

## INTRODUCCIÓN

Los músculos estriados pélvicos y perineales participan en conductas reproductivas y no reproductivas en diversas hembras de mamíferos. En la mujer, las modificaciones histológicas y funcionales de estos músculos, derivadas de la experiencia reproductiva, se asocian con el desarrollo de incontinencia urinaria por esfuerzo. En la coneja doméstica, modelo de estudio utilizado por nuestro grupo de investigación, dos de los principales músculos estriados involucrados en la continencia urinaria, la cópula y el parto son los músculo pubococcígeo (mPc) y músculo bulboesponjoso (mBe; Cruz y col. 2002, Martínez-Gómez y col. 2011). En esta especie se ha reportado que la experiencia reproductiva de cuatro partos (multiparidad) disminuye la fuerza de contracción del mPc y mBe (Fajardo y col. 2009). Recientemente, en este mismo modelo hemos encontrado diferencias en el área transversal de la fibra y en el número de núcleos periféricos que ocurre selectivamente en el mPc de las conejas multíparas (López-García 2010). Probablemente la experiencia reproductiva induce adaptaciones diferenciales en ambos músculos por la ruptura de las fibras musculares y estos cambios se reflejen en el aumento del enzima  $\beta$ -glucuronidasa y cambios en el dominio mionuclear (DMN).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Anatomía y musculatura estriada pélvica y perineal

La reproducción de las hembras de mamíferos tiene como sustrato anatómico las áreas pélvica y perineal. Un componente importante de estas es la musculatura estriada. En mujeres, se ha destacado la importancia del complejo muscular o “diafragma pélvico” en la respuesta sexual y el parto (Barber 2005; Ashton-Miller y DeLancey 2009), así como en la continencia urinaria. La musculatura estriada pélvica y la perineal están directamente involucradas en el proceso de micción, un proceso fisiológico que consta de dos eventos coordinados: el almacenamiento y la expulsión de la orina de la vejiga a través de la uretra. En estos eventos ocurre la actividad neuromuscular, incluyendo la actividad del músculo liso de la vejiga y el esfínter externo de la uretra del conducto urinario inferior (Peschers y col. 2001). El piso pélvico está formado por un conjunto de músculos que sustentan la porción abdominal inferior y sirven de apoyo a la vejiga, el útero y una porción del intestino (Peña y col. 2007). Es fundamental que esta musculatura mantenga una buena función, ya que la debilidad del piso pélvico puede causar incontinencia urinaria de esfuerzo, prolapsos rectales y vaginales, así como disfunciones sexuales (Peña y col. 2007).

El piso pélvico está situado en el fondo de la cavidad abdominal y constituye una plataforma de apoyo para las vísceras abdominales y pélvicas (Barber 2005). Los músculos del piso pélvico forman una membrana que se extiende de la cavidad pélvica. Sus fibras tienen forma de “U” que rodean el hiato elevador, proveen soporte a los órganos pélvicos y abdominales. En la mujer los músculos del *levator ani* consisten de cinco partes: el pubovaginal, el puboperineal, porción puboanal, el cual forma el complejo pubovisceral y el músculo puborectalis e ileococcígeo. Esas partes del *levator ani* forman tres diferentes regiones del piso pélvico. (Ashton-Miller y DeLancey 2009). El piso pélvico está compuesto por dos capas musculares: la superficial y profunda. La capa superficial es relevante para la función de esfínter anal. La capa profunda del piso pélvico está formada por el músculo pubococcígeo (mPc), ileococígeo y puborrectalis, los cuales forman el complejo muscular elevador del ano (*levator ani*, Varuna y Ravinder 2008). Algunos músculos del *levator ani*, como el mPc proporcionan soporte a la vejiga y la uretra. El

músculo bulboesponjoso (mBe) que es uno de los músculos perineales brinda soporte a la vagina distal donde su fisiología es importante en procesos reproductivos y no reproductivos (Barber 2005). La relación funcional y anatómica de ambos músculos contribuyen al cerrado uretral durante la continencia (Ashton-Miller y DeLancey 2007).

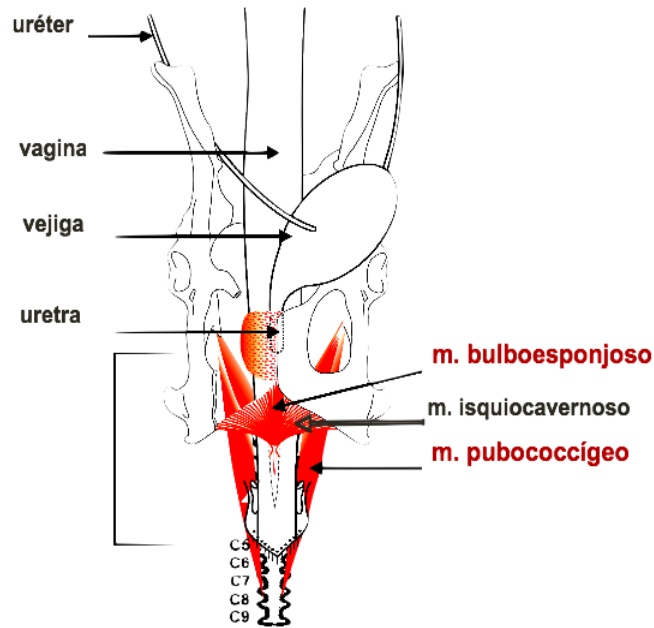
Conceptualmente el mecanismo de la continencia urinaria puede ser a través de dos componentes. La primera estructura soporta al aparato urinario y está compuesta de musculatura estriada y tejido conectivo. La segunda estructura es neuromuscular dada principalmente por el nervio pudendo (NP) y por el mecanismo del esfínter externo de la uretra (EEU). En el parto se ha reportado como un factor de riesgo para padecer incontinencia urinaria probablemente al daño de alguno de estos componentes. El daño a la musculatura del piso pélvico principalmente a la porción pubovisceral del *levator ani* se asocia principalmente con el parto (Gill y col. 2010).

Durante el parto los músculos del piso pélvico sufren cambios notables para permitir el paso del feto del interior al exterior del cuerpo de la madre. Todas las mujeres sufren estiramiento de los músculos del piso pélvico durante el parto pero poco se sabe de las lesiones que ocurren. Las características específicas de la lesión durante el parto influyen sobre el desarrollo de incontinencia urinaria en una fase más tarde de la vida (Ashton-Miller y DeLancey 2009). Mediante el uso de un modelo geométrico, estos autores proponen como el estiramiento excesivo de las fibras musculares de los músculos del piso pélvico ocasiona un daño a esta musculatura, afectando principalmente a los músculos pubococcígeo e ileococcígeo (Ashton-Miller y DeLancey 2009).

La incontinencia urinaria, fecal y prolapsos de órganos viscerales son un problema de salud pública (Cheng y col. 2004). La musculatura estriada del *levator ani* forma un importante elemento de la estructura de soporte de la pelvis, participan en procesos de micción y defecación, esta musculatura previenen prolapsos pélvicos durante el aumento de la presión abdominal y movimientos asociados con las actividades diarias (Lien y col. 2004). Un factor de riesgo en la mujer es la multiparidad que se encuentra asociada con algunas disfunciones fisiológicas de la musculatura pélvica. Aparte de esta estimación poco se conoce de la relación entre estructura del *levator ani* (morfología e integridad funcional) y la relación eventual relacionada con los síntomas esto a través del daño a los músculos del

*levator ani* pueden conducir a una función pobre y secundario pueden llevar a síntomas tales como incontinencia urinaria, prolapsos e incontinencia fecal. Aunque existen escasos datos al respecto (Cortes y col. 2005, Jundt y col. 2005).

En la coneja doméstica, el aparato urogenital inferior se caracteriza, como en la mayoría de las hembras de mamíferos, porque la uretra desemboca en la vagina pélvica, así, la última porción del aparato urogenital funciona como vagina y uretra (Rodríguez-Antolín y col. 2012). Rodeando a este aparato se encuentra musculatura estriada bien desarrollada como en la mujer (Martínez-Gómez y col. 1997, Cruz y col. 2002, Martínez-Gómez y col. 2011), dos de los principales músculos estriados involucrados en la continencia de la orina, la cópula y el parto son el mPc y mBe (Cruz y col. 2002, Martínez-Gómez col. 2009), similar a lo que sucede en la mujer y diferente a la rata hembra. La coneja juega un papel importante en el estudio de la reproducción en mamíferos (Martínez-Gómez y col. 1997). En esta especie, el mPc se origina en la espina ciática del isquion donde la mayoría de sus fibras se insertan sin apariencia tendinosa en la vértebra coccígea 6. El resto de las fibras se insertan mediante un tendón en las vértebras coccígeas 7 y 8 (Martínez-Gómez y col. 1997, Cruz y col. 2002). El mBe se encuentra situado justo debajo del constrictor vestibular, está constituido por dos pares de músculos que convergen con el músculo isquiocavernoso (mIs) para unirse con el tendón de la línea media ventral de la vagina (Martínez-Gómez y col. 1997, Cruz y col. 2002; fig. 1).



Modificado de Martínez-Gómez et al. (1997) *Anat Rec* 247:486-95

**Figura 1.** Anatomía de la musculatura estriada del área pélvica y perineal de la coneja doméstica. La localización de los músculos mBe, mPc y mIs, (Modificado de Martínez-Gómez y col. 1997).

La actividad de los músculos pélvicos y perineales de la mujer y la coneja muestran algunas similitudes. Por ejemplo el mPc se activa durante la fase de almacenamiento siendo un componente importante en el mecanismo de la continencia urinaria (Alves y col. 2011). El mBe y el Ism se activan durante la fase de vaciado de la vejiga facilitando el proceso de micción (Shafik y col. 2008). En mujeres y conejas se ha reportado que el parto provoca daño a la musculatura estriada del piso pélvico e inervación, causando una descoordinación en la actividad de la musculatura pélvica y perineal, modificando el patrón de micción y causando incontinencia urinaria postparto (Deindl y col. 1998; Haylen 2009; Martínez-Gómez y col. 2011).

## **2.2. Efectos del parto sobre la fisiología de la musculatura pélvica y perineal**

Los cambios estructurales y funcionales de la musculatura estriada pélvica y perineal se han asociado con prolapsos viscerales, incontinencia urinaria y fecal. A pesar de ello, no se ha establecido la relación entre factores de riesgo como la gestación, el parto y los niveles hormonales, con alteraciones anatómicas en la musculatura estriada pélvica y perineal. La lesión de la musculatura perineal puede ser ocasionada por diversas causas como el embarazo, tanto por el peso del útero y el efecto relajador de algunas hormonas pueden debilitar el piso pélvico. El parto también provoca lesiones músculo-aponeuróticas y neurológicas perineales durante el periodo de expulsión del producto. Además, los esfuerzos realizados durante la expulsión actúan directamente sobre la musculatura del piso pélvico (Peña y col. 2007). La musculatura del piso pélvico es una de las más afectadas por el parto (Lukacs y col. 2006). Esto se ha documentado con biopsias del complejo muscular del ano (que incluye al músculo pubococcígeo) de mujeres con un parto mediante la expresión de la IGF-1 (Cortes y col. 2005). Los datos obtenidos por nuestro grupo de investigación, han demostrado que en la coneja la multiparidad (cuatro partos) reduce el área transversal de las fibras rápidas y lentas del mPc y mBe, también se ha reportado que disminuye la fuerza de contracción en ambos músculos. (Fajardo y col. 2008) encontraron que la contractilidad de las fibras que componen a los mPc y mBe, se ve disminuida al modificar la proporción de fibras rápidas, intermedia y lentas en hembras multíparas la proporción de los tres tipos de fibras en el grupo experimental (multíparas) es menor, independientemente de la región del músculo analizada (de inserción, media y de origen), lo que da como resultado un cambio en la respuesta de la fuerza de contracción ejercida ante un estímulo de contracción simple y otro tetánico.

En la coneja virgen, la actividad de los músculos mPc y mBe muestra una coordinación temporal durante ese proceso. El mPc se activa durante la fase de almacenamiento, mientras que el mBe y el mIs lo hace durante la fase de expulsión (Corona-Quintanilla y col. 2009). Este patrón de actividad junto con algunos parámetros urodinámicos está alterado en hembras multíparas, lo que indica que la multiparidad causa una modificación de la función urodinámica. Esta modificación provoca una actividad reducida y no coordinada de los mPc, mBe e mIs durante la micción (Martínez-Gómez y

col. 2011). El mPc participa durante la fase de almacenamiento y los músculos mBe e isquiocavernoso (mIs), durante la fase de expulsión de la orina (Corona-Quintanilla y col. 2009). Recientemente, en este mismo modelo hemos encontrado cambios en la sensibilidad estrogénica de ambos músculos, diferencias en el área transversal de la fibra y en el número de mionúcleos periféricos, que ocurren selectivamente en el mPc de las conejas multíparas (López-García 2010). Este último resultado es característico de algunas etapas del proceso de regeneración muscular (Charge y Rudnicki 2004).

### **2.3. Musculatura estriada y cambios histológicos**

La musculatura estriada en los mamíferos representa uno de los tejidos más grandes del cuerpo y representa cerca del 40% de la masa corporal. El músculo esquelético está compuesto por miofibras que tienen forma alargada. La principal función del músculo es generar fuerza longitudinal, esto está establecido por su intrincada morfología la cual consiste de paquetes densos de miofibras las cuales generan fuerza, debido a su contracción (Jens Stern-S y col. 2007). Las miofibras son las unidades básicas del músculo esquelético, están rodeadas individualmente por una capa de tejido conectivo, agrupadas en paquetes o fascículos para formar el músculo estriado. Cada fibra está rodeada por una extensa red de capilares que la proveen de oxígeno y nutrientes que requiere el músculo esquelético (Peachy y col. 1983). Una sola motoneurona está conectada con un grupo de fibras musculares de un músculo en específico. Las miofibras maduras expresan moléculas específicas para su función, así como diferentes isoformas de las cadenas pesadas de miosina y enzimas metabólicas (Charge y Rudnicki 2004). Las células que componen al músculo esquelético expresan proteínas contráctiles actina y miosina. Además, contienen varios núcleos en contraste con otro tipo de células que tienen un solo núcleo. El núcleo se localiza debajo de la membrana plasmática (sarcolema). Los procesos celulares de plasticidad muscular involucran alteraciones cualitativas y cuantitativas en las fibras musculares y se asocian con su morfología (Fluck y Hoppeler 2003).

Las principales funciones de la musculatura estriada en los mamíferos son la locomoción, la postura y la respiración (Charge y Rudnicki 2004). El músculo esquelético

es estable con pequeños cambios en el número de núcleos, debido a daños mínimos causados con el día a día los cuales incluyen desgaste y ruptura de las miofibras. En los constituyentes de las fibras musculares multinucleadas solo hay cambios mínimos. Por un lado, el músculo esquelético es sensible al daño después de un trauma directo, (actividad física intensa, laceraciones) o resultado de causas indirectas como disfunciones neurológicas o defectos genéticos innatos (Chargé y Rudnicki 2004).

El músculo estriado tiene la capacidad de repararse repetidamente debido a la presencia de células satélite (Nagata y col. 2006). Estas células son precursores musculares que forman una pequeña población localizada debajo de la lámina basal de cada miofibra (Mauro 1961). Las células satélites se activan como un mecanismo en respuesta al daño muscular o en respuesta al ejercicio (Kadi y col. 2005). Las células satélites son una población de células miogénicas mononucleadas indiferenciadas encontradas en músculo esquelético de mamíferos, aves, reptiles y anfibios. Constituyen cerca del 1.5% del total de los núcleos del músculo esquelético esto depende de la edad y del tipo de fibra (Jens Stern-S y col. 2007).

Una importante propiedad del músculo estriado es la capacidad de adaptarse como respuesta a la alteración de la actividad muscular, esos ajustes a demandas mecánicas y/o metabólicas modifican la expresión de genes que pueden llevar a la pérdida (atrofia) o a la ganancia (hipertrofia) de la masa muscular (Favier y col. 2007). La atrofia muscular es un cambio que ocurre en los músculos de individuos adultos como resultado de la condición de deshuso (ejemplo, inmovilización, denervación, suspensión de miembros). El evento inicial de atrofia muscular es caracterizado por un decremento en el contenido de proteína y disminución del diámetro de las fibras musculares fuerza de contracción y resistencia a la fatiga. Esto ha sido ampliamente estudiado en modelos animales, que la disminución de la actividad muscular promueve la degradación de proteínas y usualmente complementado con una disminución en la tasa en la síntesis de proteínas en efecto resulta en atrofia muscular (Goldspink 1991).

La hipertrofia de las fibras musculares debido a la ablación de músculos sinérgicos (Snow 1990; Rosenblatt y col 1994), estiramiento (Winchester y Gonyea 1992) o ejercicio



(Cabric y James 1983; Darr y Schultz 1987) promueven un incremento en el número de mionúcleos de las fibras musculares, el aumento en la cantidad de mionúcleos se relaciona con un mayor requerimiento en la síntesis de proteínas disponibles necesarias para la reparación o regeneración de las fibras musculares (Smith y col. 2001). Los mionúcleos que no son funcionales o dañados pueden ser ineficientes conduciendo al requerimiento de más mionúcleos para mantener las propiedades funcionales de las fibras musculares (Brooks y col. 2009). Por lo cual, el contenido de ADN el cual es un determinante crítico de la síntesis de proteína para proporción de la cantidad de ADN necesario para la transcripción de genes, que puede ser incrementado, por la activación de células satélite, o disminuido, mediante mecanismos relacionados con apoptosis. Dependiendo de la actividad muscular y procesos fisiológicos, además de algunos factores de transcripción son sensibles la demanda funcional y pueden controlar la expresión específica de proteínas musculares para promover o reprimir el crecimiento de la fibra muscular (Favier y col. 2007).

El número de mionúcleos es determinante en la síntesis de proteínas, para proveer la cantidad de ADN necesario para la transcripción de genes. La relación entre tamaño de la miofibra y el número de mionúcleos se relaciona con el concepto de dominio mionuclear. El dominio mionuclear es el volumen de citoplasma controlado por un mionúcleo, es decir las proteínas requeridas para un determinado volumen citoplasmático, son sintetizadas por un mionúcleo. En estudios del dominio mionuclear (DMN) hechos en humanos por (Kadi y col. 2005 y Petrella y col. 2006) se ha reportado que el tamaño de dominio mionuclear es constante hasta las 2000  $\mu\text{m}^2$  de volumen citoplasmático por núcleo, por lo que un incremento en éste modifica el DMN y no se mantiene constante a menos que entre en un proceso de hipertrofia para adquirir más mionúcleos (Kadi y col. 2005).

La actividad repetida de ejercicios de resistencia produce un crecimiento compensatorio (hipertrofia) del músculo estriado, caracterizado por un aumento en el área transversal de la fibra muscular así como en el volumen total del músculo (Drummond y col. 2008). La atrofia muscular lleva a una reducción del área transversal de la fibra (CSA por sus siglas en inglés) así como una reducción de la tensión debida a estímulos tetánicos y/o simple (Diffe y col. 1991, Fitts y col. 1986). La atrofia de la musculatura estriada es un cambio que ocurre en los músculos de un individuo adulto como resultado de condiciones

de desuso (inmovilización, denervación, edad y algunas enfermedades) y se refleja en la disminución del contenido de proteínas, diámetro de la fibra fuerza de contracción y resistencia a la fatiga (Jackman y Kandarian 2003).

### **2.3 Daño muscular degeneración/regeneración**

Las fibras que componen a la musculatura estriada son susceptibles a sufrir daño debido a traumas, calor o frío excesivo, toxinas, isquemia, enfermedades musculares (distrofia), inflamación y contracción muscular (Carlson y Faulkner 1983). En cada caso el daño resulta en necrosis de algunas o todas las fibras de determinado músculo. Dentro de una fibra dañada la lesión puede ser focal e involucrar a algunos sarcómeros en serie o en paralelo o puede involucrar a todos los sarcómeros (Friden y col. 1983). En este último caso, toda la fibra tiende a la necrosis. La necrosis de las fibras musculares conducen a la disolución de la membrana plasmática, activación de algunas enzimas dependientes de calcio que producen desintegración de la miofibra y otros componentes celulares, la entrada de proteínas y activación del complemento induciendo la quimiotaxis de células inflamatorias inicialmente neutrófilos seguido de macrófagos de los cuales estos últimos existe dos poblaciones unos proinflamatorios y otros antiinflamatorios estos últimos, parecen servir como un estímulo para la actividad regenerativa. La adaptación muscular incluye procesos degenerativos y regenerativos (Matano y col.1994). El proceso de la degeneración y regeneración parece seguir una vía común, independientemente de los factores responsables del daño de la fibra muscular (Carlson y Faulkner 1983). La regeneración muscular se caracteriza por una fase degenerativa y otra regenerativa. La fase degenerativa inicia con cambios en la permeabilidad de la membrana, involucra la disolución de la membrana plasmática, activación de proteasas dependientes de calcio, como las calpainas, que llevan a una rápida desintegración de las miofibrillas y otros componentes celulares (Tidball y col. 1999, Tidball 2008). La entrada de proteínas plasmáticas y activación del complemento induce el reclutamiento de leucocitos, incremento de enzimas como el creatinina cinasa y el  $\beta$ -glucuronidasa entre otros. Además, de promover el reclutamiento y la activación de monocitos/macrófagos. El daño muscular induce cambios evidentes en las fibras musculares y matriz extracelular (Karalaki y col. 2009).

## 2.4 Daño muscular y enzimas lisosomales

El daño muscular comprende la disrupción de la matriz extracelular, lámina basal, sarcoplasma, así como daño a las miofibras, a las proteínas de contracción y del citoesqueleto (Newham y col. 1983). El daño a la lámina basal y sarcoplasma puede confirmarse con el aumento de creatinina cinasa en suero sanguíneo, así como una respuesta inflamatoria (Cannon y col. 1989, Round y col. 1987), el daño a las fibras musculares generalmente conduce a una pérdida de la fuerza de contracción (Carlson y col. 1992). El daño muscular expresa por sí mismo cambios en las propiedades mecánicas del músculo. Algunos parámetros que son considerados como degenerativos (Variación en el tamaño de la fibra muscular, atrofia, núcleos centrales en la fibra, degeneración de la fibra muscular, fibrosis en el perimysio y endomysio y hematomas, Pap y col. 2009). Así como el incremento de algunos marcadores moleculares como son las enzimas lisosomales.

Los componentes de la matriz extracelular son degradados por metaloproteínas y enzimas lisosomales (Bayle y Light, 1989; Alexander y Werb, 1991). Por ejemplo, los macrófagos secretan enzimas que participan en la degradación de la matriz extracelular del músculo es degradada por algunas de ellas como la  $\beta$ -glucuronidasa la cual se conoce que lisan los proteoglicanos esta es liberada de los lisosomas bajo condiciones de post mortem muscular. Los lisosomas son organelos intracelulares cubiertos por una sola capa de membrana proteo-lipídica. Debido a la actividad específica de ATP-dependiente de la bomba de protones mantienen su pH Interno entre 5.0 y 5.5. Los lisosomas exhiben la actividad de numerosas enzimas hidrolíticas incluyendo la arilsulfatasa la cual rompe lípidos sulfatados y otros sulfoconjugados, N-acetil-Beta-D-glucosaminidasa rompen azúcares (N-acetilglucosamina) de las glicoproteínas y glicolípidos y la  $\beta$ -glucuronidasa degrada glucosaminoglicanos. Este último es considerado como marcador molecular cualitativo de daño muscular (Salminen y Kihlström 1985, Koskined y col. 2001).

## 2.5 Regeneración musculatura estriada

La complejidad del proceso de regeneración muscular y la subsecuente formación de nuevas miofibras, ha sido explorada cuidadosamente por muchos años (Charge y Rudnicki, 2004). La musculatura estriada está compuesta por fibras, que son un sinsitio derivado de la fusión de mioblastos (Huard y Shen 2008). El proceso por el cual ocurre la regeneración y adaptación se le atribuye a las células satélites las cuales residen en el musculo esquelético (Hawke y Garry 2001). Desde la primera descripción por Mauro, las células satélites han sido identificadas *in situ* por sus características morfológicas debido a su distinta localización dentro de la lámina basal que rodea a la miofibra yuxtapuesta entre la membrana plasmática de la fibra muscular y la membrana basal (Charge 2004). La regeneración muscular es un proceso complejo compuesto por tres estadios degeneración de las miofibras, inflamación y regeneración de la miofibra (Tidball 2005, Carlson y Conboy 2007) respectivamente. Este último estadio, involucra la activación de las células satélite, que están en estado quiescente a través de los procesos de proliferación y diferenciación, estos procesos participan en la reconstrucción de tejido dañado (Poel y col. 2011).

Las células satélites son precursoras de miofibras musculares, su activación y subsecuente proliferación da lugar a células hijas que pueden someterse a los diferentes destinos 1) generar nuevas miofibras musculares, 2) proveer de mionúcleos adicionales y 3) regresar a un estado quiescente manteniendo el pool de células satélite (Kadi y col 2004). En respuesta al ejercicio o daño a las miofibra se ha demostrado que las células satélites pueden generar nuevas miofibras o proveer nuevos mionúcleos a la miofibras musculares (Allen y col. 1999). La activación de las células satélite implica una regulación molecular coordinada de una serie de proteínas de transcripción que participan en la entrada al ciclo celular, proliferación y diferenciación (Parise y col. 2006). Cada etapa de esta regeneración se caracteriza por diferentes marcadores moleculares (Harridge 2007). Se han identificado algunos marcadores moleculares de células satélites. Entre ellos están los factores de transcripción Pax3 y Pax7 (Seale y Rudnicki 2000), el receptor c-met, para el factor de crecimiento de hepatocitos (Cornelison y Wold 1997) y el factor nuclear miocítico MNF (Hawke y Garry 2001). Estos han sido demostrados claramente que la activación,

proliferación y diferenciación de las células satélite después de un lesión están controlados por miembros de la familia de factores reguladores miogénicos (MRF), en una forma similar a las células precursoras del músculo durante el desarrollo embrionario. La activación de las células satélites primero expresan Myf5 y/o MyoD y finalmente miogenina y MRF4 en la proliferación de mioblastos hasta miotubos multinucleados (Smith y col. 1994). Este aumento en el número de mionúcleos se relaciona con un cambio en el dominio mionuclear (Hawke y Garry 2001).

## **2.6 Dominio mionuclear**

El músculo esquelético está formada por paquetes de fibras musculares, las cuales son una estructura multinucleada derivadas en la ontogénesis por la fusión de mioblastos “células progenitoras musculares” formando un sinsitio continuo. Las fibras musculares son multinucleadas. En el tejido muscular también podemos encontrar núcleos de fibroblastos, células endoteliales y de las células precursoras (células satélite). Los núcleos de las fibras son denominados mionúcleos, estos son post-mitóticos y no pueden dividirse. Bajo condiciones biológicas normales el tejido muscular es extremadamente estable con pocos cambios en el número mionúcleos (Decary y col. 1997; Schmalbruch y Lewis 2000).

La musculatura estriada es un tejido dinámico que continuamente se adapta a las demandas, respondiendo de una manera funcional y/o estructural. Existen reportes donde se ha demostrado que el desuso o sobreuso de la musculatura esquelética cambia y estos cambios son en el número de mionúcleos, el tamaño del área trasversal de la fibra y alteraciones en el las tasas de transcripción, traducción y de proteólisis (Shenkman y col. 2010). La cantidad de mionúcleos es muy importante, ya que determina el contenido de ADN para la transcripción de genes (Allen y col. 1999). La interacción entre el tamaño de la fibra y el número mionúcleos fue tomada como base en el concepto de dominio mionuclear (DMN) propuesto por Cheek y col. y Pavlath. El músculo esquelético es capaz de crecer significativamente durante periodos donde hay una sobre estimulación (Otto y Patel 2010). El dominio mionuclear es el volumen citoplasmático de la fibra muscular que regula la expresión de los genes de un núcleo (Pavlath y col. 1989). El término DMN es bastante conveniente para describir los mecanismos de plasticidad de la musculatura

estriada, aunque es nominal y la distribución de proteínas en el interior de la fibra muscular depende de muchos parámetros variables. El incremento del tamaño de la fibra ocurre a través de algunos mecanismos que incluyen el incremento de la transcripción de genes los cuales aumentan la tasa de síntesis de proteínas, las señales que inician esos cambios intracelulares no están bien definidos pero se cree que incluyen alteraciones en los mecanismos celulares, así como la liberación local y sistémica de factores de crecimiento. El estímulo de sobrecarga da como resultado el aumento del número de mionúcleos dentro de una sola fibra, donde los diferentes mionúcleos producen sus propios productos (Hall y Ralston 1989; Pavlath y col. 1989) Demostraron con sus experimentos que los productos de algunos mionúcleos en el músculo esquelético proteínas asociadas con el Golgi y proteínas contráctiles permanecen localizadas cerca de sus núcleos de origen (Rosenblatt y Parry 1992).

El concepto original de DMN sugiere que el volumen citoplasmático por mionúcleo es regulado por el DMN. Cambios en el DMN pueden influir eficientemente en la transcripción con efecto a la baja, efectos sobre la síntesis de proteínas y contenido. El músculo esquelético es un tejido muy heterogéneo que puede alterar su función morfología y características metabólicas en respuesta en la cantidad y/o patrones de actividad neuromuscular ejemplo, activación o sobrecarga cambios crónicos en los niveles de la actividad neuromuscular. Resulta en ambos cambios cualitativos y cuantitativos en el metabolismo de proteínas y expresión de genes (Allen y col. 1999). Cuando un músculo es sometido a un incremento de esfuerzo mecánico, por ejercicio regular o por sobrecarga funcional da como resultado un incremento en la masa muscular, tamaño de la fibra y el número de mionúcleos (Roy y col. 1985, 1991). Los cambios en el DMN pueden influir en la transcripción con efecto a la baja o al alta, efectos sobre la síntesis de proteínas y contenido. La activación o sobrecarga cambios crónicos en los niveles de la actividad neuromuscular resulta en cambios cualitativos y cuantitativos en el metabolismo de proteínas y expresión de genes (Allen y col. 1999). El tamaño del DMN aparentemente es diferente entre los tipos de fibra donde se ve incrementado en las fibras del tipo I a IIA al IIB/X. Por ejemplo en el músculo gastrocnemio de la rata el DMN es más grande en el tipo IIA que en el tipo I fue debido a un bajo número de mionúcleo y no en las fibras de gran

tamaño del tipo IIA en contraste en el tipo IIB/X tuvieron un mayor tamaño en el área transversal de la fibra (Van der Meer y col. 2011). Estas diferencias podrían estar relacionadas con la alta capacidad oxidativa del tipo I y IIA que las del tipo IIB/X debido a que el tamaño del dominio mionuclear se relaciona con la capacidad oxidativa de las fibras (Jaspers y col. 2006 y Tseng y col. 1994).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los músculos estriados pélvicos y perineales son determinantes para la fisiología de la micción. En la mujer, las modificaciones histológicas y funcionales de éstos derivadas de la experiencia reproductiva se asocian con el desarrollo de incontinencia urinaria por esfuerzo. Los procesos celulares que subyacen a esas modificaciones son desconocidos. Al respecto, el estudio de procesos como el daño y la regeneración muscular resultaría útil. En cuanto al proceso de regeneración de músculos estriados asociados con el aparato urogenital inferior femenino, no existe en humanos ni en modelos animales, evidencia experimental que describa esos procesos. Datos preliminares obtenidos por nuestro grupo de investigación (López-García en proceso) sugieren una regeneración diferencial entre un músculo pélvico (el pubococcígeo, mPc) y uno perineal (bulboesponjoso, mBe) de conejas con cuatro partos. Considerando que los cambios histológicos que siguen a una lesión son críticos para la regeneración muscular, el presente proyecto pretende evaluar el daño muscular y su relación con el dominio mionuclear en un músculo pélvico (el pubococcígeo) y otro perineal (el bulboesponjoso) de conejas primíparas.

## **4. HIPÓTESIS**

La primiparidad promueve el aumento de indicadores histológicos y bioquímicos relacionados con el daño muscular en el pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja doméstica.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Cuantificar los indicadores histológicos y bioquímicos relacionados con daño muscular en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso en la coneja.

### **5.2 Objetivos específicos**

En los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja.

- ✓ Cuantificar la actividad del enzima  $\beta$ -glucuronidasa.
- ✓ Cuantificar el número de mionúcleos periféricos.
- ✓ Cuantificar el área transversal de la fibra.
- ✓ Calcular el número de mionúcleos por mm de fibra.
- ✓ Calcular el dominio mionuclear.



## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1. Animales**

Se utilizaron conejas (*Oryctolagus cuniculus*) de la raza chinchilla de 7 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 nulíparas de 7 meses (C, n=6) y los experimentales por conejas primíparas (P3, n=6) y (P20 n=6) que fueron sacrificadas 3 días y veinte días después del parto, respectivamente. La primera cópula de las conejas primíparas ocurrió a los seis meses de edad. Las crías del grupo primípara 3 y 20 días, fueron sacrificadas 24 h después del parto, a una edad aproximada de 7 meses. Las conejas de todos los grupos fueron sacrificadas mediante la administración de una sobredosis de pentobarbital sódico (60 mg / Kg de peso, i.p.). Este protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

### **6.2. Disección y técnica histológica de los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso**

El animal se colocó en posición supina dorsal y se hizo 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 se ligó venas y arterias que irrigan el plexo venoso para evitar hemorragias severas hasta disecar los músculos pubococcígeo (mPc) y bulboesponjoso (mBe). Como ambos son bilaterales, se utilizó uno para histología y otro para determinación de la enzima lisosomal  $\beta$ -glucuronidasa. Los tejidos destinados para histología se colocaron en un porta muestras de plástico. La fijación de tejidos se hizo 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 se deshidrataron con alcohol etílico de concentraciones ascendentes (80, 96 y 100%) y fueron aclarados en xileno. Completada la deshidratación, el tejido se incluyó en paraplast X-tra (sigma).



#### **6.4. Cuantificación del enzima $\beta$ -glucuronidasa**

El enzima  $\beta$ -glucuronidasa es una enzima lisosomal que se activa en respuesta a la ruptura muscular y es considerada como un indicador cuantitativo del daño muscular. Los músculos estriados destinados a este análisis fueron congelados inmediatamente después de su extracción en isopentano-hielo seco. Cada tejido se almaceno a  $-30^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Aproximadamente 100mg de cada tejido se homogenizó en una solución tamponada que contenía 50 mM tris y 20% glicerol adicionada con inhibidores de proteasas (2.5 mg/ml de aprotinina y 2.5 mg/ml de leupeptina) y 1mM PMSF. Los homogenados fueron centrifugados durante 30 min a 15,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se recuperó el sobrenadante para cuantificar la actividad del enzima  $\beta$ -glucuronidasa con el protocolo 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 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Después se añadió 150 $\mu\text{l}$  de sustrato (5 mM p-nitrofenil-B-glucuronico) y se incubó durante 18h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Al finalizar la incubación anterior, se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora de glicina (pH 10) y los tubos fueron centrifugados a 3000g por 10 min y a  $4^{\circ}\text{C}$ . La concentración de la muestra fue cuantificada a 420nm, usado como estándar el p-nitrofenol.

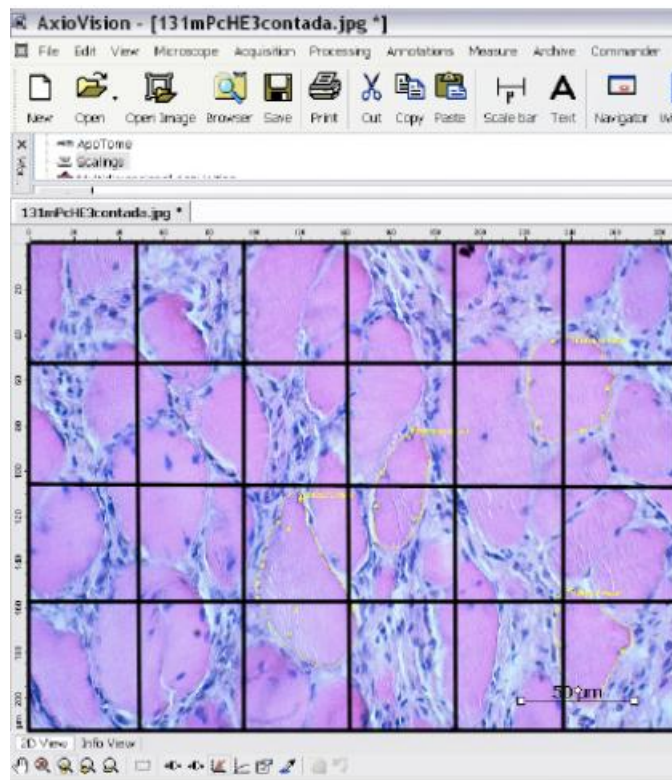
#### **Tinción con hematoxilina-eosina (HE)**

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

(Nikon ECLIPSE E600) y fotografiadas con una cámara OLYMPUS a una resolución de 5.1 megapíxeles.

### 6.3. Análisis histológico

El análisis histológico (conteo de los núcleos y medición del área de las fibras musculares) se realizó utilizando una cuadrícula de 6 x 4 cuadrantes, misma que fue colocada sobre la fotografía del 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. Se analizaron cuatro fibras de cuatro campos por músculo para cada una de las conejas (16 fibras por coneja, ver fig. 1).



**Fig. 1.** Sistema de conteo de núcleos y áreas teñidos con (H-E). Muestra la cuadrícula utilizada para el conteo (6x4 cuadrantes).

## 6.5. Número de núcleos por mm de fibra y dominio mionuclear

El dominio mionuclear se calculó utilizando el algoritmo reportado por Schmalbruch y Hellhammer (1977) y utilizado en otros trabajos (Hikida et al, 1997; Schmalbruch y Lewis, 2000). Para calcular el número de núcleos en un segmento de 1 mm de longitud de fibra muscular (X) se utilizó la siguiente fórmula,

$$X = (NL) / (d + l),$$

Donde (N) es el número de núcleos por fibra contados en un corte transversal, (L) es la longitud deseada del segmento de fibra, (d) el grosor del corte transversal (7 $\mu$ m), y (l) la longitud promedio de un núcleo de la fibra muscular (i). En nuestro análisis "L" se fijó en 1 mm, y "d" en (7 $\mu$ m). La "l" se determinó en 13.87 $\mu$ m para el mPc y 15.22 $\mu$ m para el mBe (López-García en proceso).

El dominio mionuclear (Y) se calculó mediante la siguiente fórmula,

$$Y = (CL) / X$$

en donde C es el área transversal de la fibra muscular, L, la longitud deseada del segmento de fibra (1mm) y X el número de mionúcleos por segmento de fibra.

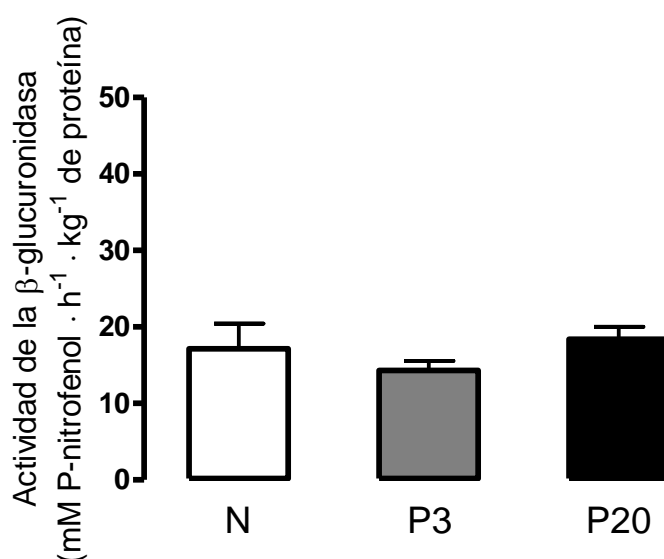
## 6.6 Análisis estadístico

Los datos de las variables histológicas así como los de la actividad del enzima  $\beta$ -glucuronidasa fueron analizados mediante un análisis de varianza de una vía para determinar diferencias estadísticas entre los distintos grupos ( $P \leq 0.05$ ). Para identificar las diferencias estadísticas ( $P \leq 0.05$ ) entre grupos se utilizó una prueba *post hoc* de Newman-Keuls. Con tal fin se utilizó el programa informático Prism 5 (GraphPad) para el sistema operativo de Windows.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Actividad del $\beta$ -glucuronidasa en el mPc

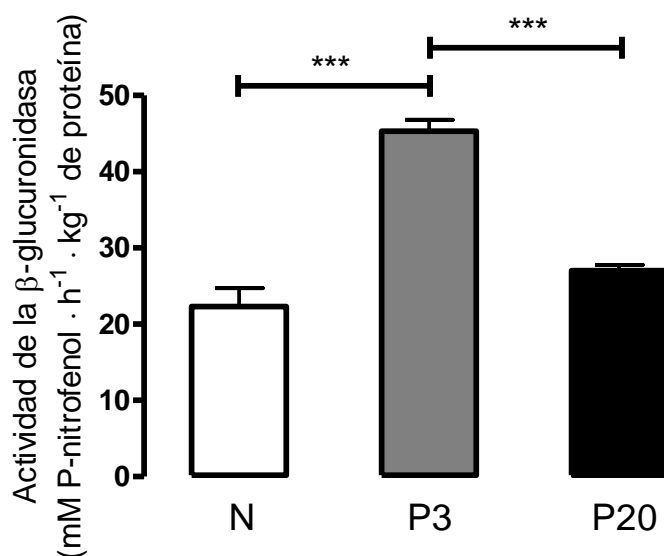
La actividad del enzima  $\beta$ -glucuronidasa en el músculo pubococcígeo fue similar ( $P=0.44$ ) entre las conejas nulíparas ( $17.1 \pm 3.3$  mM p-nitrofenol $\cdot h^{-1}\cdot Kg$  de proteína $^{-1}$ ) y las primíparas de los grupos P3 ( $14.3 \pm 1.3$  mM p-nitrofenol $\cdot h^{-1}\cdot Kg$  de proteína $^{-1}$ ) y P20 ( $18.4 \pm 1.6$  mM p-nitrofenol $\cdot h^{-1}\cdot Kg$  de proteína $^{-1}$ ; Fig.2).



**Figura 2.** Actividad del enzima  $\beta$ -glucuronidasa en la porción medial del músculo pubococcígeo de conejas nulíparas (N) y primíparas sacrificadas el día 3 (P3) y 20 (P20) postparto. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de 6 individuos por grupo en los que la actividad enzimática fue cuantificada en dos experimentos independientes y por duplicado. Para determinar diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre grupos se utilizó un ANOVA de una vía para grupos independientes, seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls.

## 7.2. Actividad del $\beta$ -glucuronidasa en el mBe

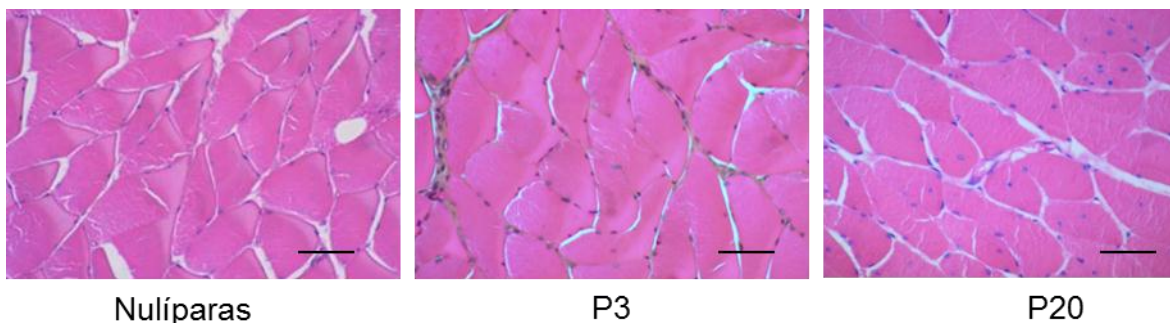
La actividad del enzima  $\beta$ -glucuronidasa cuantificado en la porción medial del mBe fue diferente ( $P < 0.0001$ ) entre las conejas nulíparas y las primíparas sacrificadas en los días 3 y 20 posparto (Fig. 3). En comparación con la actividad enzimática del mBe del grupo de nulíparas ( $24.1 \pm 2$  mM p-nitrofenol $\cdot h^{-1}\cdot Kg$  de proteína $^{-1}$ ), la del grupo P3 incrementó casi el doble ( $45.3 \pm 1.5$  mM p-nitrofenol $\cdot h^{-1}\cdot Kg$  de proteína $^{-1}$ ;  $P < 0.05$ ), mientras que la del grupo P20 fue similar ( $27 \pm 0.8$  mM p-nitrofenol $\cdot h^{-1}\cdot Kg$  de proteína $^{-1}$ ;  $P > 0.05$ ). La actividad enzimática del grupo P3 fue mayor que la del P20.



**Figura 3.** Actividad del enzima  $\beta$ -glucuronidasa en la porción medial del músculo bulboesponjoso de conejas nulíparas (N) y primíparas sacrificadas el día 3 (P3) y 20 (P20) posparto. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de 6 individuos por grupo en los que la actividad enzimática fue cuantificada en dos experimentos independientes y por duplicado. Para determinar diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre grupos se utilizó un ANOVA de una vía para grupos independientes, seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls.

### 7.3. Análisis histológico del músculo pubococcígeo

La primiparidad modificó el tamaño y la forma de las fibras estriadas del mPc (Fig.4). Las fibras musculares pertenecientes a las conejas sacrificadas 3 y 20 días después del parto el grupo fueron de apariencia redonda y algunas de ellas tenían núcleos centralizados (Fig. 4). En algunos de los campos analizados se observaron células polimorfonucleares.

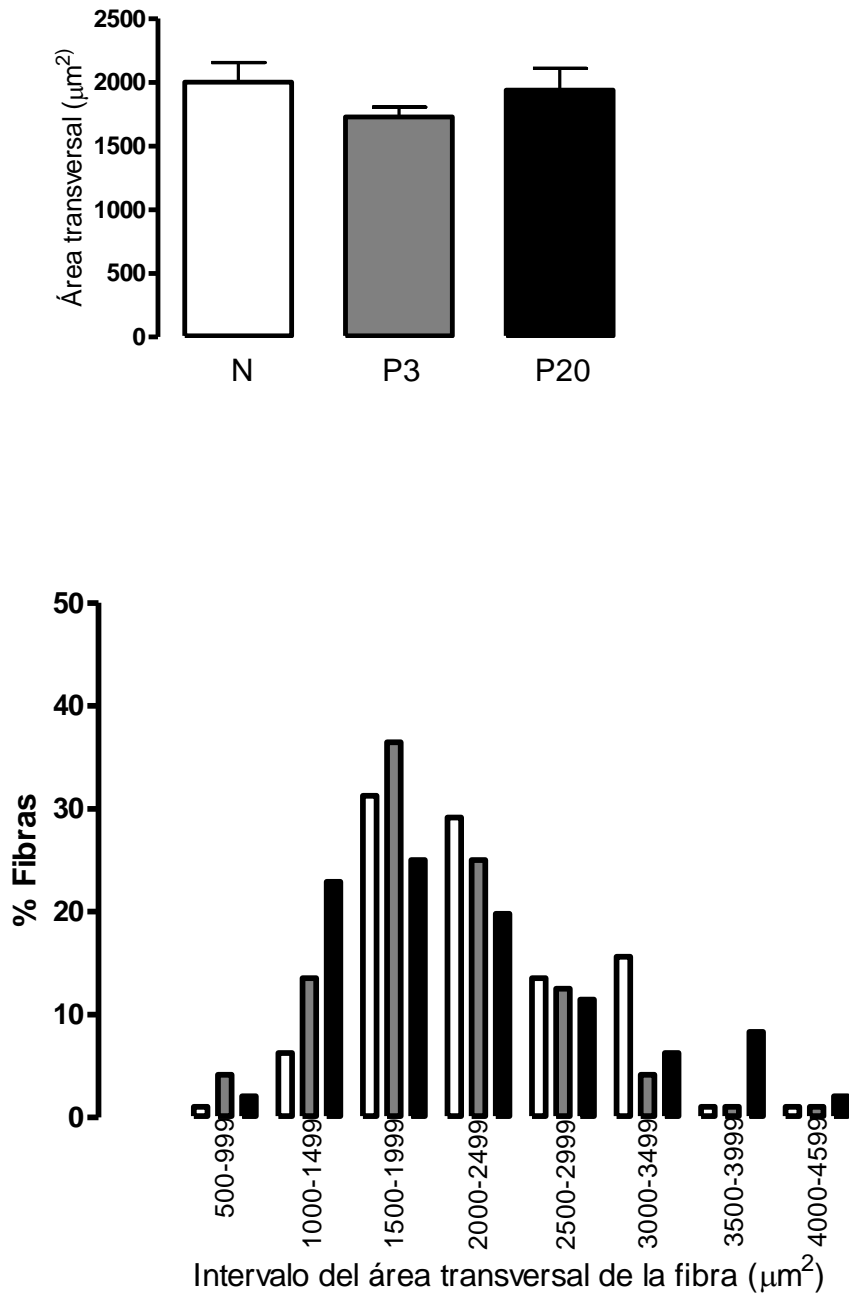


**Figura 4.** Cortes transversales del mPc teñidos con H-E. Conejas nulíparas, primíparas de tres (P3) y 20 días postparto (P20). Barra, 50  $\mu\text{m}$ .

#### Área transversal de la fibra

La figura 5a muestra que el área transversal de las fibras del mPc de las conejas nulíparas ( $2000 \pm 155 \mu\text{m}^2$ ) fue similar que las de los músculos de las conejas primíparas sacrificadas en los días 3 ( $1728 \pm 77 \mu\text{m}^2$ ) y 20 posparto ( $1939 \pm 170 \mu\text{m}^2$ ). El histograma de áreas evidenció que la primiparidad (grupos P3 y P20) incrementó el porcentaje de fibras con áreas menores que  $1000 \mu\text{m}^2$  a la vez que disminuyó el de fibras con áreas mayores que  $3000 \mu\text{m}^2$  (Fig.5b).



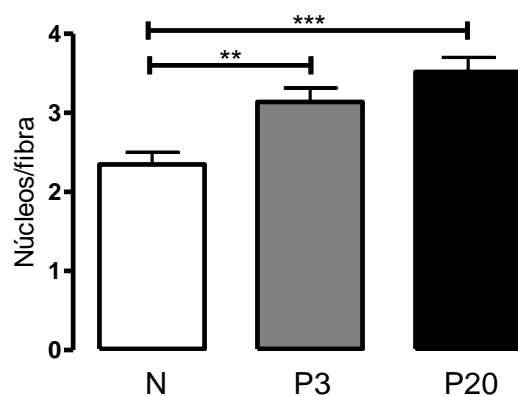


**Figura 5.** Área transversal de las fibras musculares del mPc de conejas nulíparas (N) y primíparas sacrificadas al día 3 (P3) y 20 (P20) postparto. a) Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de seis individuos por grupo. Para determinar diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre grupos se utilizó un ANOVA de una vía para grupos independientes, seguido de una prueba *post hoc* Newman-Keuls. b) Los datos representan

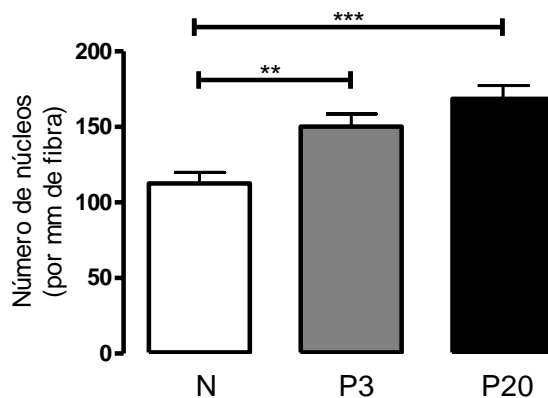
la frecuencia absoluta expresada como porcentaje (%) de fibras incluidas en cada intervalo. El total de fibras analizadas por grupo fue de 96.

### Número de núcleos por fibra

El número de núcleos periféricos por fibra del mPc, analizados en una sección transversal, fue diferente ( $P=0.0007$ ) entre los grupos analizados (Fig.6), siendo mayor ( $P<0.05$ ) el de las conejas primíparas sacrificadas en el día 3 ( $3.1 \pm 0.2$ ) y 20 ( $3.5 \pm 0.2$ ) posparto que el de las nulíparas ( $2.4 \pm 0.2$ ). No hubo diferencia entre los grupos de conejas primíparas. Un efecto similar se encontró al analizar el número de núcleos por mm de fibra muscular (Fig. 7), en donde se observó un incremento ( $P=0.0007$ ) del 32% y 50% en los grupos P3 ( $150 \pm 8$ ) y P20 ( $169 \pm 9$ ) en comparación con el grupo control ( $113 \pm 7$ ).



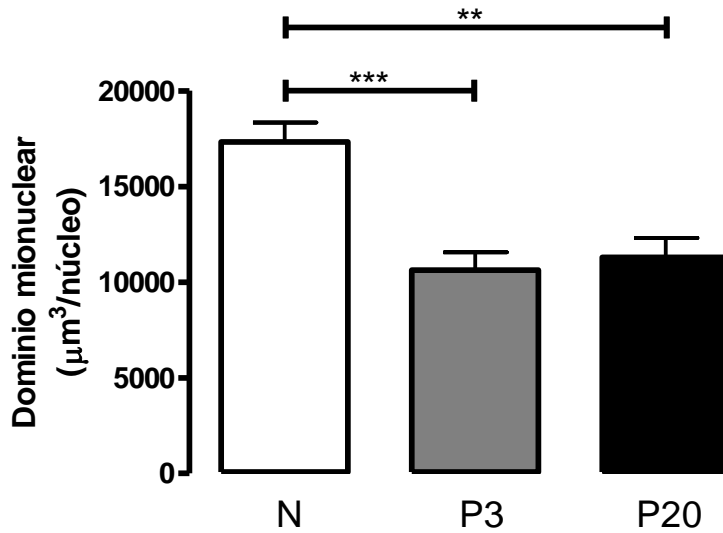
**Figura 6.** Número de núcleos periféricos por fibra del músculo pubococcígeo de conejas nulíparas (N) y primíparas sacrificadas al día 3 (P3) y 20 (P20) posparto. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de seis individuos por grupo. Para determinar diferencias significativas ( $P<0.05$ ) entre grupos se utilizó un ANOVA de una vía para grupos independientes, seguido de una prueba *post hoc* Newman-Keuls (\*\* $P<0.001$  y \*\*\* $P<0.0001$ ).



**Figura 7. Número de núcleos en un mm de fibra.** Núcleos periféricos por mm de fibras en el músculo pubococcígeo de conejas nulíparas (N) y primíparas sacrificadas al día 3 (P3) y 20 (P20) postparto. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar ( $n=6$ ). Para determinar diferencias significativas ( $P<0.05$ ) entre grupos se utilizó un ANOVA de una vía para grupos independientes, seguido de una prueba *post hoc* Newman-Keuls (\*\* $P<0.001$  y \*\*\* $P<0.0001$ ).

### Dominio mionuclear del mPc

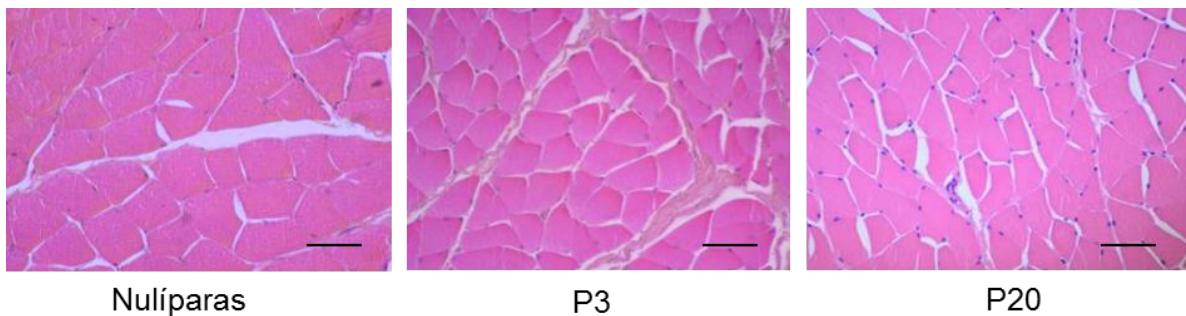
La primiparidad modificó ( $P = 0.0004$ ) el dominio mionuclear (MND) de las fibras del músculo pubococcígeo (Fig. 8). En comparación con el MND de las conejas nulíparas ( $17331 \pm 1010 \mu\text{m}^3 / \text{núcleo}$ ), el de las conejas primíparas sacrificadas el día 3 posparto ( $10631 \pm 928 \mu\text{m}^3 / \text{núcleo}$ ) fue menor ( $P < 0.0001$ ) y lo mismo se encontró para el MND de las sacrificadas veinte días posparto ( $11286 \pm 1027 \mu\text{m}^3 / \text{núcleo}$ ;  $P < 0.001$ ).



**Figura 8.** Dominio mionuclear de las fibras del músculo pubococcígeo de conejas nulíparas (N) y primíparas sacrificadas al día 3 (P3) y 20 (P20) posparto. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar. (n=6). Para determinar diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre grupos, se utilizó un ANOVA de una vía para grupos independientes, seguido de una prueba *post hoc* Newman-Keuls ( $***P < 0.0001$  y  $**P < 0.001$ ).

### Análisis histológico del músculo bulboesponjoso

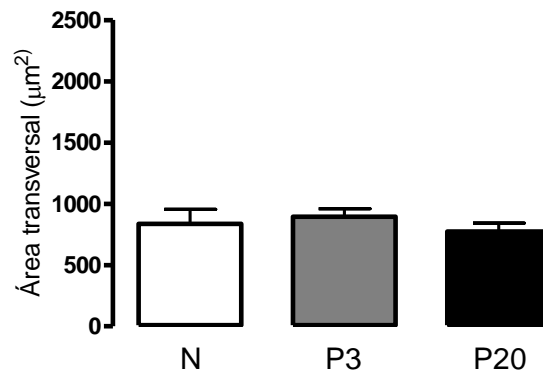
Cualitativamente se apreció que la primiparidad no modifica el tamaño ni la forma de las fibras estriadas del mBe. Sin embargo en el mBe se observa un aumento el número de núcleos en las fibras del mBe de primíparas (Fig. 9).



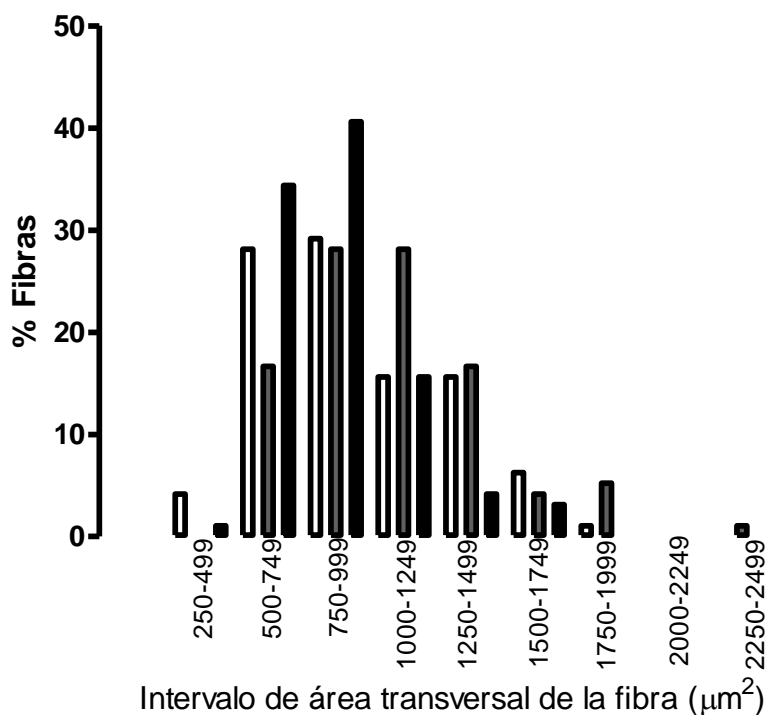
**Figura 9.** Cortes transversales del mBe teñidos con H-E. Conejas nulíparas, primíparas de tres (P3) y 20 días postparto (P20). Barra, 50  $\mu\text{m}$ .

### Área transversal de las fibras del mBe de conejas primíparas

La figura 10 muestra que el área transversal de las fibras del músculo bulboesponsjoso de las conejas nulíparas ( $837 \pm 118 \mu\text{m}^2$ ) fue similar ( $P = 0.6$ ) que las de los músculos de las conejas primíparas sacrificadas en los días 3 ( $895 \pm 64 \mu\text{m}^2$ ) y 20 postparto ( $774 \pm 68 \mu\text{m}^2$ ). El histograma de áreas no mostró cambios en cuanto a la proporción de fibras entre los distintos grupos experimentales (Fig.11).



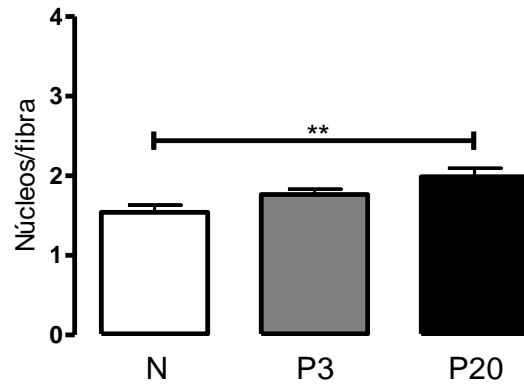
**Figura 10.** Área transversal de las fibras musculares del mBe de conejas nulíparas (N) y primíparas sacrificadas al día 3 (P3) y 20 (P20) postparto. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar ( $n=6$ ). Para determinar diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre grupos se utilizó un ANOVA de una vía para grupos independientes, seguido de una prueba *post hoc* Newman-Keuls.



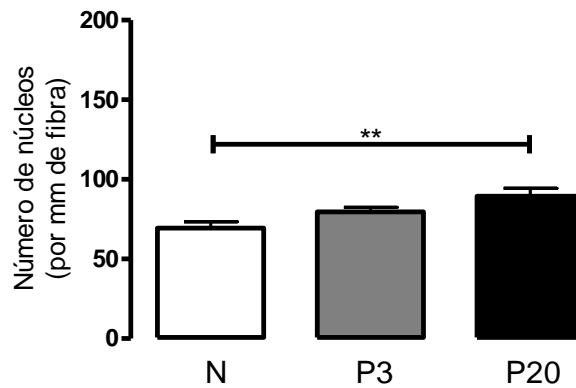
**Fig. 11. Histograma.** En el mBe de conejas nulíparas (barras blancas) y primíparas sacrificadas al día 3 (barras grises) y 20 postparto (barras negras) respectivamente. Distribuidas en rangos de  $250 \mu\text{m}^2$ . Los datos expresan la frecuencia absoluta expresada como porcentaje de fibras contenidas en cada intervalo.

### Número de núcleos de las fibras del mBe de conejas primíparas

El número de núcleos periféricos por fibra del músculo bulboesponjoso, analizados en una sección transversal, fue diferente ( $P=0.01$ ) entre los grupos analizados (Fig.12), siendo mayor ( $P<0.05$ ) el de las conejas primíparas sacrificadas en el día 20 ( $2 \pm 0.1$ ) que las nulíparas ( $1.5 \pm 0.1$ ). No hubo diferencia entre los grupos de conejas primíparas P3 ( $1.8 \pm 0.1$ ) y P20, ni entre el P3 y las nulíparas. Un efecto similar se encontró al analizar el número de núcleos por mm de fibra muscular (Fig. 13), en donde se observó un incremento ( $P=0.01$ ) del 14% y 28% en los grupos P3 ( $80 \pm 3$ ) y P20 ( $90 \pm 5$ ) en comparación con el grupo control ( $69 \pm 4$ ).



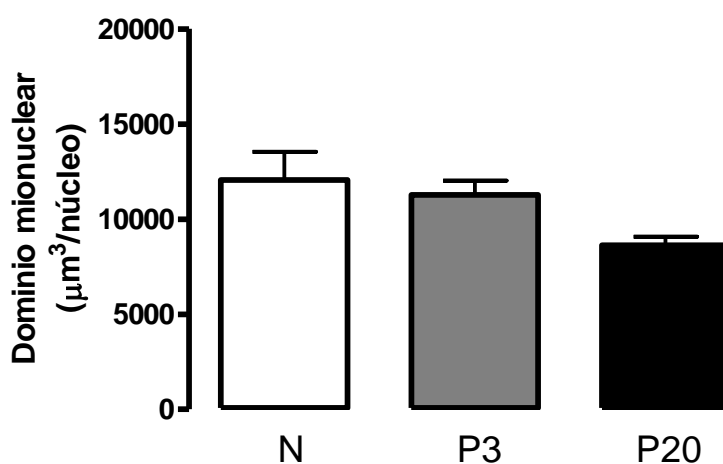
**Figura 12.** Número de núcleos periféricos por fibra del músculo bulboespongioso de conejas nulíparas (N) y primíparas sacrificadas al día 3 (P3) y 20 (P20) posparto. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar (n=6). Para determinar diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre grupos se utilizó un ANOVA de una vía para grupos independientes, seguido de una prueba *post hoc* Newman-Keuls. (\*\* $P < 0.001$ )



**Figura 13.** Número de núcleos por mm fibra del músculo bulboespongioso de conejas nulíparas (N) y primíparas sacrificadas al día 3 (P3) y 20 (P20) posparto. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar (n=6). Para determinar diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre grupos se utilizó un ANOVA de una vía para grupos independientes, seguido de una prueba *post hoc* Newman-Keuls. (\*\* $P < 0.001$ )

### Dominio mionuclear

La primiparidad no modificó ( $P = 0.067$ ) el dominio mionuclear (MND) de las fibras del músculo bulboesponjoso (Fig. 14). El valor promedio de esta variable fue similar entre las conejas nulíparas ( $12058 \pm 1481 \mu\text{m}^3 / \text{núcleo}$ ), y primíparas sacrificadas los días 3 ( $11268 \pm 751 \mu\text{m}^3 / \text{núcleo}$ ) y 20 posparto ( $8627 \pm 451 \mu\text{m}^3 / \text{núcleo}$ ;  $P < 0.001$ ).



**Figura 14.** Dominio mionuclear de las fibras del músculo bulboesponjoso de conejas nulíparas (N) y primíparas sacrificadas al día 3 (P3) y 20 (P20) posparto. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar. ( $n=6$ ). Para determinar diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre grupos, se utilizó un ANOVA de una vía para grupos independientes, seguido de una prueba *post hoc* Newman-Keuls.



## **8. DISCUSIÓN**

En la coneja, la primiparidad modificó la histología de los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso. En el primero fue evidente la presencia de células polimorfonucleares, núcleos centrales en las fibras, un incremento del número de núcleos periféricos y una reducción del dominio mionuclear. En el bulboesponjoso se observó un incremento en el número de núcleos cuando las conejas fueron sacrificadas el día 20 posparto pero no antes. Con la finalidad de evaluar la relación entre estos cambios y el daño muscular se evaluó la actividad del enzima lisosomal  $\beta$ -glucuronidasa en extractos de la porción medial de ambos músculos. Los resultados obtenidos mostraron que la multiparidad no modificó tal actividad enzimática en el pubococcígeo pero si en el bulboesponjoso. En este último el efecto es transitorio ya que se encontró incrementado en el día 3 posparto pero después volvió a los niveles basales en el día 20 posparto. En general estos resultados apoyan la hipótesis de que la primiparidad daña la musculatura estriada asociada con el aparato urogenital de la coneja, y que este daño tiene un origen y/o una cinética de desarrollo diferente en el músculo pubococcígeo (pélvico) y en el bulboesponjoso (perineal).

### **8.1. Efecto de la primiparidad sobre las características histológicas del mPc y el mBe**

El músculo estriado desempeña una amplia gama de actividades siendo un tejido muy heterogéneo y con capacidad de adaptarse a los estímulos que se le presenten. Sin embargo es susceptible al daño el cual induce cambios evidentes en las fibras musculares y matriz extracelular (Karalaki y col. 2009). Armstrong y col. (1983) reportaron que solo un estímulo de ejercicio intenso o repetido induce cambios histológicos evidentes en las fibras musculares, seguido del proceso de regeneración. Algunos cambios se observan en la permeabilidad de la membrana, aumento en el número de núcleos, variación del área transversal de las fibras (Pap y col. 2009). La fibrosis, la variación de diámetro y los núcleos centralizados son signos característicos de daño muscular (Dubowitz 1985).

La degeneración de la fibra inicia con cambios en la permeabilidad de la membrana (Tidball col. 1999). La fase inicial del daño es usualmente acompañada por la infiltración de células inflamatoria, las primeras células inflamatorias en invadir en sitio del daño son los neutrófilos (McClung y col 2007). Alcanzando su pico máximo a las 6 horas de iniciado

el daño muscular, cerca de las 48 horas después del daño, las células que predominan son los macrófagos (Carlson y Faulker 1983). Los resultados de esta tesis mostraron que en las fibras del mPc de los grupos de (P3) y (P20) días postparto, se observó infiltración de núcleos en el tejido conectivo, mayor cantidad de núcleos periféricos en la parte central del corte, fibras más alargadas, núcleos centrales escasos, respecto al grupo control. Estudios previos reportan que los macrófagos se acumulan en el sitio del daño, son responsables de la fagocitosis del debris celular. En las fibras musculares del mBe del grupo (P20) veinte días postparto se observó un aumento significativo en el número de núcleos respecto al grupo control. El aumento de núcleos podría corresponder a las células satélite principalmente, ya que se consideran el principal recurso para la regeneración muscular (Kadi y col. 2004). El resultado de la activación de las células satélite promueve la adquisición de nuevos mionúcleos durante la fase de reparación de las fibras musculares y regeneración (Smith y col. 2001). La infiltración de núcleos en el tejido conectivo y en la periferia fuera de las miofibras observadas en el mPc sugiere la infiltración de células inflamatorias, ya que la regeneración de la musculatura estriada inicia con una fase degenerativa inicialmente con la infiltración de células inflamatorias (neutrófilos y macrófagos), éstos últimos respectivamente, se encargan de fagocitar los restos celulares y preparar el sitio dañado para la fase de regeneración muscular (Tidball 1995). Se ha reportado que existen dos subpoblaciones de macrófagos unos pro-inflamatorios que se caracterizan por expresar el receptor de superficie, (CD68) y otros anti-inflamatorios que se caracterizan por expresar el receptor de superficie (CD163, Brunelli y Rovere-Querini 2008). Los primeros respectivamente promueven la fagocitosis. Estudios previos, han demostrado que los macrófagos CD163, liberan factores de crecimiento que incrementan la proliferación de precursores miogénicos, de crecimiento y diferenciación (Sonnet y cols. 2006, Cantini 1995).

La regeneración está caracterizada por la activación de las células satélite, iniciando su diferenciación, proliferación y fusión. Los núcleos de estas células diferenciadas se incorporan dentro de las fibras observándose en el centro de la fibra, después del daño y reparación del músculo estriado actuando como nuevos núcleos pos-mitóticos, los cuales migran hacia la periferia de la fibra muscular (Zammit y col. 2006). En el presente trabajo

se encontró que en las fibras del mPc de conejas primíparas de tres y veinte días postparto hubo un incremento significativo en el número de núcleos comparado con el grupo control. Al días tres y veinte días posparto se incrementó un 28.8% y 45.6% respectivamente, el número de núcleos en comparación con el grupo control. Así como un incremento del 12.2% y 30.9% en el número de núcleos de las fibras musculares del mBe al día 3 y 20 postparto respectivamente resultando en un incremento significativo solo al días veinte postparto respecto al grupo control. Se ha reportado que el número de núcleos incrementa rápidamente durante el crecimiento posnatal y con el esfuerzo mecánico (Zhang y col. 2010). El aumento del número de núcleos es un indicador de regeneración muscular (Allen y col 1999; Charge y Rudnicki 2004). En las fibras musculares de mPc se observó cualitativamente un incremento en el número de núcleos en el tejido conectivo y algunos núcleos centrales en conejas primíparas de 20 días postparto (datos no mostrados). Por lo que se pudiera sugerir que el mPc entra en un proceso regenerativo ocasionado por la primiparidad. El aumento del número de núcleos periféricos pueden ser atribuidos al proceso de daño y regeneración muscular así como la fibrosis, la variación de diámetro y los núcleos centralizados son signos característicos de daño muscular (Dubowitz 1985).

La regeneración está caracterizada por la activación de las células satélite, las cuales son una población de células que están en estado quiescente y se activan en respuesta al proceso de regeneración muscular (Nagata y col. 2006). Estas células son precursores musculares que se localizan debajo de la lámina basal de cada miofibra (Mauro 1961). Estas células se diferencian para fusionarse con las fibras dañadas y así promover la regeneración muscular (Snow 1977). El incremento de nuevos mionúcleos aumentan el ADN disponible que ayudaría en los procesos de regeneración de las fibras, maduración y posiblemente en procesos de adaptación (Smith y col. 2000). Existen reportes donde se ha demostrado que el desuso o sobreuso de la musculatura esquelética se asocia a cambios histológicos y estos cambios son en el número de mionúcleos, el tamaño del área transversal de la fibra y alteraciones en las tasas de transcripción, traducción y de proteólisis (Shenkman y col. 2010). Algunas adaptaciones de la musculatura estriada ocurren como resultado de las modificaciones de la ultraestructura de las miofibras (Brown y col. 1997; Yu y col. 2002, 2004). Así como cambios ambientales del tejido (Conboy y col. 2005;

cutlip y col. 2006b y Malm 2001). No obstante, la primiparidad no modificó el área transversal de las fibras del mPc ni del mBe.

El área transversal de las fibras del mPc y mBe de conejas primíparas tres y veinte días postparto fue similar con respecto al grupo control. Esta información nos lleva a suponer que los cambios relacionados con el número de núcleos aún no están reflejados en la síntesis proteica, y por tanto, en la modificación del área transversal de la fibra. Es probable que la alteración de esta variable requiera más de veinte días para observarse. Al respecto es necesario probar esta hipótesis. Estos resultados nos llevaron a analizar cambios en el DMN de las fibras del mPc y del mBe para intentar establecer una relación entre el área transversal y el número de mionúcleos de las fibras musculares de ambos (Teixeira y Duarte 2011).

La interacción entre el tamaño de la fibra y el número mionúcleos fue tomada como base en el concepto de dominio mionuclear (DMN) propuesto por (Cheek y col. 1985). El dominio mionuclear es el volumen citoplasmático de la fibra muscular que regula la expresión de los genes de un núcleo (Pavlath y col. 1989). Así, el dominio mionuclear es bastante conveniente para describir los mecanismos de plasticidad de la musculatura estriada, aunque es nominal y la distribución de proteínas en el interior de la fibra muscular depende de muchos parámetros variables. Allen y col. Han ofrecido una hipótesis de dominio mionuclear el cual en teoría este permanece constante y los cambios de tamaño de las fibras musculares y número de núcleos solo cambian en procesos como la atrofia e hipertrofia (Allen y col. 1999). Un aumento en el número de mionúcleos en las fibras musculares fue reportado durante un programa rutinario de ejercicio, e hipertrofia durante la disección de músculos sinérgicos, (Oishi y col. 2008, Kadi y Thornell 2000, lowe y Always 1999, Mitchell y Pavlath 1999).

Los datos presentados en esta tesis mostraron que la primiparidad reduce el dominio mionuclear de las fibras del mPc en conejas sacrificadas los días 3 y 20 postparto. La información anterior permite suponer que la actividad de este músculo durante el parto, o aún durante la gestación, está relacionada con este efecto. El incremento del número de núcleos en el mBe de conejas primíparas veinte días postparto fue significativo respecto al

grupo control y primíparas de tres días postparto. Sin embargo, el DMN se mantuvo constante respecto al grupo control. En este músculo, la falta de cambio en el dominio mionuclear puede estar relacionada con el cambio en la composición del tipo de fibra (Brooks y col. 2009). Esto podría ser debido a que pueda tener diferentes tipos de fibra, ya que se ha reportado que las fibras del tipo I tienen más mionúcleos por unidades de área (Edgerton y Roy 1991). Conduciendo a un dominio mionuclear reducido (Tsetg y col. 1994; Allen y col. 1995; Hikida y col 1997). Las fibras lentas tienen una tasa alta de síntesis de proteínas (Booth y Thomason 1991), y una alta capacidad oxidativa (que requieren grandes cantidades de síntesis de proteínas Roy y col. 1999). Las fibras con baja capacidad oxidativa tienen relativamente dominios mionucleares grandes (Burleigh 1997; Tseng y col. 1994).

## **8.2. Paridad y la concentración del enzima $\beta$ -glucuronidasa**

El parto es un factor de riesgo que se encuentra asociado con daño a las fibras musculares ocasionando algunas disfunciones fisiológicas de la musculatura pélvica. Aunque existen escasos datos al respecto (Cortes y col. 2005, Jundt y col. 2005), el daño muscular induce cambios evidentes en las fibras musculares y matriz extracelular (Karalaki y col. 2009). Un indicador de daño es el aumento de algunas enzimas como la creatinina cinasa, la  $\beta$ -glucuronidasa, ambas asociadas con la lisis de la membrana celular y un subsecuente infiltración de leucocitos (neutrófilos y macrófagos) al sitio dañado estos últimos respectivamente liberan enzimas lisosomales que se encargan de la degradación de algunos componentes celulares (Tidball y col. 1999). El aumento en la concentración del enzima  $\beta$ -glucuronidasa han sido reportados como un marcador de daño muscular (Pacoñ y col. 2005). Y esto coincide con los resultados encontrados en este trabajo para el músculo bulboesponjoso de conejas primíparas de 3 días postparto donde se encontró una concentración elevada del enzima  $\beta$ -glucuronidasa comparado con el grupo control, lo cual ha sido reportado como un indicador cuantitativo de daño muscular (Salminen y Kihlström 1985, Koskined y col. 2001). Sin embargo, en el mPc no se encontraron diferencias en la concentración del enzima  $\beta$ -glucuronidasa, es posible que los estrógenos eviten o minimicen el daño a las fibras musculares.

Estudios en animales han demostrado que existen diferencias de géneros en respuesta a protocolos de ejercicio o daño muscular, esos cambios han sido atribuidos a los efectos de los estrógenos sobre la musculatura estriada, estas diferencias se han observado en individuos con manipulación hormonal ejemplo ovariectomía, suplementación de estrógenos revelando que los estrógenos atenúan la infiltración de leucocitos así como la actividad del enzima lisosomal  $\beta$ -glucuronidasa seguida después del daño muscular (Enns y Tiidus 2007). Los estrógenos también se sabe que inhiben la inflamación y aceleran la recuperación en algunos tejidos incluyendo el hígado y el sistema nervioso. La evidencia sugiere que los estrógenos juegan un papel importante en la activación de las células satélite, por ejemplo Roth y col. reporto un incremento en el número de células satélite activas en el músculo *Vastus lateralis* de mujeres comparado con el de hombres seguido de nueve semanas de entrenamiento (Roth y col. 1999).

Además, datos obtenidos en nuestro grupo de investigación se ha encontrado que los estrógenos (E2) alcanzan un pico máximo al día 30 de gestación, así como una aumento en la expresión subtipos de receptores a estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  en el mPc de conejas multíparas (López García 2010). Los estrógenos tienen la capacidad de regular algunos procesos como el aumento de masa y la regeneración muscular (Levin 2001). Se ha reportado que las células satélite del cerdo expresan receptores a estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  los cual sugiere que los estrógenos juegan un papel importante en la activación de las células satélite (Kalbe y col. 2007). En la regeneración muscular, las células satélites se activan y proliferan para formar mioblastos, que se diferencian para formar nuevas miofibrillas (Cooper y col. 2006). La dicotomía encontrada en estos músculos pudiera ser explicada debido a su localización anatomía, así como su diferente participación en el funcionamiento de la continencia urinaria y además, la diferencia a la sensibilidad a hormonas esteroideas.

### **Consideraciones finales**

En hembras de mamíferos la reproducción incluye eventos como: la cópula gestación, parto y lactancia, promovidos por la interacción de diversos sustratos dentro de los cuales tenemos a la musculatura estriada. Datos obtenidos por nuestro grupo de investigación, han demostrado que en la coneja multípara disminuye la fuerza de

contracción en el mPc y el mBe, dando como resultado un cambio en la respuesta de la fuerza de contracción ejercida ante un estímulo de contracción simple y otro tetánico (Fajardo y col. 2008). La apropiada contracción y relajación los músculos del piso pélvico resulta en un funcionamiento óptimo, soporte y función del *levator ani*, la contractilidad de los músculos pélvicos juegan un importante papel en el mantenimiento de la continencia urinaria y previenen prolapsos de órganos pélvicos (Stensma y col. 2010). Los resultados presentados en esta tesis permiten proponer que los efectos de la multiparidad están directamente relacionados con la primiparidad. El daño muscular caracterizado mediante marcadores histológicos y bioquímicos puede ser acumulativo en las conejas multíparas que tienen 4 partos, alterando también los respectivos procesos de regeneración. Esta plasticidad muscular estaría directamente relacionada con la modificación de las propiedades contráctiles y la actividad del mPc y del mBe durante la micción de conejas multíparas (Fajardo y col. 2008; Martínez-Gómez y col. 2011).

## 9. CONCLUSIONES

En la coneja la primiparidad incrementó los indicadores histológicos y bioquímicos en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso.

La primiparidad aumentó los indicadores histológicos en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso en los cuales hubo incremento en el número de núcleos, reflejándose en la reducción del dominio mionuclear en el pubococcígeo, no así en el bulboesponjoso.

La primiparidad aumentó la actividad del enzima  $\beta$ -glucuronidasa tres días postparto en el bulboesponjoso lo cual sugiere que el daño ocurre durante el parto. En el pubococcígeo no hubo incremento de la actividad del enzima  $\beta$ -glucuronidasa, esto nos lleva a proponer que el daño ocurre durante la gestación ya que la evidencia histológica sugiere un proceso de regeneración.

Estos resultados cuantifican la magnitud del daño del músculo pélvico el pubococcígeo y perineal el bulboesponjoso debido a la primiparidad.



## 10. PERSPECTIVAS

Los resultados presentados en este trabajo evidenciaron que la primiparidad promueve el aumento del enzima  $\beta$ -glucuronidasa en el mBe y no en el mPc. Además, se observaron modificaciones histológicas relacionadas con la reducción del DMN que pudieran estar relacionadas con un proceso de regeneración del mPc pero no del mBe. El número mayor de núcleos periféricos y centrales en la fibra muscular, se debe al proceso de daño y regeneración muscular, el cual se lleva a cabo por la activación de las células satélite. El uso de marcadores moleculares aportaría datos acerca de los procesos de regeneración de los mPc y mBe, dentro de los cuales se han identificado algunos, entre ellos están los factores de transcripción Pax3 y Pax7, el receptor c-met, para el factor de crecimiento de hepatocitos y el factor nuclear miocítico MNF. Considerando que la regeneración de la musculatura estriada inicia con una fase degenerativa inicialmente con la infiltración de células inflamatorias (neutrófilos y macrófagos), éstos últimos respectivamente, se encargan de fagocitar los restos celulares y preparar el sitio dañado para la fase de regeneración muscular. Por lo cual, sugerimos que el uso de marcadores moleculares para identificar macrófagos sería de mucho interés. Considerando lo anterior, sería factible evaluar la expresión diferencial de marcadores moleculares asociados con la lesión y regeneración de músculos pélvicos (mPc) y perineales (mBe) en conejas vírgenes y multíparas. Esta aproximación aportaría información relevante acerca del grado de daño y regeneración de músculos estriados involucrados en el almacenamiento y expulsión de orina. El daño y/o regeneración de tales músculos podría(n) estar relacionado(s) con los cambios observados en actividad electromiográfica de estos músculos durante la micción en conejas multíparas. De manera general, los resultados de este proyecto contribuirían al conocimiento de los procesos celulares de otras patologías relacionadas con la degeneración muscular.

## 11. REFERENCIAS

**Aderem A.** (2003). Phagocytosis and the Inflammatory Response. Institute for Systems Biology, Seattle, Washington.

**Allen DL,** Roy RR y Edgerton VR (1999). Myonuclear domain in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* 22, 1350-1360.

**Allen, D.L,** Monke, S.R, Talmadge, R.J, Roy, R.R. y Edgerton, V.R. (1995). Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol* 78, 1969–1976.

**Anthony Otto** y Ketan Patel (2010). Signalling and the control of skeletal muscle size. *Experimental cell research* 316, 3059-3066.

**Armstrong RB,** Ogilvie RW y Schwane JA (1983). Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 54:80–93.

**Aronson j.** (1994). Temporal and spatial increases in blood flow during distraction osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 301:124-131.

**Ashton-Miller JA** y DeLancey JO (2007). Functional anatomy of the female pelvic floor. *Ann NY Acad Sci* 1101:266-96.

**Ashton-Miller JA** y DeLancey JO (2009). On the Biomechanics of Vaginal Birth and Common Sequelae. *Annu Rev Biomed Eng.* 11:163-176.

**Barber MD.** (2005). Contemporary views on female pelvis anatomy. *Cleveland clinic journal of medicine.* Volume 72. S4: S3-S11.

**Bakońska-Pacoń E,** Jethon Z, Podhorska-Okolów M, Dzięgiel P. (2005). Changes of lysosomal enzymes activity in the skeletal muscle fibers exposed to endurance exercise. *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku.* Vol. 50, Suppl. 1.

**Bradley C Gill,** Courtenay Moore y Margot S Damaser (2010). Postpartum stress urinary incontinence: lessons from animal models. *Expert Rev Obstet Gynecol.* September 1; 5(5): 567–580.

**Benjamin W.C.** Rosser, Malcom S. Dean y Everett Bandman (2002). Myonuclear domain size varies along the lengths of maturing skeletal muscle fibers. *Int. J. Dev. Biol.* 46: 747-754.

**Burleigh I.G** (1977). Observations on the number of nuclei within the fibres of some red and white muscles. *J Cell Sci* 23, 269–284.

**Brooks N. E,** Schuenke M. D y Hikida R. S (2009). Ageing influences myonuclear domain size differently in fast and slow skeletal muscle of rats. *Acta Physiol*, 197, 55–63

**Brunelli S** y Rovere-Querini P (2008). The immune system and the repair of skeletal muscle. *Pharmacol Res.* Aug; 58(2):117-21.

**Booth, F. W.** y Badwin, K. M (1996). Muscle plasticity: Energy demand and supply process.in handbook of phyology (ed. L.B. Rowell and J.T. Shepherd). Pp 1074-1123, New York: Oxford university Press.

**Cantini M** y Carraro U. (1995). Macrophage-released factor stimulates selectively myogenic cells in primary muscle culture. *J Neuropathol Exp Neurol* 54, 121–128.

**Carlson BM,** Faulkner JA. (1983). The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. *Med Sci Sports Exerc.*15:187-198.

**Cannon, J. G,** Fielding, R. A., Fiatarone, M. A., Orencole, S. F., Dinarello, C. A. y Evans, W. J. (1989). Increased interleukin 1 beta in human skeletal muscle after exercise. *Am. J. Physiol.* 257, R451-R455.

**Carlson ME,** Conboy IM. (2007): Loss of stem cell regenerative capacity within aged niches. *Aging cell*, 6:371-82.

**Clarkson, P. M,** Nosaka, K. y Braun, B. (1992). Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. *Med. Sci. Sports Exerc.* 24, 512-520.

**Charge SB** y Rudnicki MA (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84(1): 209-38.

**Chazaud B**, Brigitte M, Yacoub-Youssef H, Arnold L, Gherardi R, Sonnet C, *et al* (2009). Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exerc sport Sci Rev*; 37: 18-22.

**Chris van der Poel Luc E. Gosselin**, Jonathan D. Schertzer, James G. Ryall, kristy Swiderski, Meron wondemaghen y Gordon S. Lynch (2011). Agein Prolong inflammatory marker expression in regeneration rat skeletal muscle after injury. *Journal of inflammation*; 8:41.

**Christer Malm**, Pernilla Nyberg, Marianne Engström, Bertil Sjödin, Rodica Lenkei, Björn Ekblom y Ingrid Lundberg (2000). Immunological changes in human skeletal muscle and blood after eccentric exercise and multiple biopsies. *Journal of physiology* 529.1 pp.243-262.

**Ciciliot S** y Schiaffino (2010). Regeneration of mammalian skeletal muscles: Basic mechanisms and clinical implications. *Current pharmaceutical desing*, 16, 906-914.

**Cornelison DD** y Wold BJ (1997). Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiesente and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol* 191:270-283.

**Cooper RN**, Butler-Browne GS y Mouly V (2006). Human muscle stem cells. *Curr Opin Pharmacol* 6(3): 295-300.

**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. *J Urol* 181 (3): 1452-8.

**Cortes E**, Te Fong LF, Hammed M, Harridge S, Maclean A, Yang SY, Reid WM y Goldspink G (2005). Insulin-like growth factor -1 gene splice variants as markers of muscle damage in *levator ani* muscle after the first vagina delivery. *Am J Obstet Gynecol* 193(1): 64-70.

**Cruz Y**, Hudson R, Pacheco P, Lucio RA y Martínez-Gómez M. (2002). Anatomical and physiological characteristics of perineal muscles in the female rabbit. *Phisiology & behavior* 75: 33-40.

**Deborah L. Enns** and Peter M. Tiidus. (2009). Estrogen influences satellite cell activation and proliferation following downhill running in rats.

**Dubowitz V** (1985). Definition of pathological changes seen in muscle biopsies. In: Dubowitz V, Brooke MH, editors. Muscle biopsies: A practical approach. 2nd edition. London: BailliereTindall. pp 82-128.

**Edgerton, V.R.** y Roy, R.R. (1991). Regulation of skeletal muscle fiber size, shape and function. *J Biomech* 24, 123–133.

**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. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 19(6):843-9.

**Friden J**, Sjostrom M, Ekblom B (1983). Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man. *Int J Sports Med.* 4:17&176.

**Francesco Saverio Tedesco**, Arianna Dellavalle, Jordi Diaz-Manera, Graziella Messina y Giulio Cossu (2010). Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *The journal of clinical investigation* Vol, 120, Num. 1.

**Galluzzo P**, Rastelli Ch, Bulzomi P, Acconcia F, Pallottini V y Marino M. (2009). 17 $\beta$ -Estradiol regulates the first steps of skeletal muscle cell differentiation via ER $\alpha$ -mediated signals. *Am J Physiol Cell Physiol.* doi:10.1152/ajpcell.00188.

**Garrett Jr., W.E.** y Best, T: M (1994). Anatomy, physiology and mechanics of skeletal muscle. Rosemont, IL, *J Am Acad. Orthop. Surg.*

**Harridge SD** (2007). Plasticity of human skeletal muscle: Gene expression to in vivo function. *Exp Physiol* 92 (5): 783-97.

**Hawke TJ** y Garry DJ. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol.* 91:534–551.

**Henson PM**, Hume DA (2006). Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol.* May; 27(5):244-50.

**Herschorn S.** (2004). Female pelvic floor anatomy: the pelvic floor, supporting structures, and pelvic organs. *Rev Urol, suppl.* 6: S2.

**Heinz R. Augsburg** y Monika Eggenberger (2004). Histochemical and stereological analysis of the levator ani (pubocaudal) muscles In nulliparous and multiparous beagles. *J thereiogenology.*, 11.011.

**Hikida, R.S.**, Van Nostran, S., Murray, J.D., Staron, R.S., Gordon, S.E. y Kraemer, W.J. (1997). Myonuclear loss in atrophied soleus muscle fibers. *Anat Rec* 247, 350–354.

**Jaspers RT**, Feenstra HM, van Beek-Harmsen BJ, Huijting PA, van der Laarse WJ (2006). Differential effects of muscle fibre length and insulin on muscle-specific mRNA content in isolated mature muscle fibres during long term culture. *Cell Tissue Res* 326:795-808.

**Jennifer M.** Peteron, Kevin d. Feedback, Joel H. Baas, y Francis X. Pizza (2006). Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes the accumulation of neutrophils and macrophages in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol* 101: 1394-1399.

**Jens Stern-Straeter**, Frank Riedeld, Gregor Bran, Karl Hörmann y Ulrich Reinhart Goessler. (2007). *Advances in Skeletal Muscle Tissue Engineering. in vivo* 21: 435-444.

**Johnny Huard** y Sehin Wei (2008). *Principles of medicine regenerative* page 1232-1247.

**Jundt K**, Kiening M, Fischer P, Bergauer F, Rauch E, Janni W, Peschers U y Dimpfl T (2005). Is the histomorphological concept of the female pelvic floor and its changes due to age and vaginal delivery correct?. *Neurourol Urodyn* 24(1):44-50.

**Kadi F**, Charifi N, Denis C, Lexell J, Andersen JL, Schjerling P, Olsen S y Kjaer M (2005). The behavior of satellite cells in response to exercise: what have we learned from human studies? *Pflugers Arch* 451: 319-327.

**Kadi F**, Peter Schjerling, Lars L. Andersen, Nadia Charifi, Jørgen L. Madsen, Lasse R. Christensen y Jesper L. Andersen (2004). The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. *J Physiol* 558.3 pp.1005-1012.

**Kyle I. Flann**, Paul C. Lastayo. Donald A. McClain Hazel y Stan L. Lindstedt (2011). Muscle damage and muscle remodeling: no pain, no gain?. *The journal of Experimental Biology*, 214, 674-679.

**Levin ER** (2001). Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J Appl Physiol* 91: 1860–1867.

**López García K** (2010). Parámetros estrogénicos asociados con la multiparidad en la coneja domestica (*Oryctolagus cuniculus*): concentración sérica de estradiol y expresión del receptor de estrógenos en los músculos bulboesponjoso y pubococcígeo. Centro Tlaxcala Biología de la Conducta. Tlaxcala, UAT.

**Lukacs ES**, Lawrence JM, Contreras R, Nager CW y Lubner KM (2006). Parity, mode of delivery, and pelvic floor disorders. *Obstet Gynecol* 107(6): 1253-60.

**Madill SJ y McLean L.** (2006). Relationship between abdominal and pelvic floor muscle activation and intravaginal pressure during pelvic floor muscle contractions in healthy continent women. *Neurourol Urodyn* 25: 722.

**Martínez-Gómez M**, Lucio RA, Carro M, Pacheco P y Hudson R (1997). Striated muscles and scent glands associated with the vaginal tract of the rabbit. *Anat Rec* 247 (4): 486-95.

**Martínez-Gómez M**, Mendoza G, Corona-Quintanilla DL, Fajardo V, Nicolás L y Castelán F. (2011). Multiparity causes uncoordinated activity of pelvic and perineal-striated muscle and urodynamic changes in rabbits. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*.

**Martin Flück** (2006). Functional and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. *The journal of experimental biology* 209, 2239-2248.

**Matano T**, Tamai K, Kurokawa T. (1994). Adaptation of skeletal muscle in limb lengthening: a light diffraction study on the sarcomere length in situ. *J Orthop Res* 12:193–196.

**McClung JM**, Davis JM y Carson JA (2007). Ovarian hormone status and skeletal muscle inflammation during recovery from disuse in rats. *Exp Physiol* 92: 219-232.

**Marijke C**. Slieker-ten Hove. Annelies L. Pool-Goudzaard. Marinus J.C. Eijkemans. Regine P.M. Steegers-Theunissen. Curt W. Burger. Mark E. Vierhout (2009). Pelvic floor muscle function in general female population in relation with age and parity and the relation between voluntary and involuntary contractions of the pelvic floor musculature. *Int Urogynecol J*. 20: 1497-1504.

**Mauro A** (1961). Satellite cells of skeletal muscle fibres. *J Biophys Biochem Cytol* (9). 493-495.

**Mourkioti F** y Rosenthal N: IGF-1 (2005). Inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration. *Trends Immunol* 26: 535-542.

**Mukhopadhyay S**, Plüddemann A, Gordon S. (2009). Macrophage pattern recognition receptors in immunity, homeostasis and self tolerance. *Adv Exp Med Biol.* ; 653:1-14.

**Nagata Y**, Terence A, Partridge, Ryoichi M, y Peter S. Zammit (2006). Entry of muscle satellite cells into the cell cycle requires sphingolipid signaling. *Journal of cell biology*. Vol. 174, No 2. 245-253.

**Newham, D. J**, McPhail, G., Mills, K. R. y Edwards, R. H. (1983). Ultrastructural changes after concentric and eccentric contractions of human muscle. *J. Neurol. Sci.* 61, 109-122.

**Nicolas F**, Malgorzata Daczewka, Christophe Mercelle y Krzysztof Jagla (2007). Muscle stem cell and model system for their investigation. *Developmental dynamics* 236: 3332-42.

**Otto A**. y Patel K (2010). Signalling and the control of skeletal muscle size. *Experimental Cell Research* 316. Page. 3059 – 3066.



**Paul Gregorevic**, David R. Plant, Nicole Stupka y Gordon s, Lynch (2004). Changes in contractile activation characteristics of rat fast and slow skeletal muscle fibres during regeneration. *J Physiol* 558.2 pp 549-560.

**Parise G**, Ciara E. O'Reilly y Michael A. Rudnicki (2006). Molecular regulation of myogenic progenitor populations. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 31: 773–781

**Pavlath, G.K.**, Rich, K., Webster, S.G. y Blau, H.M (1989). Localization of muscle gene products in nuclear domains. *Nature* 337:570-573.

**Pena Outeiriño JM**, Rodríguez PAJ, Villodres Duarte A, Mármol Navarro, Lozano BJM (2007). Tratamiento de la disfunción del piso pélvico Unidad de neurología y urología, *Actas urológicas.* 31 (7): 719-731.

**Petrella [JK](#)**, [Kim JS](#), [Cross JM](#), [Kosek DJ](#), [Bamman MM](#) (2006). Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women. [Am J Physiol Endocrinol Metab.](#) 291(5):E937-46.

**Peschers UM**, Vodusek DB, Fanger G, Schaer GN, DeLancey JO y Schuessler B. (2001). Pelvic muscle activity in nulliparous volunteers. *Neurourol Urodyn*; 20: 269.

**Poortmans A**, Wyndale JJ. (2002). Preventing fatigue of fast striated muscles of the pelvic floor and slow striated muscles of limb by manipulating the on-off time of electric stimulation. *Arch phys med Rehabil.* 83 (4):550-4.

**Scott A**, K M Khan, C R Roberts, J L Cook, V Duronio (2004). What do we mean by the term “inflammation”? A contemporary basic science update for sport medicine. *Br J Sports Med*; 38: 372-380.

**Seale P** y Rudnicki MA (2000). A new look at the origen, fuction and “stem cell” status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 218: 115-124.

**Smith CK jr**, Janney MJ, Allen RE, (1994). Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J cell Physiol* 159: 37-385.

**Smith Heather K.**, Linda Maxwell, Carol D. Rodgert, Nancy H. McKee y Michael J. Plyley (2001). Exercise-enhanced satellite cell proliferation and new myonuclear accretion in rat muscle. *J Appl Physiol* 90: 1407-1414.

**Snow MH** (1977). Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing. II. An autoradiographic study. *Anat Rec* 188: 201-217.

**Steensman AB**, Konstantinovic ML, Burger CW, Dirk de Ridder, Timmerman D, Deprest J (2010). Prevalence of major levator abnormalities in symptomatic patients with an underactive pelvic floor contraction. *Int Urogynecol j. jul*; 21 (7): 861-7.

**S.F.T. Van der Meer**, R.T. Jaspers, H. Degens (2011). Is the myonuclear domain size fixed?. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 11(4):286-297.

**S.F. T. van der Meer**, Jaspers RT, Jones DA, Degens H (2011) Time-course of changes in the myonuclear domain during denervation in young-adult and old rat gastrocnemius muscle. *Muscle & Nerve*. 43:212-22

**Sonnet C**, Lafuse P, Arnold L, Brigitte M, Poron F. y Authier FJ (2006). Human macrophages rescue myoblasts and myotubes from apoptosis through a set of adhesion molecular systems. *J Cell Sci*; 119: 2497-2507.

**Tidball JG**, Berchenko E y Frennette J (1999). Macrophages invasion does not contribute to muscle membrane injury during inflammation. *Journal of Leukocytes Biology*. Vol. 65.

**Tidball JG** (2005). Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol* 288: R345-R353.

**Tidball JG** (2008). Inflammation in skeletal muscle regeneration. In: Schiaffino S, Patridge T, Eds. *Skeletal muscle repair and regeneration*. Dordrecht: Springer;pp 243-268.

**Tidball JG** y Villalta A.S (2010). Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am j Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: R1173-R1187.

**Tomas J. MacLoughli**, Eleni Mylona, Troy A. Horn Berger, Karyn A. Esser y Francis X. Pizza (2002). Inflammatory cells in rat skeletal muscle are elevated after electrically stimulated contractions. *J Appl.* 94: 876-882.

**Tuan HN Nguyen**, Mathieu JM Bertrand, Christiane Sterpin, Younes Achouri y Olivier RY De Backer (2010). Maged1, a new regulator of skeletal myogenic differentiation and muscle regeneration. *Cell biology* 11:57.

**Tseng B.S**, Kasper C.E y Edgerton V.R (1994). Cytoplasm-to-myonucleus ratios and succinate dehydrogenase activities in adult rat slow and fast muscle fibers. *Cell Tissue Res* 275, 39-49.

**Varuna Raizada**, M.D y Ravinder K. Mittal, M.D (2008). Pelvic floor anatomy and applied physiology. *Gastroenterol. Clin North Am*; 37 (3).

**Vihko V**, Rantamäki J y Salminen A. (1978a) Exhaustive physical exercise and acid hydrolase activity in mouse skeletal muscle. A histochemical study. *Histochemistry* 57, 237-249.

**Kalbe C**, Mau M, Wollenhaupt K, Rehfeldt C (2007). Evidence for estrogen receptor alpha and beta expression in skeletal muscle of pigs. *Histochem Cell Biol.* Jan; 127(1):95-107.

**Karalaki M**, Fili S, Philippou A, Koutsilieris M (2009). Muscle regeneration: cellular and molecular events. *In vivo.* Sep-oct; 23(5) 779-96.

**Karoly Pap.** Sándor Berki, Tamás Shisha, Sándor Kiss y György Szöke (2009). Structural changes in the lengthened rabbit muscle. 33:561-566.

**Kuo-Cheng Lien**, MS, Brian Mooney, MS, John O. L. DeLancey, MD, and James A. Ashton-Miller (2004). *Levator Ani* Muscle Stretch Induced by Simulated Vaginal Birth. *Obstet Gynecol.* January; 103(1) 31-40.

**Round, J. M.**, Jones, D. A. and Cambridge, G. (1987). Cellular infiltrates in human skeletal muscle: exercise induced damage as a model for inflammatory muscle disease? *J. Neurol. Sci.* 82, 1-11.

**Roy R.R**, Monke S.R, Allen D.L y Edgerton V.R (1999). Modulation of myonuclear number in functionally overloaded and exercised rat plantaris fibers. *J Appl Physiol* 87 634–642.

## 12. GLOSARIO DE TERMINOS

ADN Ácido desoxirribonucleico

CSA Área transversal de la fibra muscular

DMN Dominio mionuclear, volumen citoplasmático que es controlado por un solo núcleo

EEU Esfínter externo de la uretra

H-E Hematoxilina y eosina

Pax3 Proteína perteneciente a la familia de factores de transcripción Paired box (Pax). Esta proteína está involucrada en la activación desarrollo y regeneración de la musculatura estriada. Se expresa en el desarrollo embrionario y es esencial para la migración de los somitas

Pax7 Proteína perteneciente a la familia de factores de transcripción Paired box (Pax). Esta proteína está involucrada en la activación desarrollo y regeneración de la musculatura estriada. Se expresa en células satélite en estado quiescente.

MyoD Proteínas pertenecientes a la familia de proteínas conocidas como factores reguladores miogénicos (MRFs). Se presentan en el proceso de diferenciación miogénica y es un marcador temprano de la miogénesis. Se expresa en células satélites activas.

Myf5 Proteína perteneciente a la familia de proteínas conocida como factores reguladores miogénicos (MRFs). Tiene una función importante durante la diferenciación muscular.

mPc Músculo pubococcígeo

mBe Músculo bulboesponjoso

mIs Músculo isquiocavernoso

NP Nervio pudendo

*Levator ani* Grupo de músculos que está formado por cinco partes: el pubovaginal, el puboperineal, porción puboanal, el cual forma el complejo pubovisceral y el músculo

puborectalis e ileococigeo. Esas partes del *levator ani* forman tres diferentes regiones del piso pélvico.

IGF-1 Factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 1

Ip Intraperitoneal

IU incontinencia urinaria

## 14. PUBLICACIONES

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

Congresos

**Sánchez García Octavio**, Kenia López García, Margarita Martínez Gómez y Francisco Castelán. Evaluación del daño muscular y su relación con la infiltración de macrófagos y regeneración de los músculos bulboesponjoso y pubococcígeo de conejas primíparas y múltiparas. En el XVI Curso Internacional Bases Biológicas de la Conducta. Tlaxcala, Tlax. Octubre de 2010.

García Villamar V, Carrasco Ruiz MA, López García K, Ramírez corona E, **Sánchez García O**, Cuevas E, Martínez Gómez M, Castelán F. Efecto de la ovariectomía y la administración de benzoato de estradiol sobre la sensibilidad estrogénica e histología de la musculatura estriada pélvica y perineal de la coneja. LIV Congreso Nacional de Ciencias fisiológicas. León Guanajuato, México, 2011.

**Sánchez García Octavio**, Kenia López García, Laura G. Hernández Aragón, Margarita Martínez Gómez y Francisco Castelán. Efecto del parto sobre marcadores de daño y regeneración del músculo pubococcígeo y bulboesponjoso en la coneja doméstica. XXXVII Reunión Nacional del AIBIR. Pachuca Hidalgo, 2012.

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.

Hernández Aragón LG, Xelhuanzi N, **Sánchez García O**, Ortega A, Martínez Gómez M, y Castelán F. Efecto de la gestación y el periodo posparto sobre la morfología de los ganglios paravaginales del plexo pélvico de la coneja. XXXVII Reunión Nacional del AIBIR. Pachuca Hidalgo, 2012.