- Wook Bai S**, Wook Jung Y, Sung Kwon H, Mi Yoon J, Seung Shin J, Kwang Kim S, Hyun Park K y Hyun Park J. 2004. The role of estrogen receptor, progesterone receptor and p53 in development of stress urinary incontinence.
- Xiao Hui LV y Da Zhao SHI**. 2010. Levels during consecutive reproductive states in Mongolian Gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp. Anim.* 59(2), 231-237.
- Zhu L**, Lang J, Feng R, Chen J y Wong F. 2004. Estrogen receptor in pelvic floor tissues in patients with stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J.* 15: 340-343.

13. GLOSARIO DE TÉRMINOS

1g	Primera gestación
2g	Segunda gestación
3g	Tercera gestación
4g	Cuarta gestación
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AER	Antes del estado reproductivo
AKT	Proteína cinasa de tipo serina/treonina. Tiene un papel importante en la regulación de señales que intervienen en el crecimiento celular, supervivencia celular (anti-apoptótica), ciclo celular, transcripción y metabolismo de glucosa, entre otras.
CD34	Glicoproteína de superficie celular que conforma un grupo de moléculas de diferenciación y funciona como factor de adhesión célula-célula.
CMG	Cistometograma
EMG	Electromiograma
E2	17 β -estradiol
GLUT4	Transportador de glucosa tipo 4
H-E	Hematoxilina-eosina
HRT	Terapia de remplazo hormonal
ip	Intraperitoneal
IU	Incontinencia urinaria
IUS	Incontinencia urinaria por estrés
mBe	Músculo bulboesponjoso
mIs	Músculo isquicavernoso
mPc	Músculo pubococcígeo
MHC	Cadenas pesadas de miosina

MyoD	Proteínas pertenecientes a la familia de proteínas conocidas como factores reguladores miogénicos (MRFs). Se presenta en el proceso de diferenciación miogénica y es uno de los marcadores más tempranos cuando se produce la miogénesis. Es expresada en células satélite activadas, pero no en las quiescentes.
Myf5	Proteína que pertenece a la familia de proteínas conocidas como factores reguladores miogénicos (MRFs). Tiene una función importante durante la regulación de la diferenciación muscular.
ON	Oxido nítrico
OVX	Ovariectomía
Pax7	Proteína perteneciente a la familia de factores de transcripción <i>paired box</i> (PAX). Esta proteína está involucrada en el desarrollo y regeneración del músculo esquelético. Se expresa en células satélite quiescentes.
PBS	Bufer de fosfatos salino
RE	Receptor de estrógenos
RE α	Receptor de estrógenos tipo alfa
RE β	Receptor de estrógenos tipo beta

14. PUBLICACIONES

Los resultados mostrados en esta tesis fueron organizados para su presentación en diversos congresos nacionales y un congreso internacional.

Congresos Nacionales

López-García K, Nicolás L y Castelán F. 2008. Parámetros estrogénicos asociados con la experiencia reproductiva en la coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*): concentración sérica de estradiol y expresión del receptor de estrógenos en los músculos bulboesponjoso y pubococcígeo. Treceavo Curso Bases Biológicas de la Conducta. Universidad Autónoma de Tlaxcala-SMCF-UNAM. Tlaxcala, Tlaxcala.

López-García K, Ramírez C, Vázquez E, Cuevas E, Castelán F y Martínez-Gómez M. 2009. Parámetros estrogénicos asociados con la multiparidad en la coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*): concentración sérica de estradiol y expresión del receptor de estrógenos en los músculos bulboesponjoso y pubococcígeo. XV Congreso de carteles “Lino Díaz de León”. Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM. México, DF.

López-García K, Corona-Quintanilla DL, Cuevas E, Castelán F y Martínez-Gómez M. 2010. La experiencia reproductiva modifica la sensibilidad estrogénica en la musculatura estriada pélvica y perineal de la coneja. XXXV Reunión Anual de la AIBIR. Xalapa, Ver.

López-García K, Castelán F, Corona-Quintanilla DL, Cuevas E y Martínez-Gómez M. La experiencia reproductiva modifica la sensibilidad estrogénica y se asocia con cambios histológicos en la musculatura estriada pélvica y perineal de la coneja. LIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Villahermosa, Tabasco 2010.

Congresos internacionales

López-García K, Castelán F, Corona-Quintanilla DL, Cuevas E, Jiménez I, Martínez-Gómez M. Reproductive experience, estrogen and striated pelvic- and perineal-striated muscles in female rabbits. 40th Annual Meeting of Neuroscience 2010. San Diego, California.