



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EFFECTO DE LA GESTACIÓN SOBRE INDICADORES
HISTOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE DAÑO DE LOS MÚSCULOS
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

Maribel Huerta Cervantes

Codirectores

Dr. Francisco Castelán

Dr. Jorge Rodríguez Antolín

Miembros del Comité Tutorial

Dra. Estela Cuevas Romero

Dr. José Ramón Eguibar Cuenca

Dr. Pablo Pacheco Cabrera

Tlaxcala, Tlax.

Diciembre, 2012



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EFECTO DE LA GESTACIÓN SOBRE INDICADORES
HISTOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE DAÑO DE LOS MÚSCULOS
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

Maribel Huerta Cervantes

Codirectores

Dr. Francisco Castelán

Dr. Jorge Rodríguez Antolín

Miembros del Comité Tutorial

Dra. Estela Cuevas Romero

Dr. José Ramón Eguibar Cuenca

Dr. Pablo Pacheco Cabrera



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Maribel Huerta Cervantes** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Efecto de la gestación sobre indicadores histológicos y bioquímicos de daño de los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., OCTUBRE 4 DE 2012


DR. FRANCISCO CASTELÁN


DR. JORGE RODRÍGUEZ ANTOLÍN


DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO


DR. VÍCTOR MANUEL FAJARDO GUADARRAMA


DRA. MAYVI ALVARADO OLIVAREZ



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Esta Tesis se fue realizada en las instalaciones del laboratorio de Biología Celular del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala bajo la codirección del Dr. Francisco Castelán y el Dr. Jorge Rodríguez Antolín. El comité tutorial que enriqueció este trabajo estuvo integrado por la Dra. Estela Cuevas Romero, el Dr. José Ramón Eguibar Cuenca y el Dr. Pablo Pacheco Cabrera.

Se realizó una estancia de movilidad estudiantil financiada por el programa ECOES en la facultad de Bioanálisis de la Universidad Veracruzana (Zona Veracruz) bajo la tutoría de la Dra. Ida Soto Rodríguez.

Este proyecto fue financiado por los programas PROMEP-SEP (UATLX-PTC-109 a FC), CONACyT (105882 a MMG y 248106 a MHC), PAPPIT-UNAM (228110 a MMG) y ECOES (Beca de movilidad Santander-Serfín a MHC).

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Campus Rectoría.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad Periférica Tlaxcala.

A la Facultad de Bioanálisis, zona Veracruz de la Universidad Veracruzana, en especial a la Dra. Ida Soto Rodríguez.

A los programas de investigación que financiaron este proyecto: PROMEP-SEP (UATLX-PTC-109 otorgado a Francisco Castelán), CONACyT (proyecto 105882 otorgado a Margarita Martínez Gómez y beca para estudios de maestría 248106 otorgada a Maribel Huerta Cervantes), PAPPIT-UNAM (proyecto 228110 otorgado a Margarita Martínez Gómez) y ECOES (Beca de movilidad Santander-Serfín otorgada a Maribel Huerta Cervantes).

A mis directores de Tesis al Dr. Francisco Castelán, jefe del Laboratorio de Biología Celular del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, por el apoyo teórico, técnico y personal brindado para el desarrollo de este proyecto. Al Dr. Jorge Rodríguez Antolín jefe del Laboratorio de Nutrición y Metabolismo del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

A mi comité tutorial: Dra. Estela Cuevas Romero, Dr. Pablo Pacheco Cabrera por su interés y compromiso, en especial al Dr. José Ramón Eguibar por los valiosos comentarios brindados para el desarrollo y mejora de esta Tesis.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, Romualda Cervantes por que siempre me ha apoyado y demostrado su cariño a pesar de lo difícil que puedo llegar a ser. A todos mis hermanos, en especial a mis hermanas por que siempre he contado con ellas ante cualquier circunstancia.

A mis compañeros del laboratorio, quienes participaron directa o indirectamente en la realización de esta tesis: Adrián Lara, Cristhian Neftaly, Verónica García, Laura Hernández, Ángeles Carrasco, Kenia López y Octavio Sánchez. Porque además del trabajo en equipo me brindaron su amistad.

A mis amigos que a pesar de la distancia me han acompañado y apoyado en cada momento durante la realización de esta Tesis, Cynthia Pérez, Ana Cristina, Carolina Páez, Erika Jiménez, Idali Carreón, Esther Juárez, Vania Carmona y Laura Regina. Porque sé que siempre podré contar con ustedes.

Y finalmente a Eduardo Venegas por ser mi compañero de vida. Porque a pesar de cualquier circunstancia me ha brindado su apoyo incondicional, pero más que nada por los momentos de alegría que hemos compartido todos estos años.

A mi papá Margarito Huerta, quien me enseñó el valor del esfuerzo y que se debe apreciar lo bueno y lo malo de la vida, quien a pesar de ya no estar a mi lado sigue siendo quien me guía.

Porque gracias a él soy lo que soy.

RESUMEN

El parto es un evento mecánico que se ha relacionado con alteraciones en el sistema urogenital y la musculatura estriada pélvica y perineal adyacentes. En la mujer las alteraciones (histológicas y funcionales) en esta musculatura han sido relacionadas con incontinencia urinaria de esfuerzo. En la coneja la multiparidad reduce la contractilidad de un músculo pélvico, el pubococcígeo (mPc), y uno perineal, el bulboesponjoso (mBe), y en el área transversal de la fibra de estos músculos. En este mismo modelo también se ha encontrado que la multiparidad modifica la sensibilidad estrogénica de ambos músculos, coincidiendo con modificaciones histológicas del pubococcígeo. Con respecto a la primiparidad (primer parto), el parto también modifica las características histológicas y bioquímicas relacionadas a daño. Tanto la multiparidad como la primiparidad afectan los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso. En ambos diseños experimentales está implícita tanto la ejecución del parto así como a la gestación (cambios fisiológicos y hormonales), por lo que es difícil discernir el efecto de cada uno. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la gestación sobre indicadores histológicos y bioquímicos de daño en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja. Se utilizaron conejas vírgenes y gestantes a término (día 30 de gestación). Para el análisis histológico se realizó la técnica histológica de Hematoxilina & Eosina. Para los marcadores bioquímicos de daño se utilizó la técnica inmunohistoquímica para cuantificar la expresión de 3-nitrotirosina y por medio de cinética enzimática de determinar la actividad de la enzima β -glucuronidasa. Los resultados obtenidos en esta Tesis muestran que en el músculo pubococcígeo la gestación modifica las características histológicas, se observó una menor área transversal de las fibras, un aumento en el número de mionúcleos periféricos y un dominio mionuclear menor, no se modificó la actividad de la enzima β -glucuronidasa y se presentó mayor inmunorreactividad anti 3-nitrotirosina. Por otro lado en el músculo bulboesponjoso la gestación se relacionó con la presencia de fibras edematizadas, con un menor número de mionúcleos, el dominio mionuclear no se modificó, mayor actividad de la enzima β -glucuronidasa y la inmunorreactividad anti 3-nitrotirosina no se modificó. Estos resultados sugieren que la gestación modifica diferencialmente a ambos músculos, el músculo pubococcígeo parece estar en una etapa de regeneración muscular y el músculo bulboesponjoso presenta características de daño muscular.

INDICE

RESUMEN 1

1. INTRODUCCIÓN 4

1.1 Musculatura estriada pélvica y perineal en la mujer 4

1.2 Efecto de parto sobre la musculatura estriada pélvica y perineal 6

1.3 Musculatura estriada 8

1.3.1 Cambios histológicos y bioquímicos en el músculo estriado asociados a daño 9

2. ANTECEDENTES 14

2.1 Anatomía de la musculatura pélvica y perineal de la coneja doméstica 14

2.2 Cambios histológicos en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja doméstica asociados a la multiparidad 15

3. JUSTIFICACIÓN 18

4. HIPÓTESIS 19

5. OBJETIVOS 20

5.1 GENERAL 20

5.2 PARTICULARES 20

6. MATERIAL Y MÉTODOS 21

6.1 Disección y tratamiento histológico de los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso 21

6.2 Análisis histológico de los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso 22

6.3 Inmunohistoquímica anti 3-nitrotirosina 23

6.4 Cuantificación de β -glucuronidasa 24

6.5 Cálculo del dominio mionuclear 24

6.6 Análisis estadístico 25

7. RESULTADOS 26

7.1 Marcadores histológicos de daño en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja 26

7.2 Marcadores bioquímicos de daño en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja 32

8. DISCUSIÓN 34

8.1 Marcadores histológicos de daño en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja 34

8.2 Marcadores bioquímicos de daño en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja 37

9. CONCLUSIONES	40
10. PERSPECTIVAS	41
11. REFERENCIAS	42
12. ANEXOS	48
13. PUBLICACIONES	50

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Musculatura estriada pélvica y perineal en la mujer

Los músculos estriados pélvicos y perineales están asociados con el aparato urogenital inferior de machos y hembras de distintas especies de mamíferos. Esta musculatura provee del soporte a la mayoría de los órganos pélvicos (Klutke y Siegel 1995).

En la mujer los músculos del piso pélvico incluyen los músculos del complejo elevador del ano, el coccígeo, el esfínter externo anal, el esfínter uretral estriado y los músculos profundos y superficiales del ano. Los músculos del elevador del ano tienen un papel crítico en el soporte de órganos viscerales pélvicos y juegan un papel importante en la función sexual, defecatoria y urinaria (Asthon-Miller y DeLancey 2007). El complejo de músculos que conforman al elevador del ano son el pubococcígeo (también llamado pubovisceral), el puborrectal y el iliococcígeo. El músculo pubococcígeo se origina en la rama púbica postero-inferior y se inserta en la línea media de los órganos viscerales y rafe anococcígeo. El músculo puborrectal también se origina sobre el hueso púbico pero sus fibras pasan posterior y rodean la vagina, el recto y el cuerpo perineal, resultando en el ángulo anorectal, promoviendo el cierre del hiato urogenital (Barber 2005). El músculo iliococcígeo se origina del arco tendinoso elevador del ano, un engrosamiento lineal de la cubierta fascial del obturador interno que recorre de la espina isquiática hacia la superficie posterior de la rama superior púbica. Se inserta en la línea media sobre el rafe anococcígeo. El espacio entre la musculatura del elevador del ano a través del cual pasa la uretra, la vagina y el recto es llamado el hiato urogenital (Barber 2005). Los músculos del complejo elevador del ano son inervados por el nervio pudendo que provee inervación sensorial. Este nervio sigue un complejo curso que se origina en los nervios sacros 2 y 4 y viajan detrás del ligamento sacroespinoso medial a la espina ciática (Phillips y Monga 2005).

En la mujer los músculos perineales se localizan fuera de la cavidad pélvica, como el constrictor vestibular, el isquiocavernoso, el bulboesponjoso, el esfínter externo de la uretra (rabdoesfínter uretral) y el esfínter anal (Netter 2002). El músculo isquiocavernoso recubre la extremidad posterior del clítoris y se insertan en ella, el músculo bulboesponjoso rodea el orificio vaginal y recubre el bulbo vestibular. Posteriormente se inserta en el punto

tendinoso central del perineo y en la fascia inferior del diafragma urogenital, mientras que se inserta anteriormente en los cuerpos cavernosos del clítoris (Netter 2002). Los músculos perineales transversos profundos se insertan en la línea media a nivel de la vagina y junto con su contraparte superficial sirven para estabilizar la posición del cuerpo perineal y el borde inferior de la membrana perineal (Barber 2005). El cuerpo perineal marca el punto de convergencia del músculo bulboesponjoso, perineo transversal superficial y profundo, membrana perineal, esfínter externo anal-muscular, vagina posterior y fibras del puborrectal y del pubococcígeo. El cuerpo perineal juega un papel importante en el soporte de la vagina distal y en la función normal anorectal. El suministro nervioso y vascular al perineo incluyendo espacios perineales superficial y profundo, es proveído por el paquete neurovascular del nervio pudendo (Barber 2005).

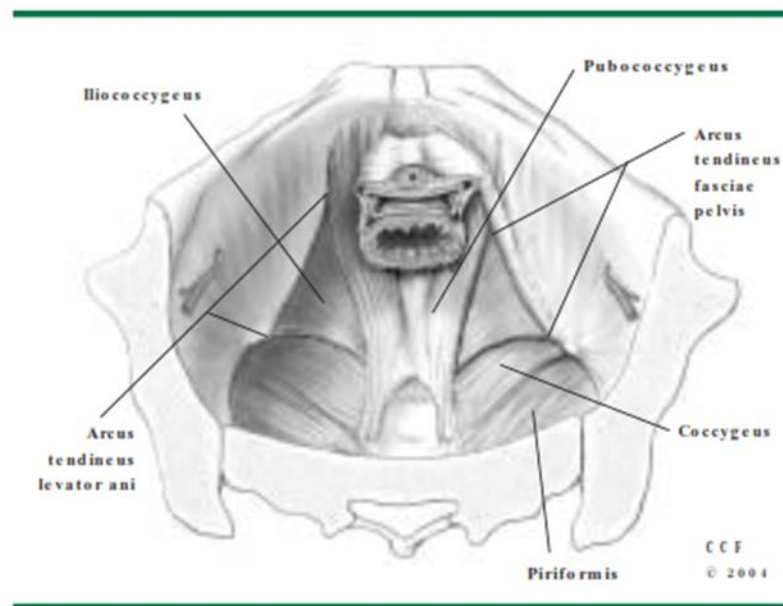


Figura 1.- Ilustración del piso pélvico de la mujer que muestra la relación entre los músculos del piso pélvico y sus paredes laterales en una vista abdominal. Se muestran los orígenes de los músculos del complejo elevador del ano. Tomado de Barber 2005.

1.2 Efecto de parto sobre la musculatura estriada pélvica y perineal

El proceso reproductivo en mujeres (gestación y parto; paso del feto por el canal vaginal) es un factor de riesgo asociado con daño en la musculatura del piso pélvico y la perineal (Phillips y Monga 2005). En condiciones fisiológicas la integridad de la musculatura pélvica y perineal así como ligamentos asociados es clave para el mantenimiento, soporte, suspensión y posición de órganos pélvicos (Bortolini y cols. 2010). En mujeres la disfunción del piso pélvico resulta en prolapsos de órganos pélvicos, incontinencia fecal e incontinencia urinaria (Asthon-Miller y DeLancey 2009, Bortolini y cols. 2010). Esta última de gran importancia debido al aumento en su prevalencia y al incremento de la misma con la edad. La Sociedad Internacional de Continencia definió a la incontinencia urinaria como la pérdida involuntaria de orina. De la misma forma, denominó a la incontinencia urinaria de esfuerzo como la pérdida involuntaria de orina relacionada con los esfuerzos físicos (Abrams y cols. 2003). Dentro de los factores desencadenantes de la incontinencia urinaria se encuentra el daño a la musculatura pélvica y perineal, ésta a la vez asociada a factores de riesgo como la edad, enfermedades crónicas, incremento de la presión abdominal (por esfuerzo), eventos reproductivos como la gestación y la paridad. Bajo condiciones normales, el parto causa trauma mecánico a los músculos del piso pélvico que bajo algunas circunstancias puede ser irreversible (Bortoloni y cols. 2010).

El parto es el proceso fisiológico por el cual el feto atraviesa el canal vaginal (Kamel, 2010). En la mujer el parto consiste de 3 etapas: la primera etapa de parto viene acompañada con cambios en los niveles hormonales de la madre como es una baja de progesterona e incremento en los niveles de estrógenos, oxitocina, prostanglandinas y cortisol (Kamel, 2010) que inducen fuertes contracciones uterinas de manera progresiva que ayudan a dirigir la cabeza del feto a través del cérvix maduro causando su dilatación. La estimulación uterina también produce un reflejo inhibitorio uterocervical que disminuye la presión cervical (Shafik, 1994). La segunda etapa es caracterizada por la presencia de dos tipos de reflejos: uno viscerovisceral y otro viscerosomatomotor para ayudar a la expulsión del feto. El feto se mueve hacia abajo a través del canal de parto y distiende el perineo, una vez que el cérvix está completamente dilatado, el feto causa distensión cervical y activa el reflejo cervicouterino que incrementa la contracción y presión uterina (Shafik, 1994). Durante esta etapa las contracciones ocurren cada 3 minutos con una

duración de 1 minuto, estas contracciones incrementan la presión uterina de 2.6 a 8.5kPa. La expulsión del feto requiere una reducción en la resistencia en el canal de parto (Asthon-Miller y DeLancey 2009). La tercera etapa empieza una vez que ha sido expulsado el bebé. El parto termina hasta que la placenta y la membrana son expulsadas. Esto ocurre en respuesta a continuas contracciones uterinas que producen involución uterina que favorece la separación de la placenta.

Una vez que la placenta está completamente separada de la pared uterina, una mujer puede sentir contracciones otra vez y puja para producir lo que es llamado parto de la placenta o membrana (Asthon-Miller y DeLancey 2009). En mujeres se ha estudiado el efecto de ésta última etapa de sobre la distención de los músculos iliococcígeo y pubococcígeo mediante resonancia magnética y se ha observado que estos músculos se distienden hasta tres veces más de lo normal conforme desciende la cabeza del feto (Liens y cols. 2004). De esta manera se han realizado estudios epidemiológicos que asocian a la paridad con el desarrollo de incontinencia urinaria, Velázquez Magaña y cols. (2007) determinaron la prevalencia de incontinencia urinaria en mujeres de la ciudad de México, reportaron una prevalencia del 46.5%. La edad promedio de las mujeres que presentaron incontinencia urinaria fue de 41.5 ± 12.7 años. Particularmente mujeres con cuatro a seis partos registraron mayor incidencia de incontinencia urinaria (Velázquez Magaña y cols. 2007). Otros autores han reportado incontinencia urinaria como consecuencia únicamente el proceso de gestación, por ejemplo Arrue y cols. (2011) reportaron que de un total de 479 mujeres españolas primíparas, el 9.5% presentaron incontinencia urinaria durante el último trimestre del embarazo y persistió durante los dos años posparto, por lo que es posible que durante la gestación la musculatura que participa en la continencia urinaria sea dañada.

Durante la gestación existen diferentes factores que podrían modificar a la musculatura estriada pélvica y perineal. En la gestación, el aumento o disminución de diversas hormonas afectan la composición bioquímica de la matriz sólida que constituye los diferentes componentes del piso pélvico. Estos mecanismos promueven remodelación del tejido que llevan a cambios en la organización, orientación y diámetro de las fibras de colágeno, tales modificaciones podrían afectar las propiedades visco-elásticas de la pared vaginal, de los músculos puboviscerales y de los perineales (Asthon-Miller y DeLancey 2009). En particular durante el último trimestre de gestación se produce un aumento en la

producción de estradiol. Algunos estudios sugieren que los estrógenos incrementan la producción de fuerza del músculo estriado (Glenmark y cols. 2004), por lo que durante la gestación podríamos observar modificaciones a nivel muscular influenciadas por la producción de estradiol. Además de estas modificaciones hormonales, durante la gestación en las hembras de mamíferos se produce un aumento en la presión intra-abdominal y una deformación de los huesos de la columna vertebral (Anderson 1999), lo que podría también influir en el daño a la musculatura pélvica y perineal. Por lo que estudiar los procesos reproductivos como el parto y gestación es de gran importancia para determinar el efecto provocado sobre la musculatura estriada pélvica y la perineal.

1.3 Musculatura estriada

La musculatura estriada es el tejido más abundante del cuerpo humano, constituye aproximadamente el 55% del peso corporal y participa en procesos como la locomoción, generación de calor y en el metabolismo (Valberg 2008). Su morfología consiste de paquetes de miofibras que generan fuerza de contracción, contiene varios mionúcleos ubicados en la periferia (sarcolema) y están rodeadas individualmente por tejido conectivo llamado endomisio. Los paquetes de miofibras están agrupados y rodeados por el perimisio y a su vez rodeados por el epimisio que es la capa exterior que rodea al músculo estriado. El músculo está altamente vascularizado para recibir el aporte energético y de nutrientes esenciales necesarios (Wei y Huard 2010).

Los elementos contráctiles de las fibras musculares son los miofilamentos de miosina y actina. La miosina es el componente principal de los filamentos gruesos y la actina de los filamentos delgados. Las proyecciones laterales de la miosina forman sitios reactivos con la actina de tal manera que se asocian y disocian cíclicamente durante la contracción y relajación (Valberg 2008). El músculo estriado está compuesto por una mezcla de miofibras con diferentes propiedades fisiológicas, que van desde un tipo de contracción lenta (*slow*) resistente a la fatiga (tipo I) hasta el tipo de contracción rápida (*fast*) no resistente a la fatiga (tipo II) (Valberg 2008).

1.3.1 Cambios histológicos y bioquímicos en el músculo estriado asociados a daño

Día a día la musculatura sufre lesiones menores. El músculo estriado en los mamíferos tiene la capacidad de completar una regeneración rápida y extensa en respuesta a un daño severo. La regeneración muscular es caracterizada por dos fases: una fase degenerativa y una regenerativa (Figura 2) (Chargé y Rudnicki 2004). La fase degenerativa a nivel histológico se caracteriza por necrosis local, edema y presencia de células inflamatorias como polimorfonucleares e infiltración de macrófagos en las fibras musculares. La extensión de la infiltración de las células inflamatorias depende fuertemente del tiempo o curso del daño así como de su origen (Venojärvi y cols. 2004).

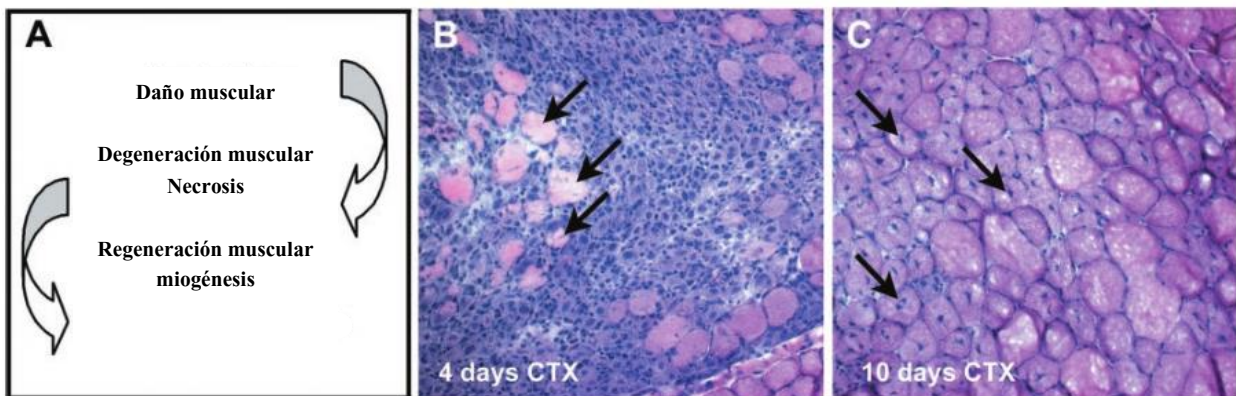


Figura 2.- Proceso de regeneración del músculo estriado de mamíferos. A: Proceso de regeneración caracterizada por una fase degenerativa y una regenerativa. B: daño al músculo tibial anterior generado por una cardiotoxina (CTX), resultando en la necrosis de las fibras y la activación de células inflamatorias (polimorfonucleares), lo que genera una pérdida de la arquitectura muscular. C: fase de regeneración de las fibras, caracterizada por la activación de células satélite y la posterior generación de mionúcleos centralizados.

Otras características que pueden ser modificadas en la musculatura estriada son el área transversal de la fibra, el número de mionúcleos y el dominio mionuclear. El área transversal de la fibra se modifica en respuesta a una demanda metabólica o mecánica que se desencadena cuando el músculo es dañado, la expresión de genes y proteínas puede llevar a la ganancia (hipertrofia) o pérdida (atrofia) de masa muscular (Favier y cols. 2007). De esta manera la hipertrofia se caracteriza principalmente por un aumento compensatorio en el área transversal de las fibras cuando un músculo es sometido a una actividad repetida de ejercicio de resistencia, produciendo de ésta manera crecimiento del músculo estriado (Drummond y cols. 2008). Por otro lado se ha reportado que la atrofia muscular, provoca la

disminución del área transversal de la fibra, generalmente como resultado de falta de uso por inmovilidad, denervación o ruptura de ligamentos, conduciendo posteriormente a reducción en la contracción muscular (Van der Mee y cols. 2011). Por ejemplo Stockmar y cols. (2006) analizaron los cambios producidos por la ruptura del ligamento anterior de la rodilla (inmovilidad) en el músculo vasto medial de humanos con inestabilidad crónica anterior de la rodilla. Reportaron que las fibras musculares tienen un área transversal menor, una disminución en la actividad de la seis fosfato deshidrogenasa (metabolismo glucolítico) y un aumento en la actividad de la succinato deshidrogenasa (metabolismo oxidativo). Concluyendo que la ruptura de ligamento induce atrofia muscular así como un cambio en el metabolismo de las fibras, sugiriendo una disminución de la fuerza de contracción rápida y un cambio en el desarrollo de la resistencia muscular.

Una fibra muscular típica puede contener cientos de mionúcleos. Se estima que en un músculo de rata adulta, no más del 1-2 % de mionúcleos son reemplazados cada semana (Tseng y cols. 1994). El aumento del número de mionúcleos está relacionado al proceso de regeneración muscular (Figura 2) (Chargé y Rudnicki 2004, Harridge 2007). Debido a que los mionúcleos son post mitóticos, las células satélite promueven la generación nuevos mionúcleos al músculo estriado, estos mionúcleos se fusionan con fibras musculares ya existentes (presencia de núcleos centralizados) para originar nuevas fibras musculares. Las células satélite están localizadas fuera del sarcolema debajo de la lámina basal de una fibra muscular. Las células satélite son consideradas células madre del músculo estriado y tienen un papel importante en la regeneración y reparación muscular (Brooks y cols. 2009).

El número de mionúcleos y el tamaño de las fibras musculares individuales incrementan rápidamente durante el crecimiento posnatal y en la hipertrofia, debido al aumento en la síntesis de proteínas. En contraste en la atrofia muscular se observa la pérdida de mionúcleos (Van der Mee y cols. 2011), esto lleva al decline en la fuerza de contracción y a una reducción en la tolerancia a la fatiga y por lo tanto en la capacidad funcional (Zhang y cols. 2010).

La interacción entre el área de la fibra y el número mionúcleos fue tomada como base del concepto de dominio mionuclear. El dominio mionuclear es definido como el volumen de citoplasma asociado con un solo mionúcleo (Allen y cols. 1999). Ha sido mostrado que cada mionúcleo regula la expresión de genes de una porción de fibra que lo rodea. Por lo

que el dominio mionuclear nos da información acerca del requerimiento proteínico que necesita una fibra muscular después de haber sido expuesto a un reto (aumento o disminución de la función muscular). Además se ha demostrado que las fibras altamente activas en síntesis de proteínas, como las de tipo I (lentas) que tienen un alto índice de recambio proteínico por lo que su dominio mionuclear es pequeño (Rosser y cols. 2002). Oishi y cols. (2008) demostraron que la descarga de las patas traseras (inmovilidad) de ratas Wistar, modifica las características histológicas de las fibras musculares del músculo sóleo. Reportaron una menor área transversal de las fibras y un menor número de mionúcleos periféricos, así mismo el dominio mionuclear se mantuvo constante, en comparación con el grupo control. Es posible que el dominio mionuclear no se haya modificado como resultado de la etapa del daño. Allen y cols. (1999) reportó que el dominio mionuclear permanece constante durante una etapa aguda de la hipertrofia, por que la expresión de proteínas depende del curso del daño. A estos mismos animales se les evaluó 14 días después de haber sido sometidos al reto (tiempo de recuperación) observando que el área transversal y el número de mionúcleos son similares a los del grupo control. Lo que nos indica que el músculo estriado tiene una alta capacidad para adaptarse morfológica y funcionalmente. A los mecanismos adaptativos musculares se les ha denominado “plasticidad muscular” (Fluck 2009, Westerbland y cols. 2010). Esta plasticidad se ve reflejada en ajustes en el metabolismo, fuerza, resistencia y velocidad de contracción así como en el requerimiento proteínico del músculo estriado como resultado de una alteración o demanda (Harridge 2007), por lo que el dominio mionuclear nos proporciona gran información acerca de esta plasticidad

Una característica de la degeneración muscular es la necrosis. La necrosis muscular está caracterizada por la ruptura del sarcolema de la miofibra lo que incrementa la permeabilidad de la membrana. La ruptura de la integridad de la miofibra es reflejada por un incremento en los niveles séricos de proteínas como la creatina cinasa (CK) y a nivel local (muscular) la liberación de enzimas lisosomales como las calpainas, la catepsina D y la β -glucuronidasa (Chargé y Rudnicki 2004). Vihko y Salminen (1983) reportaron que la actividad de la β -glucuronidasa aumenta en el músculo recto femoral de ratones macho después de someterlos a ejercicio extenuante. Además, demostraron que esta enzima es específica de músculo estriado ya que en otros órganos como hígado, riñón y cerebro no se

modificó la actividad de la enzima β -glucuronidasa de los ratones sometidos a ejercicio (Salminen y Vihko 1982). Debido a la especificidad de la enzima β -glucuronidasa por el músculo estriado, su cuantificación es de gran utilidad para evaluar procesos de daño a nivel muscular en comparación con otras proteínas como la CK, que también es liberada por otros órganos como el cerebro.

Dentro de los cambios bioquímicos desencadenados por alguna perturbación muscular se encuentra la generación de radicales libres. Durante la contracción el músculo estriado se genera una cantidad significativa de radicales libres (Jackson 2008) y también son liberadas posterior a un proceso de daño. Después del daño inicial, los radicales libres pueden incrementar por la presencia de células polimorfonucleares y macrófagos en el músculo que liberan a los radicales libres como parte del sistema de defensa (Child y cols. 1999). Un radical libre es cualquier átomo que contenga un electrón no apareado en su último orbital, lo que le confiere una elevada reactividad, dentro de los cuales podemos encontrar especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN). Bajos niveles de ERO y ERN son indispensables en varios procesos bioquímicos incluyendo diferenciación y comunicación celular, apoptosis y defensa contra microorganismos (Valko y cols. 2007, Allen y Tresini 2000). Los radicales libres se encuentran en prácticamente todos los tejidos y son generados principalmente por la cadena respiratoria mitocondrial y su desbalance con las enzimas antioxidantes (estrés oxidativo) puede llevar a daño a componentes celulares como DNA, proteínas y lípidos lo que puede resultar en subsecuente daño a células y tejidos (Fulle y cols. 2004). Guillot y cols. (2008) reportaron que la inmovilidad de las patas traseras de ratas induce adaptaciones metabólicas y electrofisiológicas del músculo sóleo. Observaron que la proporción de fibras oxidativas incrementó en relación a las glucolíticas, también reportaron aumentados los niveles de peroxidación lipídica derivada de estrés oxidativo. Estos cambios se reflejaron en una disminución de la fuerza contráctil.

Las especies reactivas pueden reaccionar entre sí para formar moléculas más complejas como el peroxinitrito. El peroxinitrito es una especie reactiva del nitrógeno que modifica residuos tirosina de proteínas para generar 3-nitrotirosina (Murakami 2012). La nitración de proteínas puede alterar la conformación y estructura proteínica, la actividad catalítica y modificar la susceptibilidad de degradación. En el músculo estriado se ha

reportado que la nitración de proteínas podría afectar el metabolismo, la contracción y la señalización intracelular (Powers y cols. 1995, Valko y cols. 2007, Souza 2008).

Todas estas alteraciones a nivel histológico y bioquímico derivado de daño pueden ser reflejadas en cualquier músculo estriado. En los músculos pélvicos y perineales de la mujer hay pocos estudios que examinen histomorfológicamente a los músculos del elevador del ano (Dimpfl y cols. 1998) y la mayoría de estos estudios solamente evalúan una parte del complejo muscular elevador del ano (Shafik y cols. 2002).

Jundt y cols. (2005) evaluaron el daño de los músculos del elevador del ano de cadáveres de mujeres así como su asociación con la edad y la paridad. Reportaron que la multiparidad incrementa la presencia de mionúcleos centralizados, la presencia de fibrosis y variación en el diámetro de la fibra muscular, estas características también incrementan con la edad en comparación con las mujeres nulíparas y con mujeres jóvenes.

A nivel experimental se ha estudiado principalmente el efecto de la multiparidad y la paridad sobre los músculos pélvicos y perineales de la coneja, en dos de los principales músculos estriados (pubococcígeo y bulboesponjoso) involucrados en procesos reproductivos como la cópula y el parto y en procesos no reproductivos como la continencia urinaria (Cruz y cols. 2002, Corona-Quintanilla y cols. 2009).

2. ANTECEDENTES

2.1 Anatomía de la musculatura pélvica y perineal de la coneja doméstica

La actividad electromiográfica de los músculos pélvicos y perineales de la mujer y la coneja muestran algunas similitudes. Por ejemplo el músculo pubococcígeo se activa durante la fase de almacenamiento de la vejiga siendo de esta manera un componente importante en el mecanismo de la continencia urinaria (Alves y cols. 2011). Los músculos bulboesponjoso y el isquiocavernoso se activan durante la fase de vaciado de la vejiga facilitando el proceso de micción (Shafik y cols. 2008). En mujeres y conejas se ha reportado que el parto provoca daño a la musculatura estriada del piso pélvico así como a su inervación, causando incoordinación en la activación electromiográfica de la musculatura pélvica y perineal, modificando el patrón de micción postparto (Deindl y cols. 1998, Haylen 2009, Martínez-Gómez y cols. 2011).

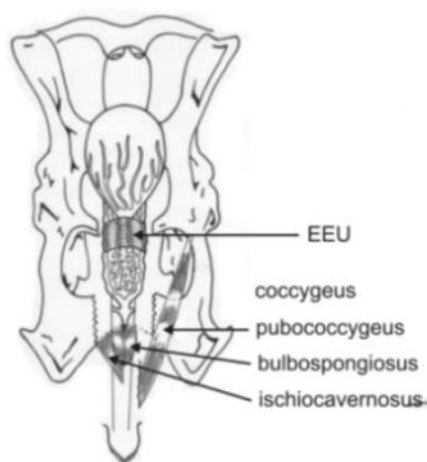


Figura 3.- Musculatura estriada pélvica y perineal de la coneja doméstica. Se indica la localización de los músculos pubococcígeo, isquiocavernoso, ilicoccígeo y bulboesponjoso (Martínez-Gómez y cols. 2012).

En la coneja los músculos pélvicos incluyen el obturador interno, el coccígeo, el iliococcígeo y el pubococcígeo. Los músculos perineales incluyen al constrictor vestibular, constrictor vulvar, el bulboglandular, el isquiocavernoso y el bulboesponjoso (Martínez-Gómez y cols. 2012). El músculo pubococcígeo se origina en la espina ciática del isquión. La mayoría de sus fibras se insertan sin apariencia tendinosa en la vértebra coccígea seis, el resto de las fibras se insertan mediante tendón en las vértebras coccígeas siete y ocho (Martínez-Gómez y cols. 1997, Cruz y cols. 2002). El músculo bulboesponjoso 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).

2.2 Cambios histológicos en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja asociados a la multiparidad

En la coneja doméstica, la multiparidad (dos meses después del cuarto parto) reduce el área transversal de las fibras rápidas y lentas de los músculos bulboesponjoso y pubococcígeo también disminuye la fuerza de contracción en ambos músculos, en comparación con el grupo de hembras vírgenes (Fajardo y cols. 2008). La contractilidad de las fibras que componen a los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso, se ve disminuída al modificar la proporción de fibras rápidas, intermedias y lentas en hembras múltiparas, 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.

En la coneja virgen, la actividad de los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso muestra una coordinación temporal durante el proceso de micción, el músculo pubococcígeo se activa durante la fase de almacenamiento, mientras que los músculos bulboesponjoso e isquiocavernoso lo hacen durante la fase de expulsión de la orina (Corona-Quintanilla y cols. 2009). Martínez-Gómez y cols. (2011) reportó que este patrón de actividad está alterado en hembras múltiparas junto con algunos parámetros urodinámicos, lo que indica que la multiparidad causa una modificación de la función urodinámica promoviendo una actividad reducida y no coordinada de los músculos pubococcígeo, bulboesponjoso e isquiocavernoso durante la micción (Martínez-Gómez y

col. 2011). Por lo que podríamos especular que ese cambio en la actividad es debida a la modificación en las características histológicas de las fibras musculares así como a la proporción de las mismas.

López-García (2010) observó que la multiparidad (tres días después del último parto) modifica la sensibilidad estrogénica de los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso. En el pubococcígeo hay una mayor expresión de los subtipos α y β del receptor de estrógenos mientras que en el bulboesponjoso sólo hay un aumento en la expresión del subtipo β en conejas multíparas en comparación con las conejas vírgenes. También reportó un aumento en el área transversal de la fibra y en el número de mionúcleos periféricos del músculo pubococcígeo, sin embargo esas características no fueron modificadas en el músculo bulboesponjoso de conejas multíparas (López-García 2010).

Las modificaciones histológicas en el músculo pubococcígeo podrían estar relacionadas a procesos de daño y regeneración (Dubowitz 1985). Así mismo estas adaptaciones podrían involucrar cambios metabólicos de las fibras. En el modelo de multiparidad, no se podría discernir si el efecto es consecuencia acumulativa del evento del parto (cuatro veces), a la distensión mecánica provocada durante el último parto o al efecto de la gestación.

Recientemente Sánchez-García (2012) reportó que la paridad (un parto) modifica las características histológicas de los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja. El parto no modifica el área transversal de las fibras tres y 20 días después del parto. En el músculo pubococcígeo aumentó el número de mionúcleos por fibra tres días después del parto, el aumento se mantuvo 20 días posteriores al parto, el dominio mionuclear disminuyó tres días después del parto y se mantuvo así a los 20 días pos parto con respecto al grupo de conejas vírgenes. En el músculo bulboesponjoso el número de núcleos por fibra incrementó sólo 20 días después del parto y el dominio mionuclear no se modificó (tres y 20 días después del parto) con respecto al grupo de hembras vírgenes. En cuanto a marcadores bioquímicos de daño solamente en el músculo bulboesponjoso hay un aumento en la actividad de la enzima β -glucuronidasa (tres días después del parto) en el pubococcígeo no se encontraron diferencias en comparación con las hembras vírgenes. Estas diferencias en los indicadores de daño principalmente el de la actividad β -glucuronidasa podrían indicar una diferencia en el tiempo en que se dañaron los músculos,

probablemente el músculo bulboesponjoso se dañó durante el proceso de parto, sin embargo el músculo pubococcígeo parece estar en una etapa de regeneración.

Por lo que nos preguntamos si las modificaciones histológicas y bioquímicas relacionadas a daño realmente son consecuencia del efecto mecánico (distensión muscular que se ejerce durante el paso de la cría por el canal de parto) o si tiene algún efecto la gestación, proceso caracterizado por diversos cambios hormonales y de presión por la distensión abdominal y pélvica.

3. JUSTIFICACIÓN

La musculatura estriada pélvica y perineal es determinante para la función del aparato urogenital inferior femenino en los mamíferos, incluyendo al humano. Durante la gestación y el parto ocurren cambios histológicos y funcionales en la musculatura pélvica y perineal que pueden estar asociados a un proceso de daño, en la mujer los cambios funcionales en la musculatura pélvica y perineal se relacionan con incontinencia urinaria y prolapsos de órganos pélvicos. En nuestro laboratorio mostramos que la multiparidad afecta histológica y funcionalmente a dicha musculatura. Además, se ha demostrado que un parto modifica las características histológicas y bioquímicas en el músculo pubococcígeo asociados a un proceso de regeneración, en contraparte los cambios histológicos y bioquímicos en el músculo bulboesponjoso corresponden a una etapa de daño muscular. Sin embargo el parto es un evento consecuente de una serie de cambios corporales y fisiológicos graduales y drásticos producidos durante la gestación por lo que es difícil discernir si todos los cambios observados son efecto sólo del parto (paso del feto por el canal vaginal) o consecuencia de la acumulación de cambios (hormonales y de presión) que se generan durante la gestación en la madre. Este trabajo pretende inspeccionar solamente el efecto de la gestación sobre marcadores histológicos y bioquímicos de daño en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja.

4. HIPÓTESIS

La gestación modifica indicadores histológicos y bioquímicos de daño en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Determinar las características histológicas e indicadores bioquímicos relacionados con daño de los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de conejas vírgenes y gestantes.

5.2 Particulares

En los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de conejas vírgenes y gestantes:

- Determinar el área transversal de las fibras.
- Cuantificar el número de núcleos periféricos de las fibras
- Determinar el dominio mionuclear
- Cuantificar la actividad de la enzima β -glucuronidasa
- Determinar la expresión de 3-nitrotirosina

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron conejas de raza chinchilla (*Oryctolagus cuniculus*) de 6 meses de edad que fueron alojadas en jaulas individuales de acero inoxidable (50x 60x 40 cm) y mantenidas en condiciones estándar de bioterio (16h/8h de luz y oscuridad; $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) con agua y alimento *ad libitum*. El grupo control estuvo constituido por hembras vírgenes (C, n=6) y los experimentales por conejas gestantes (G, n=6) que fueron sacrificadas al día 30 de gestación. Para todos los grupos, las conejas serán sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (60 mg / kg, i.p.).

6.1 Disección y tratamiento histológico de los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso

El animal fue colocado en posición supina dorsal y 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 disecar los músculos pubococcígeo (mPc) y bulboesponjoso (mBe). Estos músculos son bilaterales, por lo que el derecho se utilizó para la técnica histológica e inmunohistoquímica y el izquierdo para la cuantificación de β -glucuronidasa.

Para la técnica histoquímica la fijación de tejidos se realizó por inmersión en solución de Bouin-Duboscq (ácido pícrico 0.39 %, formalina 26.66%, ácido acético 6.66%, etanol 80%) durante 24 h. Posteriormente, los músculos fueron deshidratados con alcohol etílico de concentraciones ascendentes (80, 96 y 100%) y aclarados en xileno. Completada la deshidratación, el tejido fue incluido en paraplast X-tra (Sigma).

6.2 Análisis histológico de los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso

Se realizaron cortes de 7 μ m de grosor obtenidos con un micrótopo (Leica). Los cortes se desparafinaron y se tiñieron con hematoxilina & eosina para evaluar sus características histológicas generales. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio de luz óptica (Nikon ECLIPSE E600) y fotografiadas con una cámara OLYMPUS de 5.1 mega píxeles.

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 el 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).

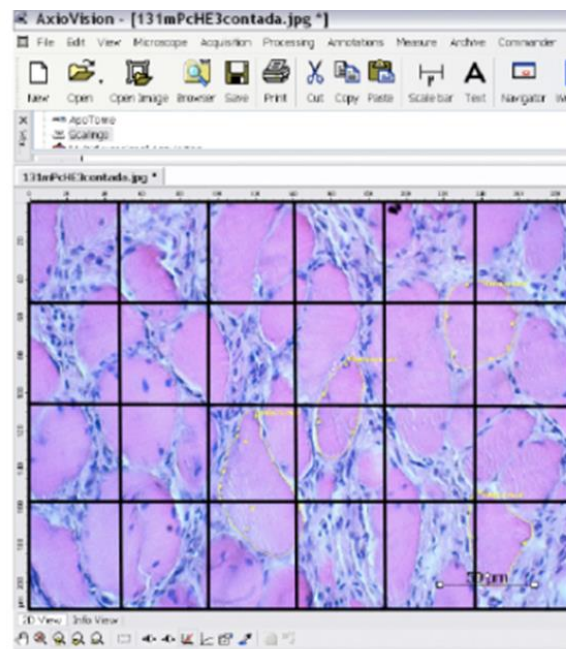


Figura 4.- Muestra de la cuadrícula utilizada para el análisis histológico (6x4 cuadrantes).

6.3 Inmunohistoquímica anti 3-nitrotirosina

Los tejidos incluidos en paraplast, fueron cortados con microtomo a siete μm de espesor y desparafinados. Después se sometieron a un tratamiento (citrato de sodio 10mM pH 6.3 durante 3 noches a 4°C y posteriormente se expusieron cinco minutos a 90°C) para exponer los antígenos de la preparación. Con el fin de bloquear las peroxidasa endógenas, los cortes fueron incubados en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en PBS 0.1 M (Na_2HPO_4 5.8 mM, NaH_2PO_4 26.66 mM y NaCl 0.15M, pH 7.4) durante 30 minutos.

Después de la incubación los cortes se lavaron con PBS. Posteriormente los cortes se incubaron con una solución de bloqueo (5% de suero normal de cabra –NSG- en PBS – tritón x100) por 1h. A continuación los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario (anti 3-nitrotirosina) a una dilución 1:200 durante una noche. Al siguiente día se hicieron tres lavados con PBS-tritón x100 y a continuación los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-igG biotilado, diluido 1:200 en PBS-tritón x100) durante dos horas a temperatura ambiente. El marcaje inmunohistoquímico fue revelado con el kit ABC (Vector Lab) utilizando diaminobenzidina como sustrato. Los cortes fueron deshidratados e incluidos en un medio de montaje (Cytoseal 60®). Las preparaciones fueron observadas en el microscopio de luz óptica (Nikon ECLIPSE E600) y fotografiados (Objetivo 40x) con una cámara OLYMPUS de 5.1 mega pixeles. Se tomaron cuatro fotos de cada músculo de cada coneja y se determinó el porcentaje de área marcada mediante el programa Axio-Vision, una vez hecho lo anterior se promediará ese porcentaje para tener un solo valor por coneja.

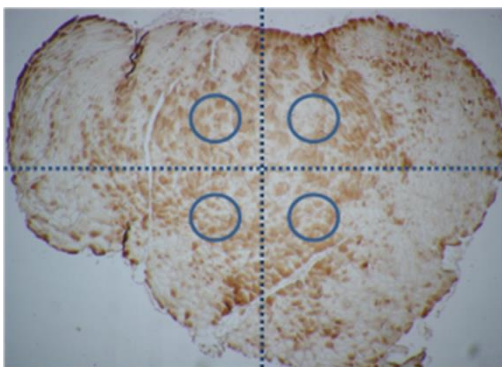


Figura 5.- Selección de las zonas de muestreo de las fotografías analizadas para determinar el porcentaje de área marcada anti 3-nitrotirosina en los músculos. Se muestra un corte de músculo pubococcígeo, microfotografía a 4x.

6.4 Cuantificación de β -glucuronidasa

Los músculos estriados destinados a este análisis fueron congelados inmediatamente después de su extracción en isopentano-hielo seco. Cada tejido se almacenó a -30°C hasta su procesamiento. Aproximadamente 100mg de cada tejido se homogenizó en una solución tamponada que contenía 50 mM tris y 20% glicerol a la que se añadieron inhibidores de proteasas (2.5 mg/ml de aprotinina y 2.5 mg/ml de leupeptina) y 1mM PMSF. Los homogenizados fueron centrifugados durante 30 min a 15,000 rpm a 4°C . Se recuperó el sobrenadante y se determinó la enzima β -glucuronidasa, se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Koskinen y col. (2001). A 1/vol de sobrenadante obtenido de la homogenización se añadió 10/vol de una solución amortiguadora de acetato (100mM, pH 4.2) y se incubó 5 minutos a 37°C . Después se añadió 150 μl de sustrato (5 mM p-nitrofenil- β -glucurónido) y se incubó por 18 horas a 37°C . Al finalizar la incubación, se añadieron 500 μl de solución amortiguadora de glicina (pH 10) y los tubos fueron centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C . La concentración de la muestra fue cuantificada a 420 nanómetros, usando p-nitrofenol como estándar.

6.5 Cálculo del dominio mionuclear

Se utilizó el algoritmo reportado por Schmalbruch y Hellhammer (1977). Para calcular el número de núcleos en un segmento de un milímetro de fibra muscular (X). Se utiliza la siguiente fórmula (1) $X = (NL) / (d + l)$, donde (N) es el número de núcleos contados en el área transversal de la fibra muscular, (L) longitud del segmento de fibra, (d) grosor del corte transversal ($7\mu\text{m}$), y (l) la longitud media de un núcleo de la fibra muscular. En nuestro análisis "L" se fijó en 1 mm. La "l" se determinó en $13.87\mu\text{m}$ para el músculo pubococcígeo y $15.22\mu\text{m}$ para el músculo bulboesponjoso.

Se utilizó una segunda fórmula (2) para calcular el volumen de citoplasma por mionúcleo (Y). $Y = (C L) / X$. Donde (C) es el área transversal de la fibra muscular, (L) longitud del segmento y (X) número de mionúcleos por segmento de fibra. Para "L" se estableció 1 mm.

6.6 Análisis estadístico

Los datos de los análisis histológicos y la concentración de la enzima β -glucuronidasa se analizaron mediante una t-Student para grupos independientes. El análisis para el porcentaje de área marcada anti-3nitrotirosina se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney. En ambas pruebas se consideró diferencia significativa a un valor de $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Marcadores histológicos en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja

Características cualitativas

En todos los cortes transversales del músculo pubococcígeo se observaron núcleos centralizados en las fibras así como algunos agregados celulares, posiblemente de células inflamatorias como polimorfonucleares.

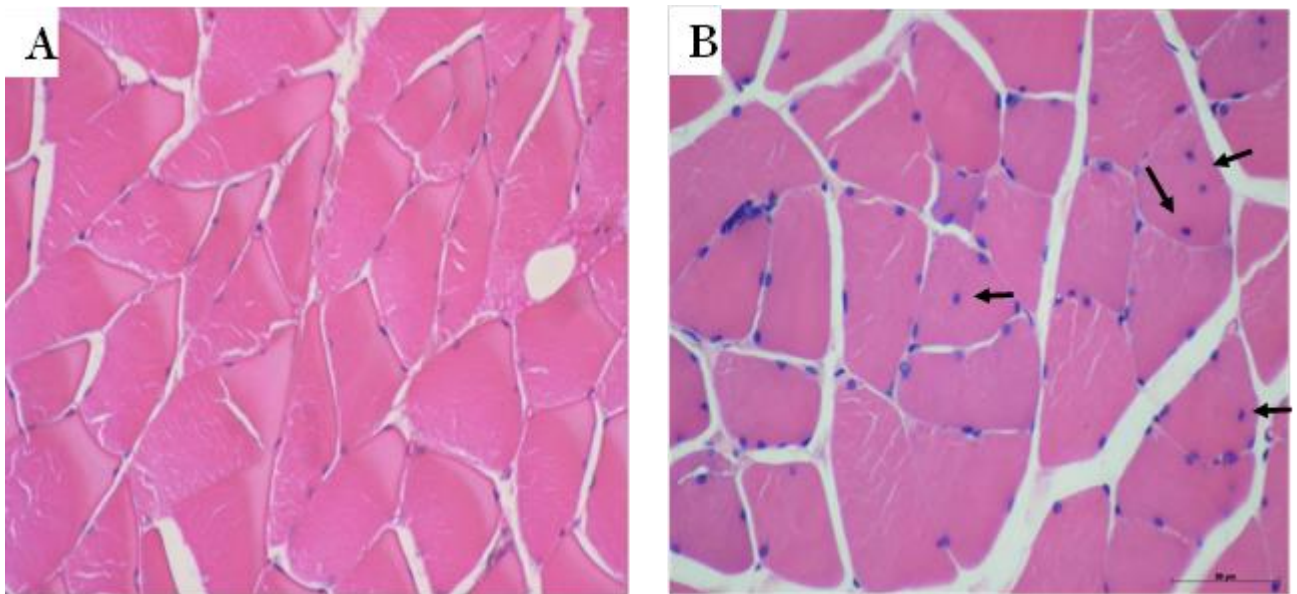


Imagen 1.- Corte transversal del músculo pubococcígeo. Las flechas indican núcleos centralizados, * agregado celular. En A) grupo control, B) grupo gestante. Tinción de Hematoxilina & Eosina. Microfotografías a 40x. Escala 50um.

En la mayoría de los cortes del músculo bulboesponjoso se observaron células edematizadas, se observa la pérdida de la forma poligonal característica de las fibras musculares y se denotan los bordes redondeados.

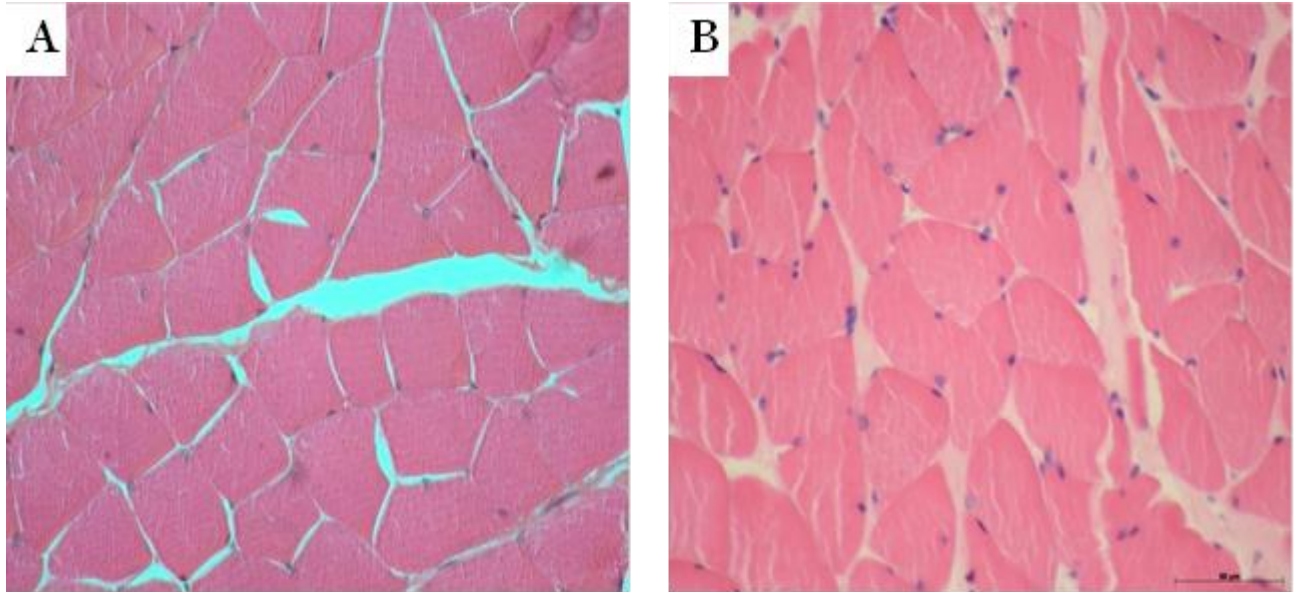
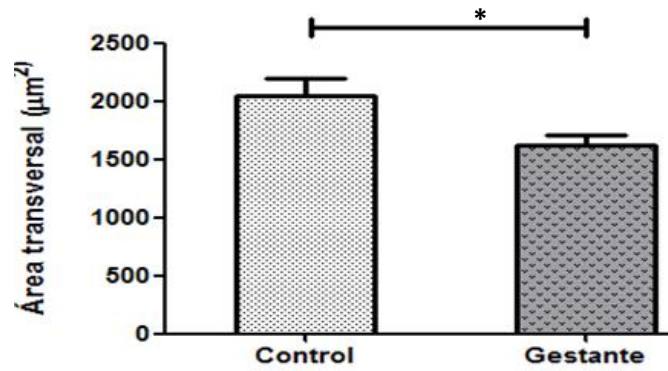


Imagen 2.- Corte transversal del músculo bulboesponjoso. En B se observan fibras musculares edematizadas. En A) grupo control, B) grupo gestante. Microfotografías a 40x. Tinción de Hematoxilina & Eosina. Escala 50 μ m.

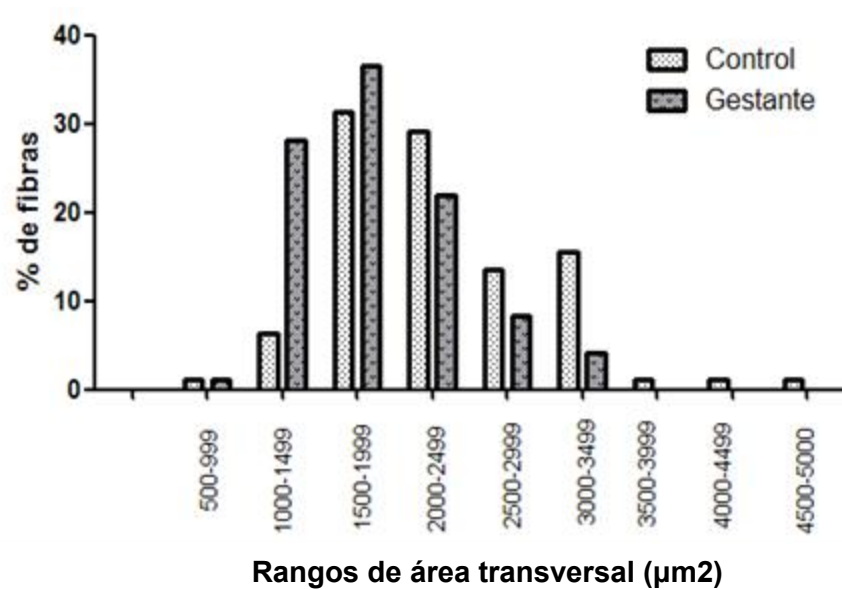
Área transversal de las fibras

Las fibras del músculo pubococcígeo de conejas gestantes presentaron una menor área transversal en comparación con las fibras del músculo pubococcígeo de conejas vírgenes (Gráfica 1) ($1621 \pm 93.11 \mu\text{m}^2$ vs $2043 \pm 154.2 \mu\text{m}^2$), ($t=2.343$; $df=10$, $p=0.041$).



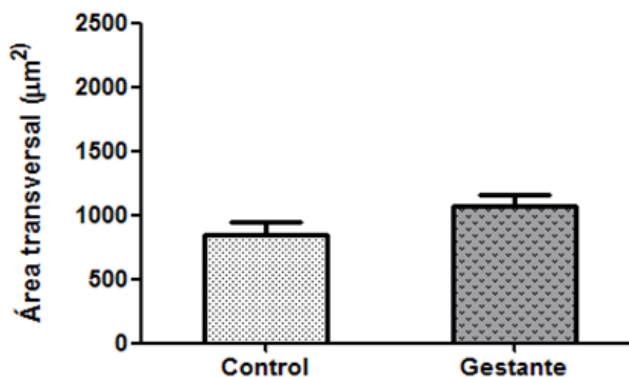
Gráfica 1.- Efecto de la gestación sobre el área transversal de las fibras del músculo pubococciógeo. Las barras representan la media \pm el error estándar, n=6. T-Student $t=2.343$; $df=10$, $p=0.041$.

En el músculo pubococciógeo del grupo de conejas gestantes se observa un mayor porcentaje de fibras con áreas menores en comparación con el grupo de conejas vírgenes (Gráfica 2).



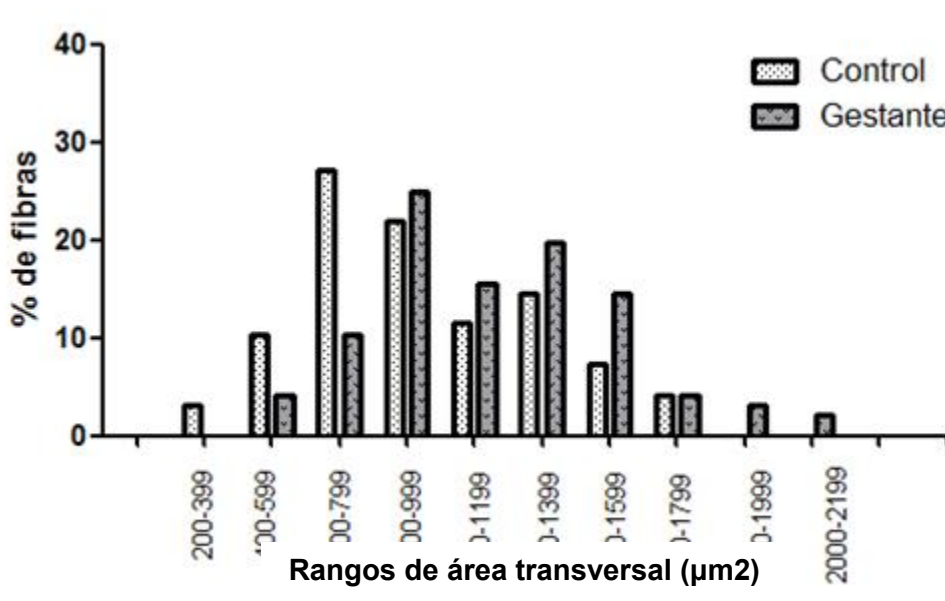
Gráfica 2.- Histograma de frecuencias del área transversal de las fibras del músculo pubococciógeo

Las fibras del músculo bulboesponjoso de conejas gestantes no presentaron modificación significativa en el área transversal en comparación con las fibras del músculo bulboesponjoso de conejas vírgenes (Gráfica 3) ($1070 \pm 84.61 \mu\text{m}^2$ vs $842.0 \pm 108.9 \mu\text{m}^2$), ($t=1.651$; $df=10$, $p= 0.129$).



Gráfica 3.- Efecto de la gestación sobre el área transversal de las fibras del músculo bulboesponjoso. Las barras representan la media \pm el error estándar, $n=6$. T-Student $t=1.651$; $df=10$, $p= 0.1298$.

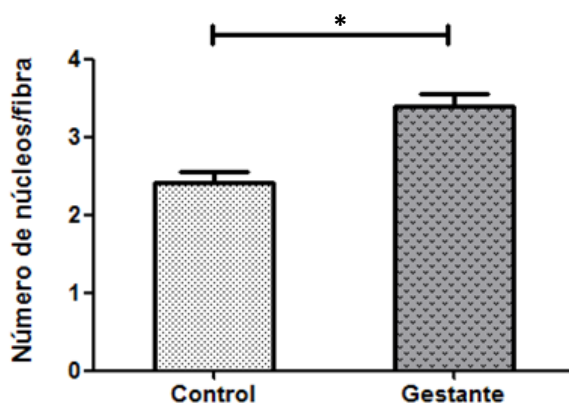
En el músculo bulboesponjoso del grupo de conejas gestantes se observa un mayor porcentaje de fibras con áreas mayores en comparación con el grupo de conejas vírgenes (Gáfica 4).



Gráfica 4.- Histograma de frecuencias del área transversal de las fibras del músculo bulboesponjoso.

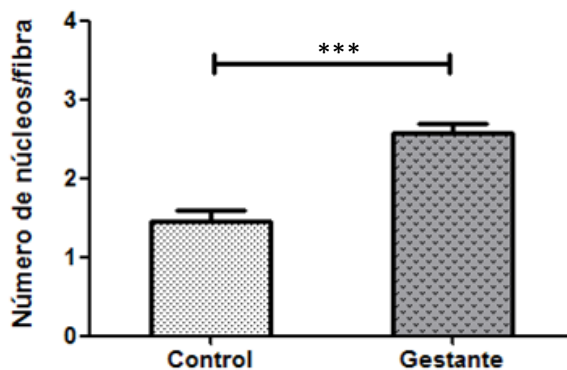
Número de mionúcleos periféricos

Las fibras del músculo pubococcígeo de conejas gestantes presentaron un mayor número de núcleos en comparación con las fibras del músculo pubococcígeo de conejas vírgenes (Gráfica 5) (3.390 ± 0.16 vs 2.417 ± 0.1267), ($t=4.714$; $df=10$, $p=0.0008$).



Gráfica 5.- Efecto de la gestación sobre el número de núcleos periféricos de las fibras del músculo pubococcígeo. Las barras representan la media \pm el error estándar, $n=6$. T-Student $t=4.714$; $df=10$, $p=0.0008$.

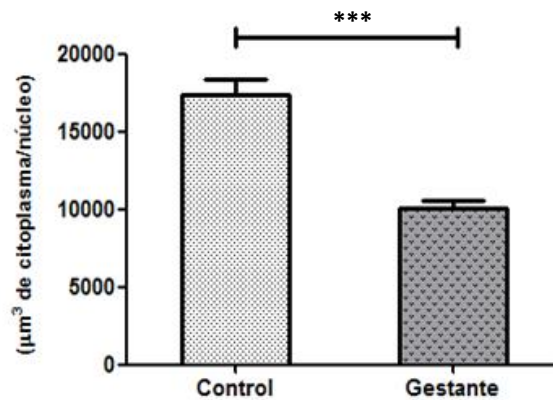
Las fibras del músculo bulboesponjoso de conejas gestantes presentaron un mayor número de núcleos en comparación con las fibras del músculo bulboesponjoso de hembras adultas vírgenes (Gráfica 6) (2.57 ± 0.12 vs 1.44 ± 0.13), ($t=6.078$; $df=10$, $p=0.0001$).



Gráfica 6.- Efecto de la gestación sobre el número de núcleos periféricos de las fibras del músculo bulboesponjoso. Las barras representan la media \pm el error estándar, $n=6$. T-Student $t=6.078$; $df=10$, $p=0.0001$.

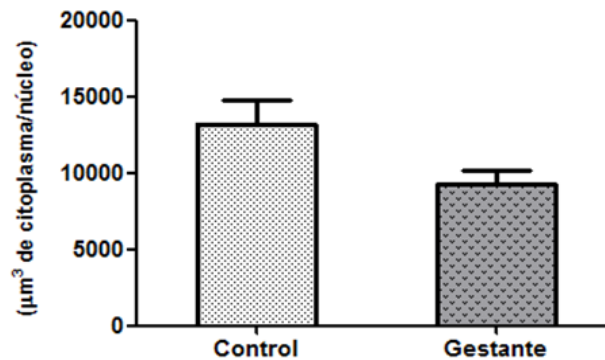
Dominio mionuclear

El músculo pubococcígeo de conejas gestantes presentaron un menor dominio mionuclear en comparación con el músculo pubococcígeo de conejas vírgenes (Gráfica 7) (10030 ± 520.2 vs 17331 ± 1010), ($t=6.427$; $df=10$, $p=0.0001$).



Gráfica 7.- Efecto de la gestación sobre el dominio mionuclear del músculo pubococcígeo. Las barras representan la media \pm el error estándar, $n=6$. T-Student $t=6.427$; $df=10$, $p=0.0001$.

El músculo bulboesponjoso de conejas gestantes no presentaron modificación en el dominio mionuclear en comparación con el músculo bulboesponjoso de conejas vírgenes (Gráfica 8) ($t=2.181$; $df=10$, $p=0.054$).

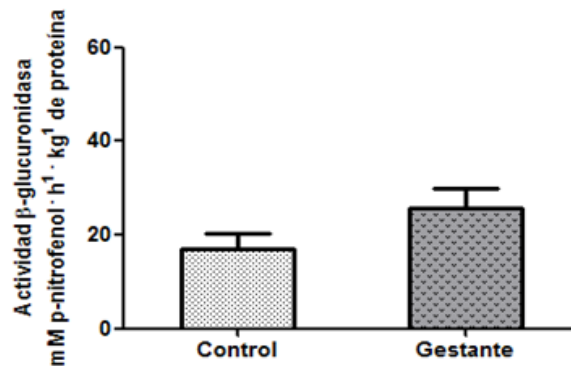


Gráfica 8.- Efecto de la gestación sobre el dominio mionuclear del músculo bulboesponjoso. Las barras representan la media \pm el error estándar, $n=6$. T-Student $t=2.181$; $df=10$, $p=0.0541$.

7.2 Marcadores bioquímicos de daño en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja

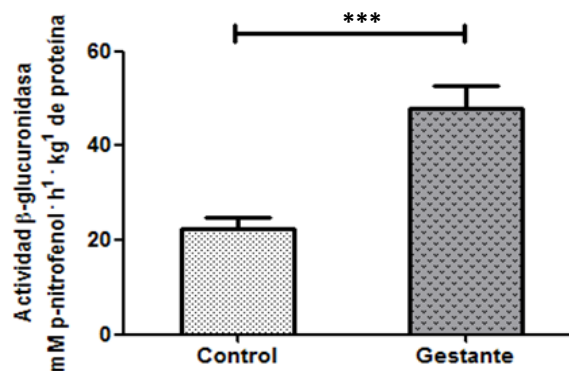
Actividad de la enzima β -glucuronidasa

El músculo pubococcígeo de conejas gestantes no presentaron modificación en la actividad de la enzima β -glucuronidasa en comparación con los músculos de las conejas vírgenes (Gráfica 9) (25.78 ± 3.97 vs 17.13 ± 3.28), ($t=1.596$; $df=12$, $p=0.136$).



Gráfica 9.- Efecto de la gestación sobre la actividad de la enzima β -glucuronidasa del músculo pubococcígeo. Las barras representan la media \pm el error estándar, $n=6$. T-Student $t=1.596$; $df=12$, $p=0.1366$.

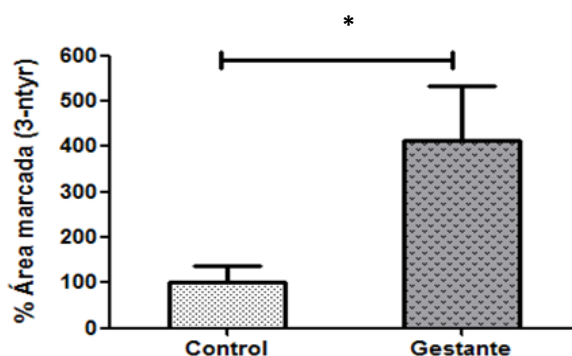
El músculo bulboesponjoso de conejas gestantes presentaron una mayor actividad de la enzima β -glucuronidasa en comparación con el músculo bulboesponjoso de conejas vírgenes (Gráfica 10) (47.76 ± 4.81 vs 22.33 ± 2.38) ($t=4.259$; $df=12$, $p=0.001$).



Gráfica 10.- Efecto de la gestación sobre la actividad de la enzima β -glucuronidasa del músculo bulboesponjoso. Las barras representan la media \pm el error estándar, $n=6$. T-Student $t=4.259$; $df=12$, $p=0.001$.

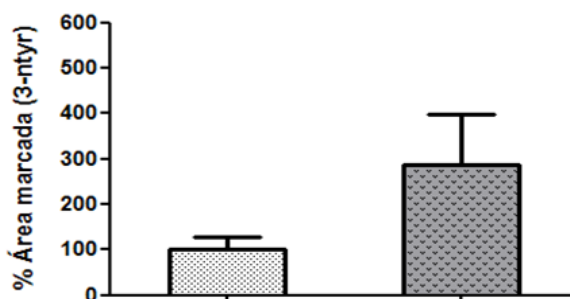
Expresión de 3-nitrotirosina (3-ntyr)

El músculo pubococcígeo de conejas hembras adultas gestantes presentaron una mayor expresión de 3-nitrotirosina en comparación con los músculos de conejas vírgenes (Gráfica 11) ($U_{26-52} = 5.0$, $p = 0.041$).



Gráfica 11.- Efecto de la gestación sobre la expresión de 3-nitrotirosina del músculo pubococcígeo. Las barras representan la media \pm el error estándar, $n=6$. U de Mann-Whitney $U_{26-52} = 5.0$, $p = 0.041$.

El músculo bulboesponjoso de conejas gestantes no presentaron modificación en la expresión de 3-nitrotirosina en comparación con el músculo bulboesponjoso de conejas vírgenes (Gráfica 12) ($U_{27-51} = 6.0$, $p = 0.064$).



Gráfica 12.- Efecto de la gestación sobre la expresión de 3-nitrotirosina del músculo bulboesponjoso. Las barras representan la media \pm el error estándar, $n=6$. U de Mann-Whitney $U_{27-51} = 6.0$, $p = 0.064$.

8. DISCUSIÓN

8.1 Características histológicas de los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la gestación modifica indicadores histológicos y bioquímicos asociados a daño.

En la mayoría de los cortes del músculo pubococcígeo de conejas gestantes adultas observamos fibras musculares con núcleos centralizados característicos del proceso de regeneración muscular, estos mionúcleos son el resultado de la fusión de nuevos mionúcleos originados por las células satélite y fibras musculares ya existentes (Brooks y cols. 2009, Scharner 2011). En algunos cortes observamos agregados celulares, posiblemente células del sistema inmune como los polimorfonucleares. La presencia de células del sistema inmune a nivel tisular indican expresión de un proceso inflamatorio derivado de daño (Malm y cols. 2004), la cantidad de células puede variar dependiendo del estado del proceso de daño y regeneración.

En el músculo bulboesponjoso de conejas gestantes solamente se observó una deformación de la fibra muscular (pérdida de la forma poligonal) correspondiente a edema, esta es una característica de daño debida al incremento en la permeabilidad celular como resultado de la ruptura del sarcolema (Chargé y Rudnicki, 2004). Es muy probable que las fibras musculares empiecen a dañarse.

Área transversal de la fibra

En el músculo pubococcígeo de conejas gestantes se observó una menor área trasversal de la fibra, consistente con el histograma de frecuencias, donde se muestra un desplazamiento hacia áreas mas pequeñas en comparación con las fibras del músculo pubococcígeo de conejas vírgenes. La reducción del área trasversal de la fibra se correlaciona con atrofia muscular y su origen puede deberse a diferentes causas como inmovilidad, deshuso, denervación o ruptura de ligamentos (Van der Mee y cols. 2011). La disminución del área trasversal de la fibra fue reportada por Oishi y cols. (2008) quienes utilizaron un modelo de inmovilidad de las patas traseras de ratas (2 semanas). Además de observar una menor área trasversal de las fibras musculares, reportaron una atrofia del 73% y un cambio en el fenotipo de las fibras, disminuyó el porcentaje de fibras tipo I (lentas) del músculo sóleo en

comparación con el grupo control. Por otra parte Zhang y cols. (2010) en el mismo modelo de suspensión de patas traseras pero en este caso por 28 días, reportó también una disminución del área transversal de un 44% en el músculo sóleo (lento), también analizaron el músculo extensor largo de los dedos (rápido) y no encontraron cambios en el área transversal de la fibra, esa diferencia podría estar relacionada con el tipo de fibras que componen a cada músculo, en este caso las fibras lentas fueron las más afectadas. También se ha observado una menor área transversal de las fibras musculares debido a denervación. Roland y cols. (2005) denervaron por aislamiento la médula espinal y observaron las modificaciones en el músculo sóleo de ratas machos, las fibras musculares presentaron una menor área trasversal, 4 días después no encuentran ningún cambio del tipo de fibra, pero al día 60 posterior al daño, aumenta el porcentaje de fibras de tipo II (rápidas), demostrando una adaptación metabólica de la fibra muscular posterior al daño.

Se ha reportado que el parto puede causar una denervación progresiva de la musculatura pélvica (Phillips y cols. 2005), aunque en este caso no evaluamos el efecto del parto sino de la gestación, es posible que la gestación también participe de alguna manera en ésta denervación. Es probable que durante la gestación, los cambios en la curvatura de la columna vertebral modifique de alguna manera la inervación del músculo pubococcígeo.

En el músculo bulboesponjoso de las hembras gestantes no se observó ningún cambio significativo en el área transversal de las fibras aunque en el histograma de frecuencias de observó un mayor porcentaje de fibras con áreas mayores en comparación con las de las hembras adultas vírgenes, esto puede estar relacionado al edema presente en las fibras musculares como resultado de la ruptura del sarcolema de las fibras musculares, lo que caracteriza a las etapas iniciales de daño (Venojärvi y cols. 2004).

Número de mionúcleos periféricos

En el músculo pubococcígeo y en el músculo bulboesponjoso de conejas gestantes se encontró un aumento significativo en el número de mionúcleos periféricos. En el músculo estriado el aumento del número de mionúcleos se ha reportado en procesos de desarrollo y regeneración muscular (Brooks y cols. 2009, White y cols. 2010). En el músculo pubococcígeo el aumento en el número de mionúcleos podría deberse a una etapa de regeneración. Debido a que los mionúcleos son post-mitóticos, las células satélite

proveen nuevos mionúcleos al músculo estriado, esos núcleos se fusionan con fibras musculares (presencia de núcleos centralizados) para originar nuevas fibras musculares (Chargé y Rudnicki 2004, Harridge 2007).

El aumento en el número de mionúcleos en el músculo bulboesponjoso posiblemente este asociado a una etapa de daño, en nuestro trabajo no pudimos discernir si dentro del conteo del número de mionúcleos incluimos células del sistema inmune como polimorfonucleares.

Dominio mionuclear

En el músculo pubococcígeo de conejas gestantes el dominio mionuclear es menor en comparación con el de conejas vírgenes, lo que nos indica que es necesaria una mayor síntesis de proteínas. Un dominio mionuclear menor es característico en procesos como la regeneración muscular (Allen y cols. 1999). El requerimiento proteínico requerido por un músculo ante un daño o demanda, es observado en el dominio mionuclear, por lo que este parámetro nos muestra las modificaciones a nivel celular, es decir la capacidad plástica del músculo. Zhong y cols. (2005) reportaron que la denervación en el sóleo de ratas hembras provoca en las fibras musculares una menor área transversal de las fibras, un menor número de mionúcleos periféricos y por lo tanto reportan un menor dominio mionuclear posiblemente debido a la inactividad crónica. También se modificó también el porcentaje de fibras de tipo I, ese porcentaje disminuyó con respecto a las de tipo II. Estas modificaciones son dependientes del tipo de fibra. Posiblemente el músculo pubococcígeo presente algún grado de denervación.

En el músculo bulboesponjoso de conejas gestantes no se modificó el dominio mionuclear en comparación con las conejas vírgenes, posiblemente aún no se requiere una mayor síntesis de proteínas. La síntesis de proteínas se asocia principalmente a un proceso de regeneración muscular (Allen y cols. 1999). Por lo que es posible que éste músculo este en una etapa de daño.

8.2 Indicadores bioquímicos de daño en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja

Actividad de la enzima β -glucuronidasa

En el músculo pubococcígeo de conejas gestantes no se encontraron cambios en la actividad de la enzima β -glucuronidasa en comparación con las conejas vírgenes, esto concuerda con las características histológicas observadas (disminución del área transversal de las fibras, aumento en el número de mionúcleos y un menor dominio mionuclear), las que corresponden a una fase de regeneración muscular, el aumento en la actividad de la enzima β -glucuronidasa se ha observado en procesos de daño muscular y se ha reportado un pico máximo 5 días después del insulto (Vihko y Salminen 1983), por lo que es posible que el daño en el músculo pubococcígeo haya ocurrido en el día 20 de gestación.

En el músculo bulboesponjoso de conejas gestantes hay un incremento en la actividad de la enzima β -glucuronidasa en comparación con las conejas vírgenes, de acuerdo con Salminen y Vihko (1982), la actividad de ésta enzima incrementa en procesos de daño debido a la ruptura de la integridad de las fibras musculares. Vihko y Salminen (1983) Demostraron que la actividad de la enzima β -glucuronidasa aumenta en el músculo recto femoral de ratones macho después de someterlos a ejercicio, en comparación con los ratones que no ejercitaron. Por lo que es probable que las fibras del músculo bulboesponjoso estén en una etapa inicial degenerativa o de daño, en este evento se produce la liberación de las enzimas lisosomales como la β -glucuronidasa (Chargé y Rudnicki 2004).

Expresión de 3-nitrotirosina (3-nty)

En el músculo pubococcígeo de conejas gestantes hay una mayor expresión de 3-nitrotirosina, posiblemente como consecuencia de la liberación de especies reactivas del oxígeno de las células inflamatorias y macrófagos presentes en las fibras musculares que se dañaron (Kohen y Nyska 2002). Se ha reportado que la generación de especies reactivas (estrés oxidativo) está asociada a patologías musculares principalmente las asociadas a la vejez como la sarcopenia (Thompson 2009).

En el músculo bulboesponjoso de conejas gestantes, no hay ninguna diferencia en la expresión de 3-nitrotirosina con respecto al grupo de conejas vírgenes, posiblemente esta en una etapa inicial de daño y aún se ha podido regular la cantidad de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno por medio de las enzimas antioxidantes como la súper óxido dismutasa han podido regular la liberación de las especies reactivas del oxígeno liberadas por las células del sistema inmune como polimorfonucleares, por lo que no observamos cambios (Bonetto y cols. 2009).

En resumen el músculo pubococcígeo de conejas gestantes observamos los siguientes cambios histológicos: presencia de núcleos centrales, disminución del área transversal de la fibra, un mayor porcentaje de fibras con áreas menores, un aumento en el número de núcleos periféricos y un dominio mionuclear menor en comparación con las hembras adultas vírgenes, estos cambios se asocian a un proceso de regeneración muscular. En los indicadores bioquímicos la actividad de la enzima β -glucuronidasa no se modificó, pero la expresión de 3-nitrotirosina incremento en las conejas gestantes en comparación con las conejas vírgenes. Los indicadores bioquímicos se correlacionan con los histológicos, es probable que el músculo pubococcígeo se encuentre en una etapa de regeneración muscular indicándonos que este músculo se haya dañado antes del día 30 de gestación (día de sacrificio).

En el músculo bulboesponjoso de conejas gestantes observamos los siguientes cambios histológicos: presencia de edema en las fibras musculares, no se modificó significativamente el área transversal de la fibra pero se presentó un mayor porcentaje de fibras con áreas menores, un aumento en el número de núcleos periféricos pero no se modificó el dominio mionuclear en comparación con las conejas vírgenes. En los indicadores bioquímicos la actividad de la enzima β -glucuronidasa incrementó pero la expresión de 3-nitrotirosina se mantuvo sin cambios en las conejas gestantes en comparación con las conejas vírgenes. Los cambios observados se asocian a un proceso de daño.

Es probable que durante la gestación los cambios mecánicos como el aumento en la presión intrabdominal o modificaciones en la postura de la columna vertebral pueda alterar la integridad de los músculos estriados pélvicos y perineales, posiblemente inervación. En particular en la coneja doméstica se presenta un patrón conductual antes del parto (se quitan

el pelo para realizar su nido) que posiblemente este influenciando las modificaciones asociadas a daño de los músculos pélvicos y perineales.

En relación con el factor hormonal, se podría pensar que estas modificaciones histológicas y bioquímicas observadas en las conejas gestantes estén influenciadas por el incremento en la concentración sérica de estradiol al día 30 de gestación, Lara-García y cols. (2011) observaron que en ratas ovariectomizadas aumenta el área transversal de las fibras de músculo pubococcígeo, efecto que se magnifica al administrarles propionato de testosterona o benzoato de estradiol, sin embargo al administrarles 17- β estradiol, el aumento en el área producido por la ovariectomía es revertido. Por lo que es muy probable que haya un efecto en las características histológicas pero no así en los indicadores bioquímicos, el incremento en la actividad de la enzima β -glucuronidasa no es influenciada a la alta por las hormonas gonadales ni en la expresión de 3-nitrotirosina, hay reportes que afirman efectos protectores del estradiol ante daño provocado en el músculo estriado. Este efecto se ve reflejado en baja actividad de la enzima β -glucuronidasa (Enns y Tidus 2008) así como en los niveles de estrés oxidativo. Sin embargo sería necesario realizar otros experimentos para saber el efecto real del estradiol sobre las características histológicas encontradas en este trabajo.

Con respecto a la expresión de 3-nitrotirosina es probable que la nitración de proteínas este modificando en algún grado el metabolismo o la fuerza de contracción de las fibras musculares. Dentro de las proteínas que se nitran como consecuencia de la interacción con radicales libres en músculo estriado se encuentran la creatina cinasa, la aldolasa, la glucógeno fosforilasa y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, que participan en el metabolismo muscular y otras como la cadena ligera de miosina, la actina y la tropomiosina I, afectando de esta manera a la contracción muscular (Souza y cols. 2008). Además se podrían modificar vías de diferenciación y desarrollo celular que se activan por medio de reacciones oxido-reducción (Allen y Tresini, 2000). Se ha reportado que las células musculares se adaptan ante dichos cambios lo que nos indicaría un proceso de plasticidad muscular derivada de daño (Powers y cols. 1995). Es posible que los diferentes cambios observados en los dos músculos se deban a la posición anatómica en la que se ubica cada músculo, por lo que el tiempo en el que se dañan es diferente.

9. CONCLUSIONES

- En el músculo pubococcígeo de conejas hembras adultas gestantes se observan cambios histológicos como menor área transversal de las fibras, un mayor porcentaje de fibras con áreas menores, un aumento del número de núcleos periféricos y un dominio mionuclear menor con respecto al grupo de conejas hembras adultas vírgenes.
- En el músculo pubococcígeo de conejas hembras adultas gestantes no se observó cambio en la actividad de la enzima β -glucuronidasa pero sí un incremento en la expresión de 3-nitrotirosina, en comparación con conejas hembras adultas vírgenes.
- En el músculo bulboesponjoso de conejas hembras adultas gestantes no se observaron cambios en el área transversal de las fibras, pero sí un mayor porcentaje de fibras con áreas mayores, un aumento del número de núcleos periféricos y un dominio mionuclear sin modificaciones con respecto al grupo de conejas hembras adultas vírgenes.
- En el músculo bulboesponjoso de conejas hembras adultas gestantes se observó un aumento en la actividad de la enzima β -glucuronidasa pero ninguna modificación en la expresión de 3-nitrotirosina, en comparación con conejas hembras adultas vírgenes.
- La gestación modifica diferencialmente indicadores histológicos y bioquímicos asociados a daño a los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja.
- Estos resultados indican que el músculo pubococcígeo se encuentra en una etapa de regeneración muscular y que el músculo bulboesponjoso se encuentra en una etapa inicial de daño.

10. PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo demuestran que la gestación modifica marcadores histológicos y bioquímicos de daño diferencialmente en el músculo pubococcígeo y al bulboesponjoso. Las características histológicas y bioquímicas en el músculo pubococcígeo indican que se encuentra en una etapa de regeneración muscular, por lo que es probable que se haya dañado antes del día 30 de gestación, por otra parte las características histológicas y bioquímicas asociadas a daño en el músculo bulboesponjoso señalan que se encuentra en una etapa de daño, posiblemente al día 30 de gestación empiezan a dañarse. Por lo que sería necesario realizar un muestreo para el músculo pubococcígeo al día 15 o 20 de gestación para visualizar características de daño, de manera contraria para el músculo bulboesponjoso, sería necesario extraerlo el día del parto para visualizar los cambios histológicos asociados a daño como infiltración celular.

De igual manera se podrían cuantificar marcadores moleculares asociados a regeneración muscular como las células satélite o factores de transcripción Pax3 y Pax7, entre otros. Así como la identificación de células del sistema inmune como neutrófilos o macrófagos, lo que podría aportar gran información acerca de curso del proceso de daño y regeneración.

Estas aproximaciones podrían contribuir al entendimiento del proceso de gestación y a la modificación que sufren los músculos estriados pélvicos y perineales durante esta etapa reproductiva, que finalmente es asociada con la incidencia de presentar incontinencia urinaria, un problema de salud que se ha vuelto importante debido al aumento en su incidencia y al impacto que esta disfunción ocasiona en la mujer.

11. REFERENCIAS

- Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, Van kerrebroeck P, Victor A y Wein A. 2003. The standardisation of terminology in lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the international continence society. *Urology* 61:37–49.
- Allen DL, Roy RR y Edgerton R. 1999. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle and Nerve* 22:1350–1360.
- Allen RG y Tresini M. 2000. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology and Medicine* 28:463-499.
- Alves PG, Nunes FR y Guirro EC. 2011. Comparison between two different neuromuscular electrical stimulation protocols for the treatment of female stress urinary incontinence: a randomized controlled trial. *Revista Brasileira de Fisioterapia* 15:393-398.
- Ashton-Miller JA y DeLancey JO. 2007. Functional anatomy of the female pelvic floor. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1101:266-296.
- Ashton-Miller JA y DeLancey JO. 2009. On the Biomechanics of Vaginal Birth and Common Sequelae. *Annual Review of Biomedical Engineering* 11:163-176.
- Arrue M, Diez-Itza I, Ibañez L, Paredes J, Murgiondo A y Sarasqueta C. 2011. Factors involved in the persistence of stress urinary incontinence from pregnancy to 2 years postpartum. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 115:256–259.
- Barber MD. 2005. Contemporary views on female pelvis anatomy. *Journal of Medicine* 72:3-11.
- Bonetto A, Penna F, Muscaritoli M, Minero VG, Fanelli FR, Baccino FM y Costelli P. 2009. Are antioxidants useful for treating skeletal muscle atrophy? *Free Radical Biology and Medicine* 47:906–916.
- Bortolini M, Drutz H, Lovatsis D y Aralab M. 2010. Vaginal delivery and pelvic floor dysfunction: current evidence and implications for future research. *International Urogynecology Journal* 21:1025-1030.
- Brooks NE, Schuenke MD y Hikida RS. 2009. Ageing influences myonuclear domain size differently in fast and slow skeletal muscle of rats. *Acta Physiologica* 197:55-63.

- Chargé SB y Rudnicki MA. 2004. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiological Reviews* 84:209-238.
- Child R, Brown S, Day S, Donnelly A, Roper H y Saxton J. 1999. Changes in indices of antioxidant status, lipid peroxidation and inflammation in human skeletal muscle after eccentric muscle actions. *Clinical Science* 96:105-115.
- 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* 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.
- Deindl FM, Vodusek DB, Bischoff C, Hofmann R y Hartung R. 1998. Dysfunctional voiding in women: which muscles are responsible? *British Journal of Urology* 82:814-819.
- Dimpfl T, Jaeger C, Mueller-Felber W. 1998. Myogenic changes of the LAM in premenopausal women: The impact of vaginal delivery and age. *Neurourology and Urodynamics* 17:197-205.
- Drummond MJ, Dreyer HC, Pennings B, Fry CS, Dhanani S, Dillon EL, Sheffield-Moore M, Volpi E y Rasmussen BB. 2008. Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging. *Journal of Applied Physiology* 104:1452-1461.
- Dubowitz V. 1985. Definition of pathological changes seen in muscle biopsies In: Dubowitz V, Brooke M.H., Editors. *Muscle biopsies: A practical approach*. 2nd edition London. Editorial Bailliere Tindall pp 82-128.
- Enns DL y Tiidus PM. 2008. Estrogen influences satellite cell activation and proliferation following downhill running in rats. *Journal of Applied Physiology* 104: 347-353.
- 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 rabbits. *International Urogynecology Journal* 19:843-849.

- Fluck M. 2009. Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. *The Journal of Experimental Biology* 209:2239-2248.
- Fulle S, Protasi F, Di Tano G, Pietrangelo T, Beltramin A, Boncompagni S, Vecchiet L y Fano G. 2004. The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. *Experimental Gerontology* 39:17-24.
- Glenmark B, Nilsson M, Gao H y Gustafsson. 2004. Difference in skeletal muscle function in males vs. females: role of estrogen receptor. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 287:1125-1131.
- Guillot C, Steinberg JG, Delliaux S, Kipson N, Jammes Y y Badier M. 2008. Physiological, histological and biochemical properties of rat skeletal muscles in response to hindlimb suspension. *Journal of Electromyography and Kinesiology* 18:276-283.
- Harridge Stephen DR. 2007. Plasticity of human skeletal muscle gene expression to in vivo function. *Experimental Physiology* 92:783-797.
- Haylen BT. 2009. Female Voiding dysfunction: prevalence and common associations. *Current Urology Reports* 10:421-427.
- Hikida RS, Van Nostran S, Murray JD, Staron RS, Gordon SE y Kraemer WJ. 1997. Myonuclear loss in atrophied soleus muscle fibers. *The Anatomical Record* 247:350-354.
- Jackson MJ. 2009. Redox regulation of adaptive responses in skeletal muscle to contractile activity. *Free Radical Biology and Medicine* 47:1267-1275.
- Jundt K, Kiening M, Fischer P, Bergauer F, Rauch E, Janni W, Peschers U y Dimpfl Thomas. 2005. Is the Histomorphological Concept of the Female Pelvic Floor and its Changes due to Age and Vaginal Delivery Correct? *Neurourology and Urodynamics* 24:44-50.
- Kamel RM. 2010. The onset of human parturition. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 281:975-982.
- Kohen R y Nyska A. 2002. Invited review: Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology* 30:620-650.

- Koskinen SO, Wang AM, Ahtikoski MK, Han XY, Komulainen J, Kovanen V y Takala T. 2001. mRNAs and proteins regulating type IV collagen content Acute exercise induced changes in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 280:R1292-R1300.
- Klutke CG y Siegel CL. 1995. Functional female pelvis anatomy. *Urologic Clinics of North America*. Volume 22, num. 3.
- Lara-García M, Alvarado M, Cuevas E, Cortés-Sol A, Domínguez A, Tovar A y Pacheco P. 2011. The effects of castration and hormone replacement on the cross-sectional area of pubococcygeus muscle fibers in the female rat. *The Anatomical Record* 294:1242-1248.
- Lien KC, Mooney B, DeLancey JO y Ashton-Miller JA. 2004. Levator ani stretch induced by simulated vaginal birth. *Obstetrics and Gynecology* 103:31-40.
- López-García K. 2010. Efecto de la experiencia reproductiva sobre la sensibilidad estrogénica de los músculos estriados pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- 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. *The Anatomical Record* 247:486-495.
- Martínez-Gómez M, Mendoza-Martínez G, Corona-Quintanilla DL, Fajardo V, Rodríguez-Antolín J y Castelán F. 2011. Multiparity causes uncoordinated activity of pelvic and perineal striated muscles and urodynamic changes in rabbits. *Reproductive Sciences* 1:1-7.
- Martínez-Gómez M, Corona-Quintanilla DL, Cruz-Gómez Y, Zempoalteca R, Rodríguez-Antolín J y Castelán F. 2012. The Role of Pelvic and Perineal Muscles in Reproductive and Excretory Functions, Applications of EMG. *Clinical and Sports Medicine* 2:269-288.
- Murakami H, Guillet C, Nicolas T, Salles J, Migné C y Boirie Y. 2012. Cumulative 3-nitrotyrosine in specific muscle proteins is associated with muscle loss during aging. *Experimental Gerontology* 47:129-135.
- Netter FH. 2002. Sistema reproductor. Colección Netter de ilustraciones médicas. Elsevier, España 2:566-572

- Oishi Y, Ogata T, Yamamoto K, Terada M, Ohira T, Ohira Y, Taniguchi K y Roy RR. 2008. Cellular adaptations in soleus muscle during recovery after hindlimb unloading. *Acta Physiologica* 192:381-395.
- Phillips C y Monga A. 2005. Childbirth and the pelvic floor: “the gynaecological consequences”. *Reviews in Gynaecological Practice* 5:15–22.
- Powers SK, Duarte J, Kavazis AN y Talbert EE. 1995. Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. *Experimental Physiology* 95:1-9.
- Rosser BWC, Dean MS y Bandman E. 2002. Myonuclear domain size varies along the lengths of maturing skeletal muscle fibers. *The International Journal of Developmental Biology* 46:747-754.
- Sánchez-García O. 2012. Efecto de la primiparidad sobre indicadores histológicos y bioquímicos relacionados con daño en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Schmalbruch H y Levis DM. 2000. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle and Nerve* 23:617-626.
- Stockmar C, Lillb H, Trappa A, Jostena CJ y Punkt K. 2006. Fibre type related changes in the metabolic profile and fiber diameter of human vastus medialis muscle after anterior cruciate ligament rupture. *Acta Histochemica* 108:335-342.
- Salminen A y Vihko V. 1982. Changes of dipeptidyl aminopeptidase activities in mouse skeletal muscle following prolonged running. *Comparative Biochemistry and Physiology* 71B:23-27.
- Shafik A. 1994. Utero-cervical inhibitory reflex. The description of a reflex and its clinical significance. *Human Reproduction* 9:2220-2223.
- Shafik A, Asaad S y Doss S. 2002. The histomorphologic structure of the levator ani muscle and its functional significance. *International Urogynecology Journal and Pelvic Floor Dysfunction* 13:116-124.
- Shafik A, Shafik AA, El-Sibai O y Shafik IA. 2008. Effect of micturition on clitoris and cavernosus muscles: an electromyographic study. *International Urogynecology Journal and Pelvic Floor Dysfunction* 19:531-535.

- Souza JM, Peluffo G y Radi R. 2008. Protein tyrosine nitration-Functional alteration or just a biomarker? *Free Radical Biology and Medicine* 45:357-366.
- Thompson LV. 2009. Age-related muscle dysfunction. *Experimental Gerontology* 44:106–111
- Tseng BS, Kasper CE y Edgerton VR. 1994. Cytoplasm-to-myonucleus ratios and succinate dehydrogenase activities in adult rat slow and fast muscle fibers. *Cell and Tissue Research* 275:39-49.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M y Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 39:44-84.
- Van der Meer SFT, Jaspers RT y Degens H. 2011. Is the myonuclear domain size fixed? *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interact* 11:286-297.
- Velázquez-Magaña M, Bustos LHH, Poceros RG, Oviedo OG, Neri RE y Sánchez CC. 2007. Prevalencia y calidad de vida en mujeres con incontinencia urinaria. Estudio en población abierta. *Ginecología y Obstetricia de México* 75:347-56.
- Venojärvi M, Kvist M, Ataly M, Jozsa L y Kalimo H. 2004. Recovery from immobilisation: responses of fast-twitch muscle fibers to spontaneous and intensive exercise in rat calf muscles. *Pathophysiology* 11:17-22.
- Vihko V y Salminen A. 1983. Acid hydrolase activity in tissues of mice after physical stress. *Comparative Biochemistry and Physiology* 76B:341-344.
- Westerblad H, Bruton JD y Katz A. 2010. Skeletal muscle: energy, metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. *Experimental Cell Research* 316:3093-3099.
- White RB, Biérinx A, Gnocchi VF y Zammit PS. 2010. Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. *Developmental Biology* 10:21-28.
- Zhang BT, Yeung SS, Liu Y, Wang H, Wan Y, Lin S, Zhang H, Hui Y y Yeung EW. 2010. The effects of low frequency electrical stimulation on satellite cell activity in rat skeletal muscle during hindlimb suspension. *Cell Biology* 11:87-93.
- Zhong H, Roy RR, Siengthai B y Edgerton VR. 2005. Effects of inactivity on fiber size and myonuclear number in rat soleus muscle. *Journal of Applied Physiology* 99:1494–1499.

12. ANEXOS

Técnica Histológica

Lavados	Solución salina	3 lavados
Fijación	Bouin- Duboscq	24 hr
Lavados	Etanol 50%	5 min
Deshidratación	Etanol 60%	15 min
	Etanol 70%	25 min
	Etanol 80%	25 min
	Etanol 80%	40 min
	Etanol 96%	45 min
	Etanol 96%	45 min
	Etanol 100%	45 min
	Etanol 100%	45 min
Aclaramiento	Etanol: Xileno	40 min
	Xileno	40 min
	Xileno	45 min
Infiltración	Paraplast I	1:30hr
Inclusión	Paraplast II	6:30 hr

Tinción de hematoxilina-eosina

desparafinar	xileno 1	5 min
	xileno 2	5 min
	xileno:Etanol	5 min
hidratación	etanol 100%	5 min
	etanol 100%	5 min
	etanol 96%	3 min
	etanol 80%	3 min
	agua destilada	3min
	hematoxilina de Harris	11 min
	agua corriente	40 seg
Contraste	etanol ácido	40 seg
	agua destilada	40 seg
Azulamiento	Etanol amoniacal	3-4 min
	agua destilada	40 seg
	Eosina	3-4 min
	agua destilada	40 seg
desidratacion	etanol 96%	40 seg
	etanol 96%	40 seg
	etanol 100%	30 seg
	etanol 100%	30 seg
	Etanol:Xileno	10 seg
	Xileno	10 seg
	xileno	10 seg

13. PUBLICACIONES

Algunos resultados mostrados en esta tesis fueron organizados para su presentación en congresos nacionales.

Maribel Huerta Cervantes, Octavio Sánchez García, José Ramón Eguibar Cuenca, Ida Soto Rodríguez, Estela Cuevas Romero, Margarita Martínez-Gómez, Jorge Rodríguez Antolín y Francisco Castelán. Efecto de la gestación y el parto sobre el marcaje anti 3-nitrotirosina en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja. XXXVII Reunión Nacional del AIBIR. Pachuca Hidalgo, 2012.

Efecto de la gestación y el parto sobre el marcaje anti 3-nitrotirosina en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja



Maribel Huerta Cervantes², Octavio Sánchez García², José Ramón Eguibar⁴, Ida Soto³, Estela Cuevas¹, Margarita Martínez-Gómez^{1,5}, Jorge Rodríguez Antolín¹ y Francisco Castelán¹ (Avalado por Francisco Castelán).

¹Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx);

²Maestría en Ciencias Biológicas, UATx; ³Facultad de Bioanálisis-Veracruz, Universidad Veracruzana; ⁴Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; ⁵ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

La reproducción femenina en los mamíferos involucra varios procesos fisiológicos y conductuales como el parto y episodios simultáneos de gestación y lactancia. El parto es un factor de riesgo asociado con daño de la musculatura estriada pélvica y la perineal. En mujeres la disfunción de estos músculos se ha relacionado con prolapsos de órganos pélvicos, incontinencia fecal e incontinencia urinaria. En la coneja doméstica el músculo pubococcígeo (mPc) se activa durante el almacenamiento de orina y los músculos perineales como el bulboesponjoso (mBe) lo hace durante la expulsión urinaria. En nuestro grupo hemos observado que la experiencia reproductiva modifica las características histológicas, disminuye la fuerza de contracción y desorganiza la actividad electromiográfica del mPc y mBe. Tales modificaciones podrían explicarse como mecanismos adaptativos que alteran la composición, función y probablemente el metabolismo de esos músculos. Estudios recientes evidencian la participación de las especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno en las respuestas adaptativas o plásticas. Uno de los marcadores más utilizado para identificar la presencia e interacción de especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN) es la 3-nitrotirosina. En el músculo se han identificado diversas proteínas nitradas destacando las que participan en el metabolismo de glucosa y en la contracción muscular. Considerando lo anterior, el objetivo de este proyecto fue determinar la inmunorreactividad anti 3-nitrotirosina en el mPc y mBe de conejas vírgenes (control), gestantes y primíparas. Resultados: En comparación con el grupo control, la primiparidad incrementa el porcentaje de área marcada con 3-nitrotirosina en el mPc a los 3 y 20 días postparto. Ese no fue el caso para el mBe, donde el área inmunorreactiva anti 3-nitrotirosina es similar entre los grupos. Tales efectos fueron debidos al parto y no a la gestación. Estos resultados sugieren que el parto induce un incremento en la producción ERO y ERN, posiblemente como una respuesta adaptativa. El incremento en estas especies reactivas podría ser un factor importante que modifique el tipo de contracción y/o el metabolismo muscular.

Con financiamiento de PROMEP-SEP (UATLX-PTC-109 a FC) y CONACyT (105882 a MMG). MHC y OSG recibieron una beca predoctoral de CONACyT (248106 y 248123). MHC recibió una beca de Movilidad ECOES-Santander.

27-30 de junio de 2012. Pachuca, Hidalgo