



Universidad Autónoma de Tlaxcala

**Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas**

La expresión del enzima P450 aromatasasa en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso es dependiente de la síntesis extragonadal de esteroides en la coneja doméstica

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

María de Los Ángeles Carrasco Ruíz

Director de tesis:

Dr. Francisco Castelán

Tlaxcala, Tlax.

Agosto 2013



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta Posgrado en Ciencias Biológicas

La expresión del enzima P450 aromatasa en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso es dependiente de la síntesis extragonadal de esteroides en la coneja doméstica

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

María de Los Ángeles Carrasco Ruíz

Director de tesis:

Dr. Francisco Castelán

Miembros del Comité Tutorial:

Dr. Francisco Castelán

Dr. Ismael Jiménez estrada

Dra. Estela Cuevas Romero

Dra. Margarita Martínez Gómez

Tlaxcala, Tlax.

Agosto 2013



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



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

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que María de los Ángeles Carrasco Ruíz realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“La expresión del enzima P450 aromatasas en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso es dependiente de la síntesis extragonadal de esteroides en la coneja doméstica”**

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., JULIO 12 DE 2013

DR. FRANCISCO CASTELÁN

DRA. MARGARITA MARTÍNEZ GÓMEZ

DR. ISMAEL JIMÉNEZ ESTRADA

DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO

DR. VÍCTOR MANUEL FAJARDO
GUADARRAMA



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



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradoctbcuat@gmail.com
Tlaxcala, Tlax.

Este proyecto fue realizado bajo la dirección del Dr. Francisco Castelán. La asistencia técnica fue brindada por la Q.F.B. Laura García Rivera, pieza fundamental para la realización de este trabajo.

Esta tesis se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biología celular del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx), unidad periférica Tlaxcala del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para su desarrollo se contó con el financiamiento de PROMEP-SEP (UATLX-PTC-109 a FC), PAPIIT-UNAM (228110 a MMG), CONACyT (105882 a MMG), beca CONACyT (261596 a MACR) y Universidad Autónoma de Tlaxcala (CACyPI-UATx-2013)



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Reforma Curricular 2012



Universidad de la Autorrealización

AGRADECIMIENTOS

En principio quiero agradecer al Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

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

A los programas de investigación que financiaron este proyecto: PROMEP-SEP (UATLX-PTC-109), PAPIIT-UNAM (228110), CONACYT (105882 a MMG), beca CONACyT (261596 a MACR) y Universidad Autónoma de Tlaxcala (CACyPI-UATx-2013)

.

A mi tutor el Dr. Francisco Castelán por haber confiado en mi persona, por la dirección en este trabajo, por su paciencia, por sus comentarios en todo el proceso de elaboración de la Tesis y sus atinadas correcciones, de forma personal por los consejos, el apoyo y el ánimo que me brindó gracias.

A mi comité tutorial: Margarita Martínez Gómez, Dra. Estela Cuevas Romero, Dr. Ismael Jiménez Estrada, Dra. Dora Luz Corona Quintanilla y Dr. Víctor Fajardo Guadarrama por su amable aceptación para revisar el desarrollo y conclusión de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A dios que en silencio me ha acompañado a lo largo de mi vida sin pedirme nada a cambio y hoy me regala la alegría de ver realizado uno de mis sueños.

A mis princesas hermosas a quienes con el corazón lleno de tristeza, tuve que robarles horas de convivencia y juegos. Agradeciéndoles que a cambio al verme brille su mirada y corran con alegría hacia mí, brindándome sonrisas y mil besos, demostrándome así su gran cariño. Para ustedes que desde que nacieron son mi mayor ilusión, mi valentía, mi fuerza, mi alegría y la razón de mi vida, gracias las quiero mucho recuerden que ustedes son mi inspiración para seguir adelante.

A Gustavo porque gracias a tu apoyo, esfuerzo y comprensión; me has inspirado impulsándome a obtener uno de mis principales objetivos. Con cariño admiración y respeto mil gracias por todo lo que me has dado y sobre todo, por la confianza que me has transmitido día con día por el hecho de haber creído en mí. Te Amo.

A mis padres a quienes infinitamente agradezco que siempre velaron por mí desde niña y que me impulsaron a seguir siempre adelante aún cuando tuve algunas dudas y tropiezos. A mi madre gracias por el apoyo moral, tu cariño y comprensión que desde niña me has brindado, por guiar mi camino y por estar junto a mí en los momentos más difíciles, la fuerza que me ayudo a conseguir mi meta fue tu apoyo. A mi padre porque desde pequeña ha sido para mí un gran hombre maravilloso al que siempre he admirado.

A mis hermanos (Ana, Omar y José Luis) gracias por soportar mi mal humor y por preocuparse por mí cuando las cosas salían mal sé que nuestras vidas año con año van tomando rumbos diferentes cada uno de nosotros busca su propio bienestar pero recuerden que cuentan conmigo.

A mis compañeros de laboratorio (Nicté, Kenia, Laura, Verónica y Octavio) por convertirse en maestros y amigos durante mi estancia, por escuchar y ayudar a encontrar las mejores soluciones a cada situación, gracias por acompañarme en esta aventura

A Jheni, a Rosa María y a Mario quienes durante años han sido amigos y confidentes gracias por el gran apoyo en todo momento, los quiero mucho.

Con todo mi amor y agradecimiento quiero dedicar esta tesis a mis hijas Vanesa y Kenia: porque representan el amor que siempre me impulsó para realizar este sueño; siendo ellas inspiración para tomar nuevos retos. A Gustavo por su paciencia y apoyo que en todo momento demostró. Para ustedes con todo mi cariño.

No podemos resolver problemas pensando de la misma manera que cuando los creamos.

Albert Einstein

RESUMEN

Los ovarios son la principal fuente de estradiol (E2). Este funciona a través de la unión a sus receptores, los receptores de estrógenos (RE) α y β , principalmente. En mujeres postmenopáusicas, la producción de E2 se desplaza desde el ovario a una serie de sitios extragonadales. El músculo esquelético es un tejido con capacidad de síntesis extragonadal. En la coneja (*Oryctolagus cuniculus*), dos músculos estriados involucrados en la micción son el músculo pubococcígeo (mPc) y el músculo bulboesponjoso (mBe). En este contexto resulta útil conocer si en el mPc y en el mBe existe síntesis de E2 ya que podrían funcionar como blanco para terapias hormonales. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la reducción de hormonas esteroides sobre la expresión del enzima aromatasa y los RE's en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso. Se utilizaron 18 conejas divididas en 3 grupos: control (C) y ovariectomizadas (OVX) por 3.5 meses, y suplementadas (OVX+BE) o no con benzoato de estradiol durante 1.5 meses la concentración sérica de E2 y testosterona (T) se cuantificó mediante ELISA. La expresión de ambos subtipos de RE se realizó por inmunohistoquímica y la expresión del enzima aromatasa se realizó por Western Blot. Los resultados muestran que la concentración sérica de E2 es similar en los grupos C y OVX en el grupo OVX+BE es mayor. La concentración sérica de T es menor en los grupos OVX y OVX+BE. En el mPc la expresión de ambos subtipos del receptor de estrógenos aumentó después de la ovariectomía y el remplazo con benzoato de estradiol (BE) no revirtió tal efecto, en el mBe no hubo cambios. En el mPc la expresión del enzima aromatasa aumenta después de la ovariectomía el remplazo con BE revierte tal efecto en cambio en el mBe hay una disminución en los grupos OVX y OVX+BE. En conclusión la expresión diferencial de los RE's y del enzima determinante para la síntesis de estradiol en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso muestran evidencia de su sensibilidad estrogénica y de su capacidad para funcionar como órganos blancos en tratamientos hormonales relacionados con disfunciones del piso pélvico.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Síntesis de esteroides sexuales.....	2
2.2 Aromatización extragonadal.....	4
2.3 Papel de los estrógenos en el músculo estriado.....	5
2.4 Musculatura estriada del área pélvica y perineal.....	7
3. JUSTIFICACIÓN.....	9
4. HIPÓTESIS.....	10
5. OBJETIVOS.....	11
5.1 Objetivo general.....	11
5.2 Objetivos particulares.....	11
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
6.1 Mantenimiento de los animales.....	12
6.2 Cuantificación de estradiol y testosterona sérico.....	13
6.3 Marcaje inmunohistoquímico anti-receptor de estrógenos.....	13
6.4 Análisis de la expresión del enzima P450 aromatasa.....	14
6.5 Análisis de resultados.....	15
7. RESULTADOS.....	16
7.1 Parámetros morfométricos.....	16
7.2 Concentración sérica de estradiol.....	17
7.3 Concentración sérica de testosterona.....	18
7.4 Expresión de receptores α y β en el mPc.....	19
7.5 Expresión de receptores α y β en el mBe.....	20
7.6 Expresión del enzima aromatasa en el mPc y mBe.....	21
7.7 Expresión del enzima aromatasa en el mPc.....	22
7.8 Expresión del enzima aromatasa en el mBe.....	23
8. DISCUSIÓN.....	24

8.1	Parámetros morfométricos.....	24
8.2	Concentración sérica de estradiol y testosterona.....	25
8.3	Expresión de receptores α y β en el mPc y mBe.....	27
8.4	Expresión del enzima aromatasa en el musculo mPc y mBe.....	30
8.5	Aporte biomédico.....	32
9.	CONCLUSIONES.....	33
10.	PERSPECTIVAS.....	34
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
12.	ABREVIATURAS.....	48
12	PUBLICACIONES.....	49

1. INTRODUCCIÓN

En mujeres después de la menopausia los niveles séricos de hormonas gonadales se reducen drásticamente y el esteroide sistémico más abundante es la dehidroepiandrosterona (DHEA) que puede ser convertida a estradiol (E2) y testosterona (T) en tejidos periféricos que expresen los enzimas esteroidogénicos. La cantidad de E2 sintetizado por sitios extragonadales alcanza concentraciones que ejercen una influencia biológica a nivel local. Las regiones periféricas son capaces de la síntesis de estrógenos debido a que expresan aromatasa, el enzima limitante de biosíntesis de estrógenos. Este enzima se expresa en diversos tejidos entre ellos encontramos al músculo estriado.

La musculatura estriada pélvica y perineal es determinante para la fisiología del aparato urogenital femenino en el humano y varias especies de mamíferos. En la coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*), los músculos pubococcigeo (mPc) y bulboesponjoso (mBe) expresan los subtipos de receptores a estrógenos (RE) α y β debido a esto el E2 impacta sobre ellos. Es posible que la respuesta ante los niveles circulantes de estradiol en estos músculos pudiera estar modulada no sólo por la concentración de E2 producida por los ovarios, sino también de aquella que pudiera estar siendo producida en el músculo, razón por la cual se pretende esclarecer la influencia de los estrógenos sobre la maquinaria enzimática en el mPc y en el mBe.

2. ANTECEDENTES

2.1 Síntesis de esteroides sexuales

Las hormonas esteroides incluyen los esteroides sexuales, corticosteroides, y mineralocorticoides. Todos ellos derivan del colesterol. Los principales lugares de producción de esteroides sexuales en el ovario son fundamentalmente las células de la granulosa, las células de la teca y las células del cuerpo lúteo estas poseen el sistema enzimático requerido para la formación de hormonas esteroides sexuales.

La síntesis de esteroides gonadales es controlado en gran parte por el aromatasa (Conley y Hinshelwood 2001). El aromatasa es un enzima que cataliza la conversión de los andrógenos en estrógenos, y se localiza en el retículo endoplasmático de varios tejidos incluyendo el cerebro, las gónadas, la placenta y el tejido adiposo (Silandre y col. 2007). El aromatasa es codificada por el gen CYP19 (Cruz y Canario 2000) en la especie humana durante el embarazo la placenta es la principal fuente de expresión de CYP19. La rata y el ratón no expresan CYP19 en placenta (Kamat y col. 2002).

En el ovario, la hormona folículo estimulante (FSH) induce la transcripción del gen aromatasa, se han identificado dos regiones en el promotor de la aromatasa que median el efecto estimulador el Adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y la proteína kinasa A (PKA) (Fitzpatrick y col. 1993; 1994). Se ha demostrado que existen 2 sitios de unión en el control de la expresión del aromatasa en las células de la granulosa. Las interacciones hormonales con FSH regulan la expresión de aromatasa activando el AMPc / PKA que son conocidos para mediar efecto estimulador sobre la expresión de aromatasa. Los andrógenos y el E2 potencian este efecto de la FSH. Los andrógenos tienen efectos directos mediados por la activación de los receptores de andrógenos y los efectos indirectos por su conversión a E2. El E2 también aumenta el efecto estimulante de la FSH (Stooco 2008).

El enzima P450 aromatasa se expresa en los folículos preovulatorios y cuerpos lúteos de mujeres ovuladoras por medio de un promotor proximal de inicio de la traducción (Means 2005). Mientras que en la granulosa, la expresión de aromatasa está principalmente bajo el control de la gonadotropina FSH, cuya acción está mediada por AMPc (Simpson y col. 2002). En células de la granulosa la expresión está regulada principalmente por el promotor II, FSH

se une a su receptor y activa adenil ciclasa, que resulta en la formación de AMPc y la activación de PKA (Simpson y col. 2002).

Las hormonas esteroides sexuales son principalmente producidas y secretadas por los ovarios, los testículos y la corteza suprarrenal. Afectan a diversos procesos fisiológicos a órganos y tejidos: huesos, hígado, corazón, vasos, cerebro y músculos esqueléticos (Labrie y col. 1995, Labrie y col. 2004, Labrie y col. 2005). Los estrógenos ejercen una gran variedad de efectos sobre el crecimiento, desarrollo y diferenciación de diversos tejidos. La acción primaria de su regulación estaba enfocada principalmente a órganos reproductivos, sin embargo trabajos recientes muestran que pueden regular diversos procesos en tejidos como hueso, hígado, el sistema cardiovascular, cerebro y músculo (Katzenellenbogen y col. 2000). Los estrógenos son relevantes para la regulación de energía y sustratos metabólicos, por lo que las alteraciones enzimáticas que pudiera ocasionar sobre algunas rutas de señalización implicadas en la oxidación de lípidos y metabolismo de la glucosa pueden ocasionar un daño serio sobre la fisiología de la musculatura estriada (Brown y col. 2008). El E2 funciona principalmente a través de la unión a sus receptores, el RE α (Glenmark y col. 2004) y el RE β (Krege y col. 1998). El E2 inhibe la apoptosis en la línea celular C2C12 de músculo esquelético a través de PI3K/Akt, MAPKs, HSP27 y receptores estrogénicos con localización no clásica. El E2 puede inhibir la apoptosis a través de las MAPKs en cultivos primarios de músculo esquelético de ratón (Pronsato y col. 2010). Además se ha demostrado que los estrógenos promueven la proliferación y diferenciación de mioblastos esqueléticos (Pronsato y col. 2010).

Recientemente se demostró que el RE α puede estimular la transcripción de los genes de aromatasa, así como de otros enzimas claves en la esteroideogénesis (Stein y col. 2006). La importancia de los andrógenos en las mujeres se dio después de encontrar que eran precursores de los estrógenos, estos son el sustrato del aromatasa el enzima que produce estrógenos (Pettersson y col.2001).

2.2 Aromatización extragonadal

En mujeres postmenopáusicas, la producción de estrógenos se desplaza desde el ovario a una serie de sitios extragonadales (Zhao y col. 2004). La glándula suprarrenal es el principal órgano para secretar hormonas sexuales fuera del ovario en mujeres (Meikle y col. 1991). Simpson ha desarrollado el concepto de aromatización extragonadal. Esto implica que los andrógenos se pueden convertir en estrógenos en sitios extragonadales. Estos estrógenos señalizan en una forma paracrina o intracrina, aunque puede entrar en la circulación y aumentar los niveles circulantes de estrógeno. Los sitios de aromatización extragonadal incluyen las células mesenquimales de tejido adiposo, los osteoblastos y los condrocitos de los huesos, el endotelio vascular y las células musculares lisas de aorta y numerosos sitios en el cerebro, incluyendo el área preóptica media / anterior hipotálamo, el hipotálamo basal medial, y la amígdala (Cornelia y col. 2011). Por lo tanto en mujeres postmenopáusicas los niveles circulantes se limitan a reflejar la suma de la formación local en distintos lugares (Simpson y col. 2001).

La menopausia se asocia con una disminución natural de estrógenos que aumenta la grasa visceral, disminuye la densidad de la masa ósea, la masa muscular y la fuerza (Maltais y col. 2009). La expresión del enzima aromatasa humana juega un papel clave en la producción extragonadal de estrógenos, especialmente en mujeres posmenopáusicas en las que la expresión ovárica de aromatasa disminuye (Bulun y col. 2005).

La sarcopenia es la pérdida de masa y fuerza del músculo esquelético, es una condición frecuente durante el envejecimiento. Conduce a incapacidad motora resultando en internación y mortalidad. Puesto que los niveles de estrógenos y/o testosterona disminuyen con la edad, la sarcopenia se ha asociado al déficit de ambas hormonas (Pronsato y col. 2010). Las mujeres postmenopáusicas incrementa el riesgo para el desarrollo de los dolorosos trastornos músculo-esqueléticos como la artritis y la osteoporosis (Loren y col. 2007).

En las mujeres, postmenopausicas, todos los estrógenos y casi todos los andrógenos se sintetizan localmente en los tejidos periféricos a partir de DHEA que indirectamente ejerce efectos, entre otros, en la formación de hueso, la grasa, el músculo, la insulina y la glucosa el metabolismo, la piel y el líbido (Labrie y col. 2004). Los seres humanos, junto con los otros primates, son los únicos entre especies animales en las que las glándulas suprarrenales que

secretan grandes cantidades del precursor inactivo esteroides DHEA y especialmente sulfato de DHEA (DHEA-S) se convierte en andrógenos potentes y/o estrógenos en los tejidos periféricos (Labrie y col. 2005). La biosíntesis de andrógenos y estrógenos activos provenientes de DHEA se logra por tres enzimas relacionadas con la esteroidogénesis (Labrie y col. 2004). La T es sintetizada a través del metabolismo de DHEA por 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) y a su vez los estrógenos se convierten a partir de andrógenos catalizado por el citocromo P450 aromatasa (Aizawa y col. 2006). De hecho, la formación de esteroides sexuales no se detiene en la menopausia; sin embargo, se hace exclusivamente específica del tejido y depende de la disponibilidad de DHEA (Labrie 2010). La DHEA es la fuente exclusiva de esteroides sexuales después de la menopausia, proporciona estrógenos o andrógenos (o ambos) sólo a los tejidos que poseen las enzimas requeridas para transformarla (Labrie y col. 2005).

La generación de ratones knockout aromatasa (ArKO) ha dado lugar a varias ideas en los múltiples roles que desempeñan los estrógenos en el desarrollo y mantenimiento de sistemas fisiológicos en mamíferos (Nemoto y col. 2000). La ovariectomía (OVX) puede promover la síntesis periférica de estrógenos (Davidge y col. 2000). En ratas se encontró que la OVX incrementa gradualmente los niveles de estrógenos circulantes y la expresión del mRNA del aromatasa en tejido adiposo (Zhao y col. 2005). En baboons (*Papio anubis*) en el que la actividad aromatasa mamaria se midió de forma secuencial durante la fase folicular y la fase lútea, la actividad de la aromatasa fue significativamente superior después de la OVX y se redujo hasta el nivel en el animal intacto por tratamiento posterior con benzoato de estradiol (BE) (Nakamura y col. 1999). Thordarson y col. (2001) mostraron que la expresión del enzima aromatasa aumenta en tumores mamarios de ratas OVX. Sin embargo en cabras la OVX reduce la expresión de este enzima en tejido de la glándula mamaria (Dessauge y col. 2009). Los estrógenos producidos en la glándula mamaria por la aromatización de la T tienen un papel funcional en el tejido mamario. El aromatasa que se expresa en la glándula mamaria puede ser importante en el mantenimiento de concentraciones locales de estrógenos, en particular después de la menopausia (Nakamura y col. 1999).

2.3 Papel de los estrógenos en el músculo estriado

Con la pérdida de E2, a través de la eliminación de tejido ovárico, la capacidad de generación de fuerza de los músculos de los miembros posteriores en ratones disminuye (Moran y col. 2006). Después de la sustitución de E2, este decremento en la fuerza se recupera totalmente, mostrando que el E2 es una hormona que afecta la función del músculo esquelético y la calidad (Moran y col. 2007). El músculo esquelético posee capacidad esteroideogénica (Sato y col. 2007) ya que expresa el enzima aromatasa localizada en el citoplasma de las células musculares (Aizawa y col. 2006). La grasa y el músculo debido a su gran masa en el cuerpo se puede esperar que contribuyan como fuente principal en la formación total de los estrógenos periféricos (Larionov y col. 2003). Sato (2007) demostró que el músculo esquelético es capaz de sintetizar testosterona y estrógenos a través de la circulación local de la DHEA. La testosterona y estradiol afectan el crecimiento, la fuerza y el metabolismo en el músculo esquelético (Aizawa y col. 2006). Se ha encontrado que una modificación en la concentración sérica de E2 afecta la fisiología de sus órganos blanco, incluida la musculatura estriada (Alonso y col. 2006, Morán y col. 2006, Moran y col. 2007). Aizawa y col. (2006) demostraron que las células del músculo esquelético expresan tres enzimas androgénicas, (3β -HSD, 17β -HSD y P450arom) y que estas enzimas se expresan diferencialmente dependiendo del tipo de fibras que componen al músculo. Las diferencias sexuales en la regulación de estas enzimas puede contribuir a la síntesis a nivel local de las hormonas esteroideas sexuales en el músculo esquelético de cada sexo (Aizawa y col. 2008).

Se ha observado que la musculatura estriada es un órgano diana de las hormonas gonadales (Brown y col. 2008). Los estrógenos aumentan la fuerza del músculo esquelético, ya que se han observado variaciones en la fuerza muscular durante el ciclo menstrual humano (Glenmark y col. 2004). Al comparar la fuerza de los músculos de mujeres que reciben terapia de reemplazo hormonal vs mujeres que no tienen terapia de reemplazo hormonal, se encontró que la fuerza es mayor en el primer grupo (Phillips y cols. 1993). Se ha demostrado que en ratas OVX con atrofia muscular por desuso, la falta de estrógenos modifica el peso húmedo y el contenido de proteínas contráctiles y que el reemplazo de estrógeno a dichas ratas atenúa la atrofia ósea y la atrofia muscular, pero no impide dichos procesos (McClung y col. 2006). Los

músculos estriados pélvicos y los perineales están asociados con el aparato urogenital inferior (AUI) de machos y hembras de distintas especies de mamíferos. (Netter 2002).

2.4 Musculatura estriada del área pélvica y perineal

Los músculos de la región pélvica se clasifican en dos grupos. Los pélvicos son aquellos que están dentro de la cavidad pélvica el coccígeo, el iliococcígeo, el pubococcígeo, el obturador externo, el obturador interno, el constrictor vulvar y el bulboglandular (Netter 2002). Los perineales se localizan fuera de la cavidad pélvica, como el constrictor vestibular, el isquiocavernoso, el bulboespososo, el esfínter externo de la uretra (rabdoesfínter uretral) y el esfínter anal (Netter 2002).

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

En la coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*), dos de los músculos estriados involucrados en la fisiología de la micción son el mBe y el mPc (Corona-Quintanilla y col. 2009). En la coneja, el mPc se origina en la espina ciática del isquion donde la mayoría de sus fibras se insertan sin apariencia tendinosa en la sexta vértebra coccígea. El resto de las fibras se insertan mediante tendón en las vértebras coccígeas 7 y 8 (Martínez-Gómez y col. 1997); el (mBe) se encuentra situado justo debajo del constrictor vestibular, y está constituido por dos pares de músculos que convergen con el músculo isquiocavernoso para unirse con el tendón de la línea media ventral de la vagina (Martínez-Gómez y col. 1997, Cruz y col. 2002; fig. 1).

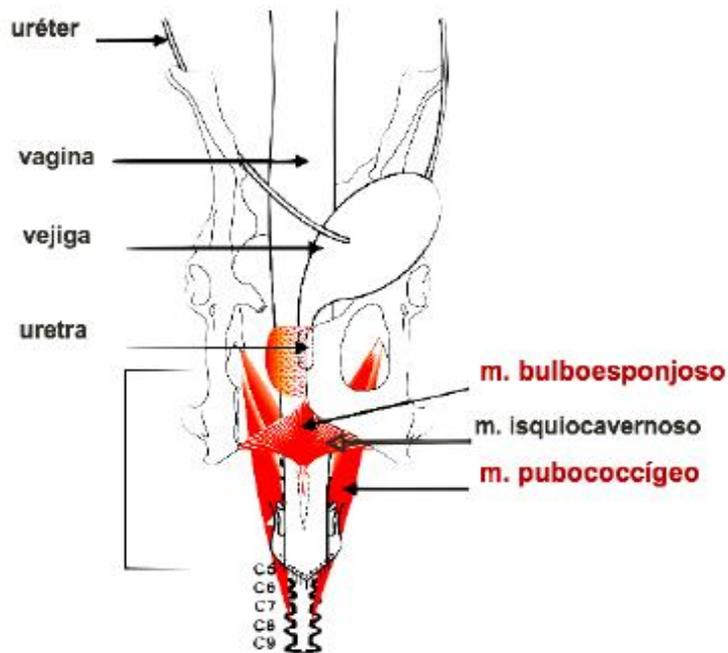


Figura 1. Anatomía de la musculatura estriada del área pélvica y perineal de la coneja doméstica. La localización de los músculos mBe, mPc y mIs, (Modificado de Martínez-Gómez y col. 1997).

En nuestro grupo de investigación se ha encontrado que la multiparidad trae cambios en la secreción de E2 asociados con el número de partos, que ha impactado diferencialmente en la histología del músculo pubococcigeo y el bulboesponjoso de la coneja (López García y col. 2013). Pero la multiparidad también incluye modificaciones hormonales asociadas con la cópula, la gestación y la lactancia. (Matt y cols. 1986; González-Mariscal y col. 1994; Ubilla y Rebollar 1995; Bridges y Byrnes 2006; Alonso y col. 2006). Para conocer el efecto de hormonas ováricas sobre estos músculos en nuestro grupo de investigación se diseñó un modelo artificial de ovariectomía crónica y reemplazo con BE. Trabajos previos muestran que el área transversal de las fibras del mPc se modificaba al igual que el número de mionúcleos periféricos, pero estas variables no se vieron modificadas en el mBe. Lo anterior sugiere que existe una regulación independiente de los niveles séricos de estradiol en estos músculos y que la regulación es por una síntesis local, razón por la cual se pretende esclarecer si existe síntesis de testosterona a estradiol por aromatización.

3. JUSTIFICACIÓN

La fluctuación hormonal es un factor de gran importancia que modifica diversos procesos fisiológicos. Los músculos pubococigeo y bulboesponjoso expresan ambos subtipos α y β del receptor de estrógenos por lo que es claro que el estradiol influye sobre ellos. Es posible que la respuesta ante los niveles circulantes de estradiol en estos músculos pudiera estar modulada no sólo por la concentración de E2 producida por la fuente principal (ovarios), sino también de aquella que pudiera estar siendo producida en el músculo y utilizada mediante un tipo de comunicación paracrina que pudiera estar influyendo en su fisiología.

4. HIPÓTESIS

La reducción de los niveles hormonales debido a la OVX crónica promueve un aumento en la expresión del enzima aromatasa y de los RE α y β en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la reducción de hormonas esteroides sobre la expresión del enzima aromatasa y los RE en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de conejas control (C), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas más reemplazo de benzoato de estradiol (OVX+BE).

5.2 Objetivos particulares

En conejas C, OVX y OVX+BE.

- a. Cuantificar la concentración sérica de estradiol y testosterona.
- b. Determinar la expresión del enzima aromatasa en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso.
- c. Evaluar la expresión de los subtipos α y β del RE en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 *Mantenimiento de los animales*

Las conejas fueron mantenidas en condiciones estándar de bioterio con un ciclo luz-oscuridad de 16h / 8h, respectivamente. Los animales fueron alojados en jaulas individuales de acero inoxidable de 50 x 60 x 40 cm, con alimento Purina y agua ad libitum y a una temperatura de 22 ± 2 °C. El uso y manejo de los animales de experimentación se realizó bajo los lineamientos establecidos por los protocolos de bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM) y el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (UATx).

Grupos experimentales

Control (C). Conejas vírgenes de once meses de edad.

Ovariectomizadas (OVX). Conejas vírgenes a las cuales a los seis meses de edad se les realizó ovariectomía. Para la ovariectomía, las conejas fueron anestesiadas con una combinación de ketamina (20 mg/kg) y xilazina (20 mg/kg) vía intramuscular. Una vez anestesiada se les hizo incisiones bilaterales para posteriormente extirpar ambos ovarios, ligando venas y arterias que irrigan el plexo venoso para evitar hemorragias. 3.5 meses después de la ovariectomía se les implantaron cápsulas de Silastic vacías por un lapso de 1.5 meses.

Ovariectomizadas más reemplazo de benzoato de estradiol (OVX+BE). Conejas vírgenes a las cuales a los seis meses de edad se les realizó ovariectomía. 3.5 meses después de la ovariectomía se les dio reemplazo hormonal con benzoato de estradiol mediante la implantación quirúrgica de cápsulas de Silastic (aproximadamente 70 mg de benzoato de estradiol) por 1.5 meses.

Las conejas fueron sacrificadas a los once meses de edad con una sobredosis de pentobarbital sódico, al día del sacrificio se registró el peso corporal y el peso húmedo del útero.

6.2 Cuantificación de estradiol y testosterona séricos

Las muestras sanguíneas (1.5 mL) se obtuvieron por punción de una de la vena central de la oreja, las muestras se obtuvieron cada seis días después de la cirugía y al día del sacrificio. El suero fue separado por centrifugación (a 10,000 rpm, 15 min) y se almacenó para su análisis a -80 °C. Para la extracción de esteroides totales se colocaron 100 µL de suero en un tubo de vidrio. Se agregó a cada tubo un mL de éter etílico y se agitó durante 30s. Posteriormente, se colocaron las muestras en el congelador hasta la separación de fases. La fase orgánica fue recolectada y el éter etílico se evaporó en baño María a 40°C en una campana de extracción. A continuación se agregó 1 mL de metanol a cada tubo, se agitó por 10 s, y se centrifugó (a 5000 rpm, 5 min). El etanol se evaporó en baño María a 80°C en una campana de extracción. El extracto fue resuspendido en 55 µL de buffer de ELISA (PBS 50Mm/ 0.1% gelatina). Se centrifugaron las muestras a 10000 rpm por 1 min. Posteriormente, las muestras se incubaron por 10 min a 37°C en baño María. La cuantificación se hizo por la técnica de ELISA siguiendo las indicaciones contenidas en los kits de los fabricantes.

6.3 Marcaje inmunohistoquímico anti-receptor de estrógenos

Se utilizaron cortes transversales (7 µm) obtenidos en un microtomo Leica (RM2135). Posteriormente fueron sometidos a un tratamiento para exponer los antígenos de la preparación (citrato de sodio 10 mM pH 6, durante 72 h a 4 °C y 5 min a 90 °C). Con el fin de bloquear las peroxidasa endógenas, los cortes se incubaron en una solución de peróxido de hidrógeno al 3 % en PBS (Na₂HPO₄ 7.6 mM, NaH₂PO₄ 2.66 mM y NaCl 0.15 M, pH 7.4) durante 30 min. Después de la incubación los cortes se lavaron con PBS. Posterior al lavado, los cortes se incubaron en una solución de bloqueo de uniones inespecíficas (5 % de suero normal de cabra (NGS) en PBS / triton X100) durante 1 h. A continuación los cortes fueron incubados (72 h, 4°C) con el primer anticuerpo (anti-RE α, Abcam, 1:250; anti-RE β, Novus Biologicals, 1:250) diluido en PBS / triton X100. Transcurrida esta incubación se hicieron tres lavados con PBS / triton X100 para posteriormente incubar con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón hecho en cabra y biotinilado, diluido 1:250 en PBS / triton X100) durante 2 h a temperatura ambiente. El marcaje inmunohistoquímico fue revelado con el kit ABC (Vector Lab) utilizando diaminobencidina como sustrato. Al término de la inmunohistoquímica, los

cortes fueron deshidratados en alcohol etílico de 60, 80, 96, 100 %, aclarados con una solución de etanol-xileno y xileno. Las preparaciones fueron cubiertas con un medio de montaje (Cytoseal 60) y un cubreobjetos. Éstas fueron observadas con el objetivo de 40X en un microscopio de luz visible (Nikon ECLIPSE E600®) y fotografiadas con una cámara Olympus a una resolución de 5.1 megapíxeles. Se analizaron cincuenta fibras por músculo para cada una de las conejas.

6.4 Análisis de la expresión del enzima P450 aromatasasa

La disección de los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso se hizo como describieron Martínez-Gómez y cols. (1997). Posterior a su extracción, cada músculo se congeló inmediatamente y fue almacenado a -80°C hasta su procesamiento. El tejido fue homogenado con un homogenizador electrónico en búfer de lisis (0.02M tris HCl pH 7.4, 0.1M NaCl, 0.1M glicina y Tx 0.1%) adicionado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma), 1mM PMSF y 1 mM ditiotreitól. Los homogenados obtenidos fueron centrifugados durante 30 min a 15000g, a 4°C . Se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford. La separación electroforética de las proteínas se realizó utilizando geles de poliacrilamida y dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) de acuerdo al método de Laemmli (1970). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa usando el sistema Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). Las membranas fueron incubadas con una solución de 15% de leche descremada y 0.1% tween-20 en TBS (Tris-HCl pH 7.4, NaCl 150 mM) por 30 min a temperatura ambiente, para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. Las membranas se incubaron durante 16-18 h a 4°C , con el anticuerpo primario (Aromatase Antibody cat. NB100-1596 Novus biologicals) diluido 1:200 en leche descremada al 1% y 0.1% tween-20 en TBS. Después fueron incubadas con el anticuerpo secundario (anti rabbit IgG acoplado a peroxidasa, Santa Cruz Biotechnology) diluido en 1% de leche descremada y 0.1% Tween 20 en TBS, durante 2 h a temperatura ambiente. Las bandas inmunorreactivas se revelaron utilizando un kit de quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico,Pierce) y la exposición de placas radiográficas a las membranas. La expresión de GAPDH se cuantifico como control de expresión en la misma membrana, previa

deshibridación. Se midió mediante densitometría con el programa ImageJ. Los resultados obtenidos fueron expresados en densidad óptica de la banda aromatasa sobre GAPDH para cada uno de los grupos experimentales.

6.5 Análisis de resultados

La comparación de la expresión del enzima P450 aromatasa y el estradiol muscular se hizo mediante un análisis de varianza de una vía. Para identificar las diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre los grupos control, OVX y OVX + BE se utilizó una prueba post-hoc de Tukey-Kramer. En todos los casos se usó el programa de análisis estadístico Prism 4 para Windows (GraphPad).

7. RESULTADOS

7.1 Parámetros morfométricos

En la tabla 1 se muestra el peso de los animales al día de sacrificio y el peso húmedo del útero. Los pesos de los animales fueron similares en los tres grupos (4.68 ± 0.23 vs 4.49 ± 0.14 vs 4.11 ± 0.19 Kg). El peso del útero es menor en el grupo OVX (4.25 ± 0.49 g, $P > 0.05$) respecto a los otros dos grupos experimentales (C 14.58 ± 1.18 , OVX+BE 16.43 ± 1.44 g). El peso del útero fue similar en los grupos C y OVX+BE (14.48 ± 1.18 vs 16.43 ± 1.44 g).

A. Peso de los animales al día del sacrificio

C (kg)	OVX (kg)	OVX+BE (kg)
4.68 ± 0.23	4.49 ± 0.14	4.11 ± 0.19

B. Peso húmedo del útero

C (g)	OVX (g)	OVX+BE (g)
14.58 ± 1.18	$4.25 \pm 0.49^*$	16.43 ± 1.44

Tabla 1. Parámetros morfométricos tomados el día del sacrificio. A) Peso de conejas C, OVX y OVX+BE. B).Peso del útero de conejas C, OVX y OVX+BE. Los datos muestran la media \pm e.e. ANOVA de una vía, post hoc Tukey–Kramer, $P > 0.05$.

7.2 Concentración sérica de estradiol

En la figura 2 se observa que la concentración sérica de E2 para el día del sacrificio fue similar en el grupo OVX (17.82 ± 2.32 pg/mL) y el grupo C (21.14 ± 1.53 pg/mL). La concentración del grupo OVX+BE (160.6 ± 43.03 pg/mL, $P > 0.05$) es mayor que en el grupo C y OVX.

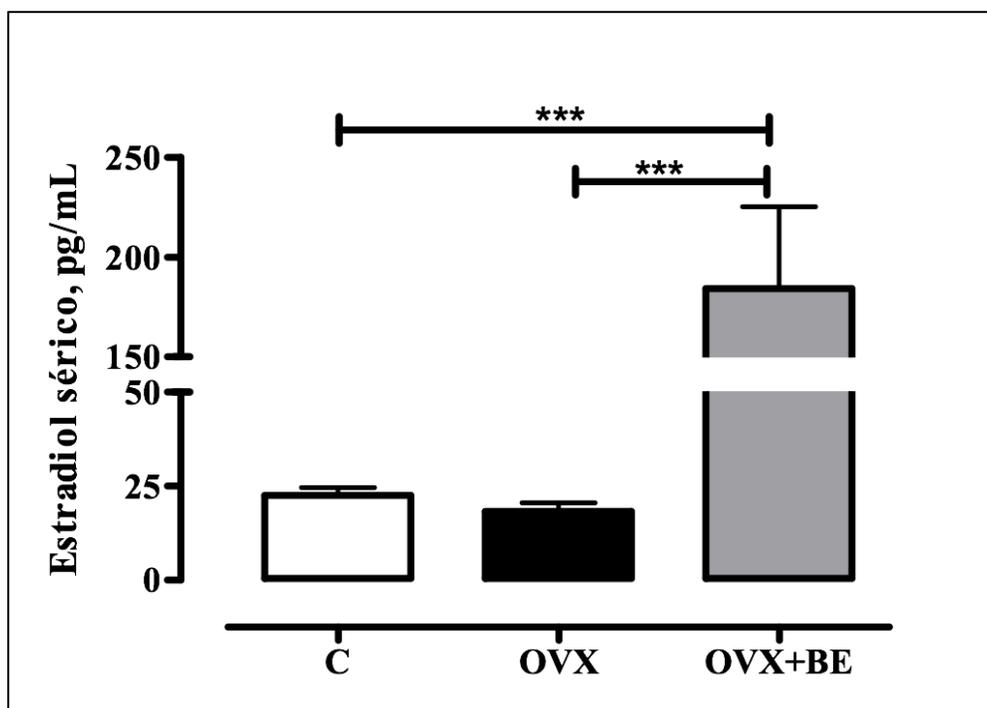


Figura 2. Concentración sérica de estradiol de conejas control (C), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas con restitución de benzoato de estradiol (OVX+BE). Las muestras se obtuvieron el día del sacrificio por punción cardiaca. Las muestras fueron cuantificadas por duplicado. Los datos representan la media \pm e.e. ANOVA de una vía, post hoc Tukey–Kramer, $P > 0.05$.

7.3 Concentración sérica de testosterona

En la figura 3 se observa que los niveles séricos de testosterona disminuyeron en el grupo OVX (74.13 ± 3.22 pg/mL) y OVX+BE (94.93 ± 6.51 pg/mL) con respecto al grupo control (132.8 ± 12.31 pg/mL).

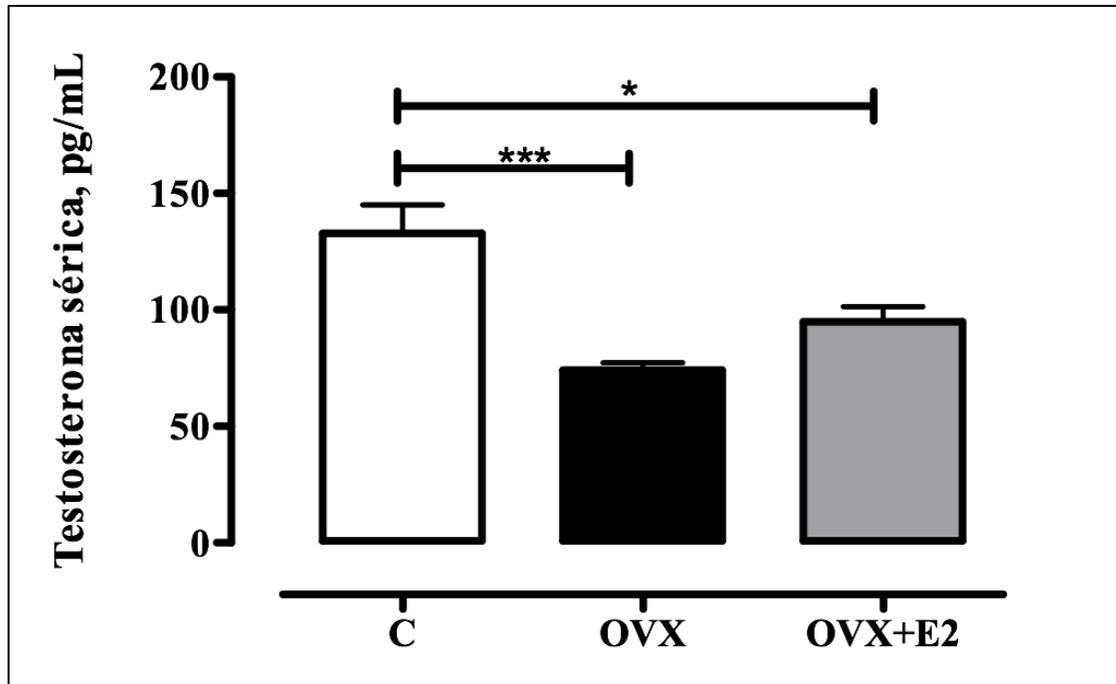


Figura 3. Concentración sérica de testosterona de conejas control (C), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas con restitución de benzoato de estradiol (OVX+BE). Las muestras se obtuvieron el día del sacrificio por punción cardiaca. Las muestras fueron cuantificadas por duplicado. Los datos representan la media \pm e.e.. ANOVA de una vía, post hoc Tukey–Kramer, $P > 0.05$.

7.4 Expresión de receptores α y β en el mPc

La figura 4 muestra que la expresión de núcleos inmunoreactivos anti RE α en el mPc es mayor en el grupo OVX y OVX+BE con respecto al grupo C. Un resultado similar se observó para el número de núcleos inmunorreactivos anti-RE β el grupo OVX y OVX+BE con respecto al grupo C.

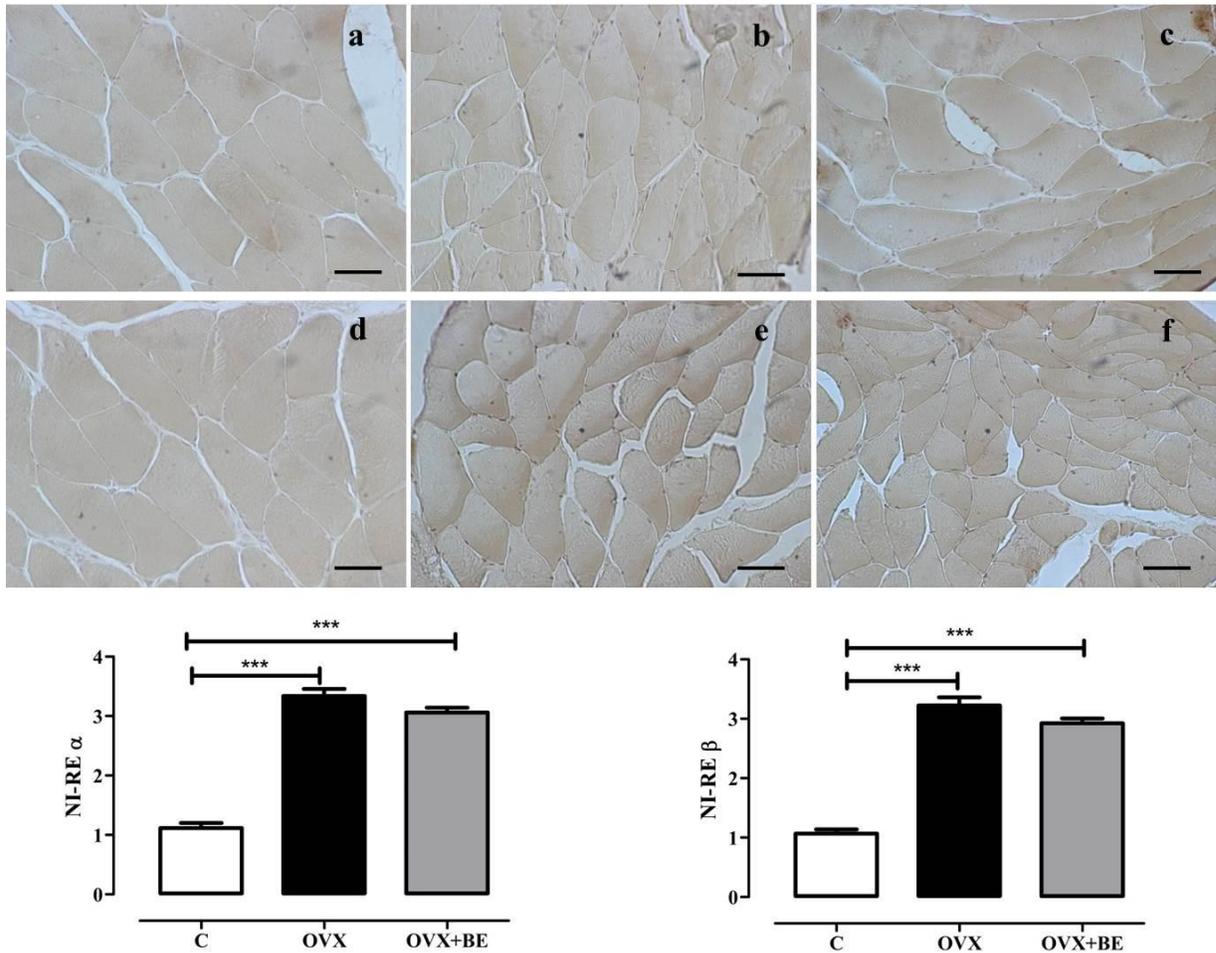


Figura 4. Expresión del receptor de estrógenos (RE) α y β en el mPc de conejas control (C), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas con reemplazo de benzoato de estradiol (OVX+BE). Cortes transversales (7 μ m) de conejas C (A, D), OVX (B, E) y OVX+E2 (C, F). Inmunoreactividad anti-RE- α (A-C) y anti-RE- β (D-F). Escala 50 μ m. Los datos muestran la media \pm e.e. de 50 fibras por coneja. ANOVA de una vía, post hoc Tukey-Kramer, $P > 0.05$.

7.5 Expresión de receptores α y β en el mBe

La expresión de núcleos inmunoreactivos anti RE α y β en el mBe no difiere entre grupos C, OVX y OVX+BE (figura 5).

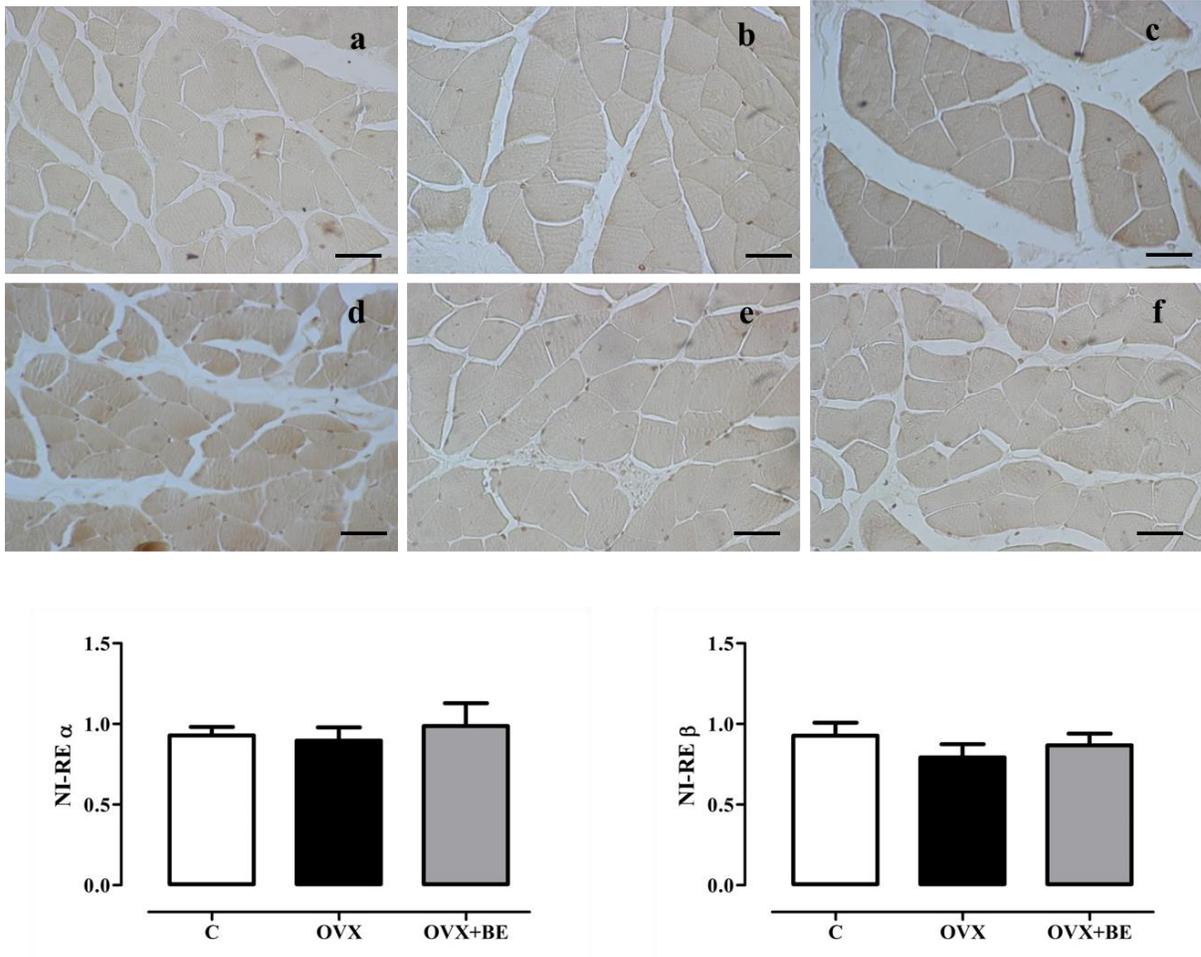


Figura 5. Expresión del receptor de estrógenos (RE) α y β en el mBe de conejas control (C), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas con reemplazo de benzoato de estradiol (OVX+BE). Cortes transversales (7 μ m) de conejas C (A, D), OVX (B, E) y OVX+E2 (C, F). Inmunoreactividad anti-RE- α (A-C) y anti-RE- β (D-F). Escala 50 μ m. Los datos muestran la media \pm e.e. de 50 fibras por coneja. ANOVA de una vía, post hoc Tukey-Kramer, $P > 0.05$.

7.6 Expresión del enzima aromatasa en el mPc y mBe

La expresión del enzima aromatasa es mayor en el mPc vs el mBe el contenido de proteínas en ambos músculos es de 80 μg y del ovario es de 20 μg (Figura 6).

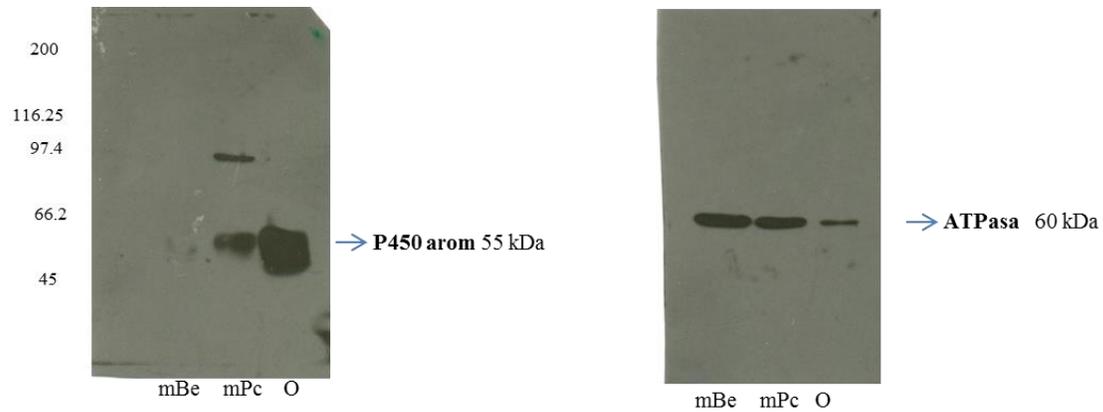


Figura 6. La placa a) muestra la expresión del enzima aromatasa, en el mPc, en el mBe y en el ovario, la placa b) muestra la expresión del enzima ATPasa como control de expresión.

7.7 Expresión del enzima aromatasa en el mPc

En el mPc la expresión del enzima aromatasa en el grupo OVX la expresión del enzima en grupo OVX+BE fue similar al grupo C (figura 7).

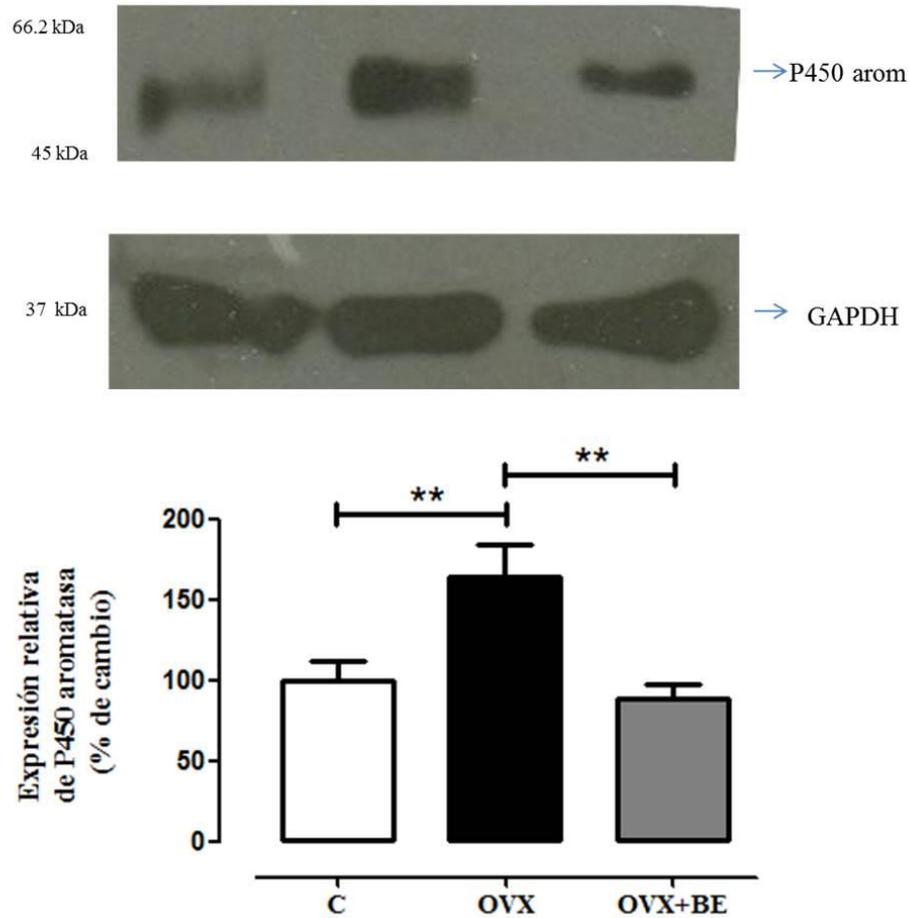


Figura 7. Expresión del enzima aromatasa en el mPc de conejas control (C), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas con reemplazo de benzoato de estradiol (OVX+BE). ANOVA de una vía, post hoc Tukey-Kramer, $P > 0.05$.

7.8 Expresión del enzima aromatasa en el mBe

En el mBe la expresión del enzima aromatasa disminuyó en los grupos OVX y OVX+BE con respecto al grupo C (figura 8).

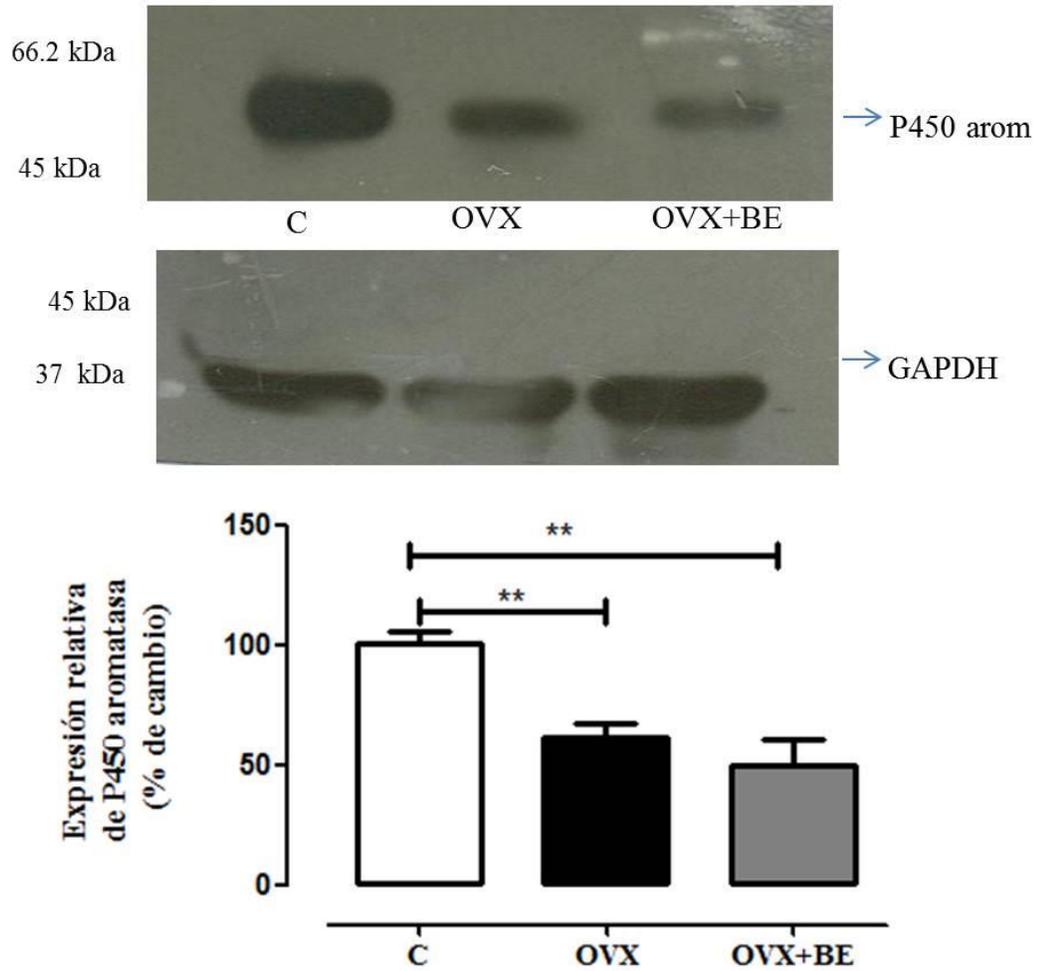


Figura 8. Expresión del enzima aromatasa en el mBe de conejas control (C), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas con reemplazo de benzoato de estradiol (OVX+BE). ANOVA de una vía, *post hoc* Tukey-Kramer, $P > 0.05$.

8. DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis muestran que la concentración sérica de E2 fue similar entre el grupo C y el OVX en el grupo OVX+BE fue mayor que en los anteriores. Se observó una disminución en la concentración sérica de T después de la OVX y el reemplazo con BE no revierte el efecto. La expresión de núcleos inmunoreactivos para ambos subtipos del RE aumentan en los grupos OVX y OVX+BE en el mPc pero no en el mBe, la expresión del enzima P450 aromatasasa es mayor en el mPc vs el mBe, en el mPc la expresión del enzima aumenta 5 meses después de la OVX y el reemplazo con BE revierte tal efecto sin embargo en el mBe la expresión del enzima disminuye con respecto al grupo C. Estos datos sugieren que existe una síntesis local de E2 en el mPc que puede estar actuando de manera autocrina y que pudiera estar influyendo en la expresión de sus receptores no así en el mBe.

8.1 Parámetros morfométricos

El peso corporal de las conejas no difiere entre grupos datos mostrados en la tabla 1 en otros trabajos bajo un modelo de ovariectomía no se encontró diferencias en el peso corporal (Aikawa y col. 2003; Galmiche y col. 2006) a diferencia de lo reportado por trabajos en los que se menciona existe un aumento en gran medida del peso corporal después de haber realizado ovariectomía (Davidge y col. 2000, Shinoda y col. 2006). En el grupo de conejas OVX se observó un aumento de grasa corporal, este aumento se ha reportado constituye una fuente considerable de estrógeno, ya que el tejido adiposo es un tejido periférico capaz de convertir precursores de andrógenos suprarrenales en estrógenos (Simpson y col. 2000 y Zhao y col. 2006).

La menopausia se asocia con una disminución natural de estrógenos. El modelo de OVX conduce a la privación de esteroides gonadales y nos permite conocer los efectos de estas hormonas en sus órganos blanco (Kim y col. 2004). Evidencia de la disminución de las hormonas ováricas es el peso húmedo del útero en la tabla 1 se muestra una atrofia del útero en el grupo OVX que al parecer es revertida con la administración de BE, en la rata se reportó una disminución en el peso del útero después de la OVX efecto que es revertido por

administración de E2 (Davidge y cols 2000; Kim y col. 2004). En esta misma especie Shinoda (2006) reporta una disminución del 67% en el peso del útero y el reemplazo con E2 aumenta el peso respecto al grupo sham. En la mujer, se ha reportado atrofia de útero posterior a la menopausia cambio morfológico asociado con una reducción del 50% en la concentración sérica de E2 (Berman 1999). En mujeres premenopausicas la producción de E2 es de 400g/24h, después de la menopausia disminuye a 6g/24h (Purohit y Reed 2002).

El peso húmedo del útero es evidencia del efecto de los estrógenos sobre sus tejidos blanco. En el útero de la coneja, el reemplazo con BE revierte el efecto de la OVX lo cual indica la importancia de los estrógenos en la fisiología de sus tejidos blanco.

8.2 Concentración sérica de estradiol y testosterona

La mayoría de estudios con animales OVX muestran una disminución muy marcada en la concentración sérica de E2 en especies como la rata hay una disminución de un 63% posterior a la OVX (Kim y col. 2004). Shinoda (2002) reporta que cuatro semanas posteriores a la OVX la concentración sérica de E2 en la rata disminuye en un 27%. En el ratón, Moran (2007) reporta una disminución del 50% en los niveles séricos de E2 60 días después de la cirugía, en la coneja Nueva Zelanda se reportó una disminución del 50% en los niveles séricos de E2 (Sánchez Ortiz y col. 2002) en esta misma especie se muestra que 2, 4 y 6 semanas después de la cirugía hay una disminución del 53%, 33% y 49% respectivamente (Aikawa y col. 2003). Sin embargo nuestros resultados no muestran diferencias entre el grupo C y el grupo OVX (Fig.4). Un factor que influye en nuestros resultados es el tiempo después de haber realizado la OVX ya que los resultados al medir las concentraciones séricas de E2 un mes después muestran una disminución del 55% (datos no mostrados). Kim (2004) reportó que los cambios histológicos promovidos por la OVX se observan de 4 a 8 semanas posteriores a la cirugía. El dato de la disminución de los niveles séricos de E2 posterior a la cirugía sugiere que el tiempo induce un cambio en la síntesis extragonadal que podría estar relacionado con un aumento en la expresión del enzima aromatasa después de la OVX al respecto en especies como la rata se demostró que después de la OVX las concentraciones séricas de E2 aumentan con el paso del tiempo debido al aumento en la expresión del enzima aromatasa en tejidos periféricos (Zhao y col. 2006).

En el grupo OVX+BE hay un aumento de aproximadamente 8 veces en la concentración de E2 sérico con respecto a los otros grupos en nuestra metodología utilizamos una cápsula de 70 mg de benzoato de estradiol durante un periodo de 45 días, el aumento que se observa en el grupo OVX+BE se debe al tiempo y a la dosis utilizada ya que fue una dosis suprafisiológica para conocer el efecto real de los estrógenos. Algo similar sucedió en la coneja Nueva Zelanda donde se usaron pellets con una dosis de 250 mg de E2 y aumento once veces respecto al grupo sham en esta misma especie a diferentes tiempos después de la OVX y con una semana con reemplazo de 1 mg/kg de E2 se observó un aumento 5 veces con respecto al grupo sham (Aikawa y col. 2003). En la rata se ha observado un incremento del doble en la concentración sérica de E2 después de 60 días de tratamiento utilizando una capsula de 1.5 mg de E2 con una liberación de 0.025 mg/día (Shinoda y col. 2002). En el ratón 30 días después del tratamiento con una capsula de 18 mg de E2 los niveles séricos aumentan al doble.

Nuestros resultados muestran que la concentración sérica de testosterona disminuye en el grupo OVX y OVX+BE. En la rata la OVX reduce los niveles séricos de E2 y T, (Zhao 2004; 2006). La T funciona como sustrato del enzima P450 aromatasas, probablemente la disminución en el grupo OVX además de la reducción por la falta de ovarios se deba a que la T este siendo convertida a E2 por acción del enzima P450 aromatasas la cual aumenta después de la OVX en algunos tejidos como el adiposo, (Zhao 2006) la hipófisis (Galmiche y col. 2006) y la glándula mamaria (Thordarson y col. 2001). Por otra parte, la T se convierte en 5 α -dihidrotestosterona (DHT) por acción del enzima 5 α -reductasa y ejerce sus efectos a través de la unión a los receptores de andrógenos (Sato y cols. 2007). Para ejercer acciones biofisiológicas a través de la unión a los receptores de andrógenos, la testosterona se convierte en 5 α -dihidrotestosterona (Brodie y cols. 2001). Zhao (2006) mostró un incremento de E2 después de seis meses de haber realizado la OVX pero las concentraciones séricas de T siguen disminuidas con respecto al grupo C después de este tiempo, similar a lo que sucede en nuestros resultados que muestran una disminución de los niveles séricos de T cinco meses después de la cirugía y se mantienen bajos y los niveles de E2 aumentan 5 meses después de la OVX. Los niveles de globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG) también pueden influir en el efecto biológico de la T y el E2, los esteroides también regulan las concentraciones de SHBG (Shifren y col. 2000). En las mujeres posmenopáusicas, los

cambios en la concentración endógena de andrógenos y estrógenos, afecta la circulación de SHBG y, por lo tanto, las concentraciones de hormonas libres (Castelo y col. 1995).

En el grupo OVX+BE existe una disminución de T debido al efecto de la OVX (Zhao y col. 2004; 2006) ya que el tejido ovárico es la fuente principal de andrógenos y estrógenos. La regulación hormonal de andrógenos y estrógenos se da por retroalimentación negativa en la que altos niveles de T y E2 inhiben la liberación de GnRH. En la rata el reemplazo por 5 días con BE, 21 días después de la OVX disminuye la concentración de GnRH en la pituitaria (Kraser y col. 1993). El aumento del 80 % en los niveles séricos de E2 podría estar actuando en la inhibición de la liberación de GnRH y de esta forma mantener las concentraciones séricas de T disminuidas.

Las variaciones en nuestros resultados en los niveles séricos hormonales probablemente es por nuestro modelo de estudio, la edad de las conejas, el tiempo de OVX y de reemplazo, estos datos sugieren que la coneja tiene una eficiente maquinaria de síntesis extragonadal.

8.3 Expresión de receptores α y β en el mPc y mBe

Existe evidencia que la musculatura pélvica (mPc) y perineal (mBe) de la coneja son blanco directo para los estrógenos porque expresan ambos subtipos del RE (Lopez García y col. 2013). En la coneja doméstica, se ha encontrado que los músculos mPc y el mBe son importantes para la cópula, el parto (Cruz y col. 2002) y la micción (Corona-Quintanilla y col. 2009). La expresión del RE es modulada por la fluctuación hormonal aunque esta puede ocurrir a la alza o a la baja dependiendo del tejido y/o del subtipo de receptor en cuestión (Alonso y col. 2006). El E2 modula de manera diferencial la sensibilidad estrogénica para los mPc y mBe de la coneja (López García 2013).

Los datos presentados en esta tesis muestran que el mPc y el mBe presentan una sensibilidad estrogénica (RE α y RE β) diferente. Ambos músculos son capaces de responder de manera distinta a las variaciones de la concentración sérica de E2 circulante y posiblemente local. La concentración sérica de estradiol no cambió con la OVX crónica pero el número de núcleos inmunoreactivos antireceptor de estrógenos α y β en el mPc aumentó tres veces con respecto al grupo control, no así en el mBe ya que en este músculo no se observó ningún cambio después

de la OVX. Es probable que no solo el E2 sérico esté influyendo sobre la modulación de sus receptores sino aquel que pudiera estar siendo producido en sitios fuera del ovario el que esté involucrado en modular la expresión de sus receptores. Al respecto, Larionov y col. (2003) reportaron que el músculo estriado es capaz de sintetizar E2 mediante una aromatasa misma que podría estar influyendo directamente sobre la modulación de la expresión de sus receptores en éste órgano blanco.

En nuestros resultados mostramos un aumento en la expresión del RE α y del RE β del grupo OVX en el mPc similar a lo que muestra Baltgalvis (2010) en músculo sóleo y en el músculo extensor largo de los dedos (EDL) de ratón, en ambos músculos se observó un incremento de la expresión del RE α después de la OVX en cambio en la expresión del RE β no se muestran diferencias en el músculo sóleo. Asimismo nosotros mostramos un aumento en la expresión del enzima aromatasa este dato sugiere que la modulación de los RE's está determinada por las concentraciones locales, en tumor de mama de rata OVX se encontró un aumento en la expresión del RE α y un aumento en la expresión del enzima aromatasa (Thordarson y col. 2001) otro trabajo en donde se analiza la expresión del RE α y la expresión del enzima aromatasa es el que realizó Dessauge (2009) en cabra donde se utilizó un protocolo de OVX y se mostró una reducción del RE α en la glándula mamaria y al mismo tiempo una reducción en la expresión del enzima aromatasa lo que sugiere que la expresión del enzima aromatasa influye sobre la expresión del RE α , en el mBe no hay un cambio en la expresión de núcleos inmunorreactivos para ambos subtipos del RE en este músculo encontramos una disminución en la expresión del enzima aromatasa en los grupos OVX y OVX+BE esto datos sugieren que en el mBe existe una regulación androgénica.

En la expresión de núcleos inmunorreactivos anti-RE α y β del grupo OVX+BE del mPc se observa un aumento con respecto al grupo control a diferencia de los datos obtenidos por Baltgalvis y col. (2010) ya que sus resultados muestran que en músculos de las extremidades en los cuales después de la ovariectomía se encontró un aumento del RE α al hacer el reemplazo con 17 β -E2 el efecto se revierte y la expresión es similar que en el grupo control sin embargo en el músculo EDL hay una disminución en el grupo con reemplazo de E2 con respecto a los otros grupos. Un resultado a considerar en nuestros datos es el aumento en las concentraciones séricas de E2 ya que son 80% mayores con respecto a los otros grupos y

es probable que las concentraciones tan elevadas en los niveles séricos puedan influir en la expresión de los RE's en este músculo ya que se ha observado que los niveles séricos de E2 influyen en la expresión de los RE's, Wang (2000) mostró que el RE α aumenta durante el proestro y disminuye durante la etapa del metaestro en cambio en el RE β no se observaron cambios, entre los efectos del RE β .

En los mPc y mBe encontramos una diferencia en el metabolismo de las fibras que los componen, el mBe tiene un fenotipo de fibras glucolíticas a diferencia del mPc el cual es considerado con un metabolismo oxidativo (López García, sometido) característica que pudiera estar influyendo sobre la expresión de los RE's. En el músculo el RE α es un regulador positivo de la expresión de GLUT4, mientras que ER β tiene un papel supresor (Barros y cols. 2010). Se observó que durante el ciclo menstrual, existen fluctuaciones en la homeostasis de la glucosa y la diabetes se hace más resistente al tratamiento durante la fase lútea (Case 2001). La resistencia a la insulina se asocia con una disminución de la captación de glucosa en los tejidos sensibles a la insulina entre ellos el tejido esquelético (Capbell 2002). En estos tejidos, la captación de glucosa es mantenida por una de las isoformas del transportador de glucosa familia, GLUT4 (Song 2002). La expresión de genes que codifican para insulina también está influenciada por los niveles de E2. En proestro, cuando se encuentra el pico en los niveles de estrógeno, la expresión de ARNm de insulina se redujo en el páncreas (Morimoto 2001).

En la rata, la OVX reduce la fuerza de contracción muscular y la restitución hormonal la restablece mediante un mecanismo que involucra la fuerza de los enlaces de miosina (Moran y cols. 2006). El patrón de las cadenas pesadas de miosina (MHC) define la velocidad de contracción del músculo esquelético y por lo tanto es un factor importante en la función del músculo esquelético la composición de MHC se ve afectada por los estrógenos y el ejercicio de una manera específica del tipo de fibra y estos efectos están mediados principalmente por ER- β (Velders y col. 2010).

En nuestro grupo de investigación se ha descrito que el mPc está compuesto en su mayoría por fibras lentas (tipo I) y el mBe tiene mayor proporción de fibras de tipo rápido de tipo IIa (intermedias) y IIx (rápidas) (López García sometido). Se ha demostrado que los músculos compuestos en su mayoría por fibras de tipo I presentan una mayor concentración

del RE (Gustafsson y cols. 1984). Esto concuerda con los datos obtenidos en esta tesis en la que se muestra que ambos subtipos del RE tienen una expresión mayor en el mPc con respecto al mBe.

8.4 Expresión del enzima aromatasa en el musculo mPc y mBe

La expresión del enzima aromatasa es mayor en el mPc vs el mBe. Esta diferencia posiblemente se deba al tipo de fibras que componen a cada músculo al respecto. Aizawa (2006) mostró una diferencia en la expresión del enzima aromatasa en músculos de la extremidades constituidos por diferentes tipos de fibras en el músculo soleo (fibras tipo lento) la expresión es mayor en comparación con el plantar (fibras tipo rápido) el tipo de fibras que constituyen al mBe es de tipo rápido (López García sometido) en este músculo la expresión del enzima es menor comparado con el mPc.

La diferencia en la expresión del aromatasa en el mPc y en el mBe posiblemente además del tipo de fibras que componen a cada músculo esté dada a nivel del promotor que codifica para la expresión del gen *cyp19*. Un tejido en el que la regulación sobre la expresión del aromatasa se ve modulada diferencialmente a nivel de los promotores es en el tejido mamario ya que en el tejido normal los niveles de aromatasa se mantienen bajos principalmente a través del promotor I.4 (Agarwal y col. 1996). Sin embargo en el cáncer de mama los aumentos significativos en la actividad del promotor II y I.3 aumentan el ARNm de aromatasa en este este tejido (Zhou y col. 1996). En tumor de mama los promotores I.3 y II son los principales promotores que impulsan la expresión de aromatasa (Tong y Shiuan 1998). Seely (1998) identifico un elemento silenciador (SI) que se encuentra entre los promotores I.3 y II y que regula a la baja la acción de estos promotores. Larionov (2003) mostro que en el tejido muscular el ARNm de la aromatasa se deriva de diferentes promotores, en diversas muestras musculares se mostró la expresión de los promotores I.3, I.4 y II. Es posible que la diferencia en la expresión del enzima aromatasa este regulada diferencialmente dependiendo de la acción de los promotores para regular la expresión del enzima aromatasa ya que existe evidencia que en el músculo esquelético hay expresión I.3, I.4 y II además de mostrar que en tejido de la glándula mamaria la regulación en los niveles de aromatasa es a la

alta o a la baja dependiendo del promotor en cuestión, nosotros sugerimos una regulación diferente dependiendo del promotor que codifica para el gen *cyp19* en el mPc y en el mBe.

Los resultados de esta tesis mostraron que en el mPc hay un aumento en la expresión del enzima aromatasa después de la OVX dato similar a lo que sucede en tejido adiposo (Zhao y col. 2006) en la hipófisis (Galmiche y col. 2006) y en la glándula mamaria (Thordarson y col. 2001). En el grupo OVX+BE la expresión del enzima no muestra diferencias con respecto al grupo control similar a lo que se observa en el trabajo de Galmiche (2006) en el cual se utiliza un tratamiento con E2 y este revierte el efecto en el aumento sobre la expresión del enzima aromatasa en la hipófisis de la rata. La expresión del enzima aromatasa es diferente dependiendo del tejido (Stocco 2008). El valor similar en la concentración de los niveles séricos de E2 entre el grupo C y el OVX sugiere una síntesis de E2 de manera extragonadal en tejidos periféricos, Zhao (2006) mostró un incremento de E2 al igual que un aumento en la expresión del enzima aromatasa en el tejido adiposo misma que sugiere una síntesis extragonadal de E2 en tejidos periféricos. Se ha sugerido que factores como las citoquinas y prostaglandinas participan en la estimulación de la síntesis de estrógenos en tejidos periféricos. Las concentraciones plasmáticas de citoquinas incrementan con el envejecimiento. Es posible que este incremento en los niveles de citoquinas se deba a que el cuerpo está tratando de corregir el déficit de estrógenos que se produce en la menopausia, incrementando así la producción de factores que pueden estimular la síntesis periférica de estrógenos (Purohit y Reed 2002).

La expresión del enzima aromatasa en el mBe disminuye en el grupo OVX y OVX+BE es posible que la regulación en este músculo este bajo el control en las concentraciones de testosterona al respecto se mostró existe un potencial elemento de respuesta a andrógenos (ARE) en el promotor que codifica para *cyp19a1b* (Tong 2003) también se informó que los andrógenos aumentan la expresión de *cyp19a1b* en cerebro de peces y aves mientras tanto en mamíferos se encontraron efectos estimulantes e inhibitorios (Resko. 1997). De hecho, existen datos que indican que los tratamientos con andrógenos o altos niveles circulantes de andrógenos estimulan actividad de la aromatasa y/o su expresión (Abney y col. 1999). Nuestros resultados muestran que las concentraciones en los niveles séricos de testosterona tienen un comportamiento similar a lo que sucede en la expresión del enzima aromatasa en el

mBe además nosotros no observamos cambios en la expresión de núcleos inmunoreactivos de ambos subtipos de los RE's razón por la que nosotros sugerimos en este músculo la regulación en la expresión del enzima podría estar dada por los niveles séricos de T.

8.5 Aporte biomédico

Nosotros utilizamos a la coneja OVX como modelo de estudio para simular las condiciones de una mujer postmenopáusica y de esta forma conocer los efectos en la disminución de los estrógenos sobre un músculo pélvico el mPc y uno perineal el mBe. En mujeres postmenopausicas cuando los niveles séricos de E2 disminuyen se ha reportado existe casos de incontinencia urinaria por esfuerzo (IUE). En la coneja doméstica, se ha encontrado que los músculos mPc y el mBe son importantes para la cópula, el parto (Cruz y cols. 2002) y la micción (Corona-Quintanilla y col. 2009) estos músculos son sensibles a estrógenos y es posible que la disminución en los niveles séricos de E2 influya en esta patología nosotros determinamos la expresión del enzima aromatasasa para saber si en estos músculos podrian funcionar como blancos en terapias de reemplazo hormonal (HRT) al sintetizar de manera local E2 a partir del precursor DHEA, andrógeno secretado por las glándulas suprarrenales el cual funciona como sustrato de E2 y T después de la menopausia el grupo de conejas OVX+BE fue para conocer el efecto directo de los estrógenos en la musculatura pélvica y perineal.

En la rata se ha reportado que la administración de DHEA posterior a la OVX tiene efectos sobre la morfología e histología de órganos reproductivos como útero y vagina. Tal efecto se debe a la transformación local de este metabolito a E2 (Sourla y col. 1998). De la misma forma Labrie (2010) mostró que al utilizar terapia de reemplazo hormonal usando DHEA de manera vaginal la síntesis de estrógenos y andrógenos “formados localmente”, actúan de forma intracelular (localmente), de manera que sólo actúa sobre el epitelio vaginal (Labrie 2010).

Los resultados de esta tesis confirman la participación del tejido muscular en la formación periférica de estrógenos y sugieren que la formación de estrógeno en el músculo puede tener efectos sistémicos y fisiológicos que contribuyen a patologías dependientes de

estrógenos en mujeres post-menopáusicas. El dato en la expresión diferencial del enzima aromatasa sugiere que estos músculos pueden ser utilizados como blancos de terapias hormonales dependiendo de las necesidades en cada músculo utilizando la administración considerando la maquinaria de síntesis local en cada uno.

9. CONCLUSIONES

- a. Los resultados de esta tesis muestran que la ovariectomía crónica en la coneja no afecta los niveles circulantes de estradiol pero si los niveles séricos de testosterona lo que sugiere una síntesis local más que sistémica.
- b. Aún cuando los niveles circulantes de estradiol no cambiaron en conejas ovariectomizadas los RE α y β se modificaron en el mPc.
- c. El incremento en el enzima aromatasa y el aumento en los RE α y β apoyan la idea de una síntesis local de E2 en el mPc.
- d. La disminución del enzima aromatasa y la expresión similar de los RE α y β en el mBe sugiere una regulación androgénica en este músculo.
- e. La expresión diferente en los músculos pobococcigeo y bulboesponjoso muestran evidencia que pueden ser blancos para tratamientos relacionados con la disfunción del piso pélvico.

10. PERSPECTIVAS

Los resultados del presente trabajo mostraron información sobre un posible mecanismo de regulación local en el mPc y en el mBe idea que se surge debido a la expresión del enzima aromatasa en estos músculos y al aumento en los niveles séricos de E2 posterior a 5 meses de OVX, además del cambio en la modulación de los RE's. Al mismo tiempo que esta información permite contestar algunas preguntas, también genera nuevas dudas que se podrían abordarse considerando otras variables como:

- a. Utilizar tiempos más cortos de OVX para conocer el efecto sobre la histología de los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso cuando los niveles séricos de E2 se encuentran disminuidos.
- b. Evaluar la participación de otras hormonas esteroideas sobre la organización histológica de los músculos utilizando reemplazo con T o DHT además de esta forma también determinar si la T se aromatiza a E2 o es metabolizada a DHT ya que este metabolito de la T no es aromatizable.
- c. En el mPc y en el mBe determinar la expresión de los enzimas 3- β HSD, 17- β HSD y aromatasa, enzimas responsables de sintetizar la DHEA a T y a E2.
- d. Evaluar la expresión del receptor de andrógenos (RA) en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso para conocer si en los músculos existe un impacto de andrógenos.
- e. Evaluar la regulación de los promotores I.3, I.4 y II que codifican para el gen cyp19 en los músculos.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abney O. (1999) The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: a review, *Steroids* 64 610–617.

Agarwal VR, Bulun SE, Leitch M, Rohrich R, Simpson ER. (1996). Use of alternative promoters to express the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in breast adipose tissues of cancer-free and breast cancer patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*

Aikawa K, Sujino T, Matsumoto S, Chichester P, Whitbeck C and Levin RM (2003). The effect of ovariectomy and estradiol on rabbit bladder smooth muscle contraction and morphology . *J Urol* **170**: 634-637.

Aizawa K, Motoyuki I, Takeshi O, Maeda S, Takashi M, y Noboru M.(2008) Sex differences in steroidogenesis in skeletal muscle following a single bout of exercise in rats. *J Appl Physiol* 104: 67–74.

Aizawa K, Motoyuki I, Takeshi O, Maeda S, Takashi M. y Noboru M.(2006).Expression of steroidogenic enzymes and synthesis of sex steroid hormones from DHEA in skeletal muscle of rats. *J Physiol Endocrinol Metab* 292: E577–E584.

Alonso A, Fernández R, Ordoñez P, Moreno M, Patterson AM y González C. (2006). Regulation of estrogen receptor alpha by estradiol in pregnant and estradiol treated rats. *Steroids* 71: M1052-1061.

Baltgalvis KA, Greising SM, Warren GL, Lowe DA (2010). Estrogen Regulates Estrogen Receptors and Antioxidant Gene Expression in Mouse Skeletal Muscle. *Plos ONE* 5(4): e10164. Doi:10.1371/journal.pone.0010164.

Berman JR, Berman LA, Werbin TJ, Flaherty EE, Leahy NM and Goldstein I (1999). Clinical evaluation of female sexual function: effects of age and estrogen status on subjective and physiologic sexual responses. *Int J Impot Res* 11(1): 31-38.

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

Bridges RS y Byrnes EM. (2006). Reproductive experience reduces circulating 17- β estradiol and prolactin levels during proestrus and alters estrogen sensitivity in female rats. *Endocrinology* 147(5): 2575-2582.

Brodie A, Inkster S, Yue W (2001). Aromatase expression in the human male. *Mol Cell Endocrinol* 178: 23–28.

Brown M. (2008). Skeletal muscle and bone: effect of sex steroids and aging. *Adv Physiol Educ* 32: 120-126.

Bulun SE, Lin Z, Imir G, Amin S, Demura M, Yilmaz B, Martin R, Utsunomiya H, Thung S, Gurates B, Tamura M, Langoi D, Deb S (2005). Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacological reviews*, 57(3):359-383.

Campbell SE y Febbraio MA (2002;). Effect of the ovarian hormones on GLUT4 expression and contraction-stimulated glucose uptake. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 282:E1139–E1146.

Case, A. M. y Reid, R. L. (2001). Fluctuations in glucose homeostasis are observed during the menstrual cycle, and diabetes becomes more resistant to treatment during the luteal phase (1). *Compr. Ther.* 27, 65–71.

Castelo-Branco C, Martinez de Osaba M, Fortuny A, Iglesias X, Gonzalez-Merlo J (1995). Circulating hormone levels in menopausal women receiving different hormone replacement therapy. *J Reprod Med*;40: 556.

Campbell CSG, Caperuto LC, Hirata AE, Araujo EP, Velloso LA, Saad MJ, Carvalho CRO (2004) The phosphatidylinositol/AKT/atypical PKC pathway is involved in the improved insulin sensitivity by DHEA in muscle and liver of rats in vivo. *Life Sci* 76: 57–70.

Conley A, Hinshelwood M. (2001). Mammalian aromatases. *Reproduction*. 121: 685- 695.

Cornelia Voigt, Gregory F. Ball , Balthazart J (2011). Effects of sex steroids on aromatase mRNA expression in the male and female quail brain, *General and Comparative Endocrinology* 170 180–188.

Corona-Quintanilla DL, Castelán F, Fajardo V, Manzo J y Martínez-Gómez M. (2009) Temporal coordination of pelvic and perineal striated-muscle activity during micturition in female rabbits. *The Journal of Urology* Vol. 181: 1452-1458.

Cruz M, Canario AVM (2000). cDNA cloning and expression of brain and ovary aromatase in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. 6th International Symposium on the reproductive physiology of fish. (Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E, Stefansson SO, eds.) Pub. Univ. Bergen (Norway). p 193.

Cruz Y, Hudson R, Pacheco P, Lucio RA y Martínez-Gómez M (2002). Anatomical and physiological characteristics of perineal muscles in the female rabbit. *Physiol Behav* 75(1-2): 33-40.

Cuppone F, Bria E, Verma S, Pritchard K, Gandhi S, Carlini P (2008). Do adjuvant aromatase inhibitors increase the cardiovascular risk in postmenopausal women with early breast cancer? Meta-analysis of randomized trials. *Cancer*.;112:260-7

Davidge S, Yunlong Z, y Stewart Ken G (2001). A comparison of ovariectomy models for estrogen studies. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 280: R904–R907.

Dessaugue F, Finot L, Wiart S, Aubry J. M Ellis S (2009). Effects Of Ovariectomy In Prepubertal Goats. *Journal Of Physiology And Pharmacology* 2009, 60, Suppl 3, .127-133.

Dominguez R, Flores A, Cruz Morales S (2012). Hormonal and Neural Mechanisms Regulating Hormone Steroids Secretion. *Steroids - Basic Science* ISBN 978-953-307-866-3.

Fitzpatrick SL, Richards JS (1993) Cis-acting elements of the rat aromatase promoter required for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate induction in ovarian granulosa cells and constitutive expression in R2C Leydig cells. *Mol Endocrinol*;7:341–54.

Fitzpatrick SL, Richards JS (1994). Identification of a cyclic adenosine 3'5' monophosphate-response element in the rat aromatase promoter that is required for transcriptional activation in rat granulosa cells and R2C leydig cells. *Mol Endocrinol*;8:1309–19.

Galmiche G, Corvaisier S, Kottler ML (2006). Aromatase gene expression and regulation in the female rat pituitary. *Ann N Y Acad Sci.* 1070:286-92.

Glenmark B, Nilsson M, Gao H, Gustafsson JA, Dahlman-Wright K, Westerblad H (2004) Difference in skeletal muscle function in males vs. females: role of estrogen receptor-_. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E1125–E1131.

Gorzek JF, Hendrickson KC, Forstner JP, Rixen JL, Moran AL, Lowe DA (2007). Estradiol and tamoxifen reverse ovariectomy-induced physical inactivity.

González Mariscal G, Díaz-Sánchez V, Melo AI, Beyer C y Rosenblatt JS (1994). Maternal behavior in New Zealand white rabbits: quantification of some events, motor patterns, and steroid plasma levels. *Physiol Behav* 55: 1081-9.

Grana G. (2006) Adjuvant aromatase inhibitor therapy for early breast cancer. A review of the most recent data. *J Surg Oncol.*;93:585-92

Hextall A (2000). Oestrogens and lower urinary tract function. *Maturitas* **36**(2): 83-92.

Kamat A, Hinshelwood MM, Murry BA, Mendelson CR (2002). Mechanisms in tissue-specific regulation of estrogen biosynthesis in humans. *Trends Endocrinol Metab.*;13(3):122-8.

Katalin M y Zdenek D (2011). Steroid Regulation of Drug-Metabolizing Cytochromes P450. *Current Drug Metabolism.*, 12, 154-172.

Katzenellenbogen BS, Choi I, Delage-mourroux R, Ediger TR, Martini PGV, Montano M, Sun J, Weis K, Katzenellenbogen JA (2000). Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 74: 279–285.

Kazi AA, y Koos RD (2007) Estrogen-induced activation of hypoxia-inducible factor 1 α , vascular endothelial growth factor expression, and edema in the uterus are mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Endocrinology* ,148(5):2363-2374.

Kim NN, Min K, Pessina MA, Munarriz M, Goldstein Y and Traish AM (2004). Effects of ovariectomy and steroid hormones on vaginal smooth muscle contractility. *Int J Impot. Res* 16: 43-50.

Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 95(26):15677-15682

Labrie F (2004). Adrenal androgens and intracrinology. *Semin Reprod Med* 22: 299–309.

Labrie F, Belanger A, Simard J, Van Luu-The, Labrie C (1995). DHEA and peripheral androgen and estrogen formation: Intracrinology. *Ann NY Acad Sci* 774: 16–28.

Labrie F, Luu V, Bélanger A, S-X Lin, Simard J, G Pelletier and Labrie C. (2005). Is dehydroepiandrosterone a hormone?. STARLING REVIEW.

Larionov AA, Vasyliiev DA, Mason JI, Howie AF, Bernstein LM y Millyer WR. (2003). Aromatase in skeletal muscle. *Journal of Steroid Biochemistr & Molecular. Biology* 84: 485-492.

Lee SJ y McEwen BS. (2001). Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41: 569-91.

López García K, Cuevas E, Corona Quintanilla DL, Jiménez Estrada I, Martínez Gómez M, Castelán F. (2013) Effect of multiparity on morphometry and oestrogen receptor expression of pelvic and perineal striated muscles in rabbits:Is serum oestradiol relevant?. *European Journal of obstetrics and gynecology and reproductive.Do Biology*, Doi: 10.1016/j.ejogrb.2013,03.032.

López Garcá K, Mariscal Tovar S, Martínez Gómez M, Jimenez Estrada I, Castelan f (enviado) Fiber type characterization of essential muscles for micturition in does. *Muscle & Nerve*.

Loren Winters, Habin k, RN, and Gallagher J (2007). Aromatase Inhibitors and Musculoskeletal Pain in Patients With Breast Cancer. *Clinical Journal of Oncology Nursing or the Oncology Nursing Society*.

Martínez Gómez, Lucio RA, Carro M, Pacheco P y Hudson R (1997). Striated muscles and scent glands associated with the vaginal tract of the Rabbit. *Anat Rec* 247: 486-493.

Matt DW, Lee J, Sarver PL, Judd HI y Lu JKH. (1986). Chronological changes in fertility, fecundity and steroid hormone secretion during consecutive pregnancies in ageing rats. *Biol Reprod.* 34: 478-487.

McClung JM, Davis JM, Wilson MA, Goldsmith y Carson JA (2006). Estrogen status and skeletal muscle recovery from disuse atrophy. *Appl Physiol.* 100: 2012-2023.

McCormick KM, Burns KL, Piccone CM, Gosselin LE & Brazeau GA (2004) Effects of ovariectomy and estrogen on skeletal muscle function in growing rats. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 25 21–27.

Means GD, Kilgore MW, Mahendroo MS, Mendelson CR, Simpson ER. (1991). Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human ovary and fetal tissues. *Mol. Endocrinol.* 5:2005–13.

Meikle AW, Daynes RA, Araneo BA (1991) Adrenal androgen secretion and biologic effects. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 20:381-400.

Miralles-Rull I y Puig-Conillera M (2005). *Biomecánica clínica de los tejidos y las articulaciones del aparato locomotor*. 2ed. Elsevier, España.

Moran AL, Nelson SA, Landisch RM, Warren GL y Lowe DA. (2007). Estradiol replacement reverses ovariectomy-induced muscle contractile and myosin dysfunction in mature female mice. *J Appl Physiol* 102: 1387-1393.

Moran AL, Warren GL y Lowe DA. (2006). Removal of ovarian hormones from mature mice detrimentally affects muscle contractile function and myosin structural distribution. *J Appl Physiol* 100: 548-559.

Morimoto, S, Cerbon, M. A, Alvarez-Alvarez, A, Romero-Navarro, G y Diaz-Sanchez, V. (2001). Insulin gene expression pattern in rat pancreas during the estrous cycle *Life Sci.* 68, 2979–2985.

Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S (2007). Estrogen Prevents Bone Loss via Estrogen Receptor alpha and Induction of Fas Ligand in Osteoclasts. *Cell* , 130(5):811-823.

Nakamura J, Aberdeen Lu, G, Albrecht E y. Brodie A.(1999).The Effect of Estrogen on Aromatase and Vascular Endothelial Growth Factor Messenger Ribonucleic Acid in the Normal Nonhuman Primate Mammary Gland* Departments of Pharmacology and Experimental Therapeutics and Obstetrics and Gynecology (G.A., E.A.), University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland 21201.

Nemoto Y, Toda K, Ono M, Fujikawa- Adachi K, Saibara T.(2000). Altered expression of fatty acid metabolizing enzymes in aromatase-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 105:1819–25

Netter FH (2002). Sistema reproductor. Colección Netter de ilustraciones médicas. vol.2. Elsevier, España.

Nussey S, Whitehead S (2001). *Endocrinology: un acercamiento integrado.* Oxford. Londres. Págs. 252.

O'Lone R, Knorr K, Jaffe IZ, Schaffer ME, Martini PG, Karas RH, Bienkowska J, Mendelsohn ME, Hansen U (2007).Estrogen receptors alpha and beta mediate distinct pathways of vascular gene expression, including genes involved in mitochondrial electron transport and generation of reactive oxygen species.*Mol Endocrinol* 21(6):1281-1296.

Payne Anita H. And. Hales Dale B (2004).Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones. *Endocrine Reviews* 25(6):947–970

Pérez CA, Concha A., Hernández M. EL, Manzo TJ (2005). Influence of the paraventricular nucleus and oxytocin on the retrograde stain of pubococcygeus muscle motoneurons in male rats. *Brain Research* 1041 11– 18

Phillips SK, Rook KM., Siddle, NC y Bruce SA (1993). Muscle weakness in women occurs at an earlier age than in men, but strength is preserved by hormone replacement therapy. *Clin. Sci.* 84, 95±98.

Porter TD. (1991). An unusual yet strongly conserved flavoprotein in bacteria and mammals. *Trends Biochem. Sci.* 16: 154-158.

Pronsato L, Ronda AC, Milanesi L, Vasconsuelo A, Boland R *(2010). Protective Role Of 17 -Estradiol And Testosterone In Apoptosis Of Skeletal Muscle Actual. *Osteol* 6(2): 65-80.

Purohit A y Reed MJ (2002). Regulation of estrogen synthesis in postmenopausal women. *Steroids* 67: 979-983.

Resko C.E, Roselli, J.A,(1997). Sex differences in androgen-regulated expression of cytochrome P450 aromatase in the rat brain, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 61 365–374.

Sánchez Ortiz R, Wang Z, Menon C, Disanto M, y Chacko S (2001). Estrogen modulates the expression of myosin heavy chain in detrusor smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C433–C440.

Sanoja R y Cervero F (2008). Estrogen modulation of ovariectomy-induced hyperalgesia in adult mice. *J pain* 12: 573-581.

Sato K, Iemitsu M, Aizawa K., y Ajisaka R. (2008). Testosterone and DHEA activate the glucose metabolism-related signaling pathway in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E961–E968.

Seely J, Amigh KS, Suzuki T, Mayhew B, Sasano H, Giguere V, Laganieri J, Carr BR y Rainey WE (2005). Transcriptional regulation of dehydroepiandrosterone sulfotransferase (SULT2A1) by estrogen-related receptor alpha. *Endocrinology* 146 3605–3613

Shinoda M, Latour MG and Lavoie JM (2002). Effects of physical on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *Int J Ob* 26: 335-343.

Silandre D, Delalande C, Durand P, Carreau S (2007) Three promoters PII, PI.f, and PI.tr direct the expression of aromatase (cyp19) gene in male rat germ cells. *J Mol Endocrinol.* 39(2):169-81.

Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, Bendelson CR, Bulun SE (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.* 15: 342-355.

Simpson ER, y Davis S. R. (2001) Minireview: Aromatase and the Regulation of Estrogen Biosynthesis—Some New Perspectives. *Endocrinology* 142(11):4589–4594

Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson KM, Britt K, Speed C, Jones M (2002) Aromatase: a brief overview. *Annu Rev Physiol* 64:93–127.

Song X, Fiedler M, Galuska D, Ryder J, Fernstrom M, Chibalian A, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. (2002). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside treatment improves glucose homeostasis in insulin resistant diabetic (ob/ob) mice. *Diabetologia* 45: 56–65.

Sorensen MB, Rosenfalck AM, Hojgaard L & Ottesen B (2001). Obesity and sarcopenia after menopause are reversed by sex hormone replacement therapy. *Obesity Research* 9 622–626.

Sourla A, Flamand M, Belanger A and Labrie F (1998). Effect of dehydroepiandrosterone on vaginal and uterine histomorphology in the rat. *Steroid Biochem Molec Biol* 66(3): 137-149.

Stein RA, McDonnell DP.(2006)Estrogen-related receptor alpha as a therapeutic target in cancer. *Endocr Relat Cancer*; 13 Suppl 1: S25-S32.

Stocco, C (2008). Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *Steroid*, Vol.73 , No.5, (May 2008), pp.473-478 , ISSN 0039-128x.

Thordarson G, Lee AV, McCarty M, Horn VK, Chu O, Chou YC, Yang J, Guzman RC, Nandi S and Talamantes F (2001). Growth and characterization of N-methyl-N nitrosourea-induced mammary tumors in intact and ovariectomized rats. *Carcinogen* 22 (12): 2039- 2047.

Tong SK, Chung BC. Analysis of zebrafish cyp19 promoters. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 86:381–386.

Treesguerras J y Castillo C (2005) *Fisiología General y Celular. Fisiología del eje hipotálamo-hipofisis-ovarico*. Cap. 79. Edit. McGraw-Hill.pag. 1007-1023.

Ubilla E y Rebollar PG (1995). Influence of the postpartum day on plasma estradiol 17- β levels, sexual behaviour, and conception rate, in artificially inseminated lactating rabbits. *Anim Reprod Sci* 38: 337-44.

Velders M, Solzbacher M, Schleipen B, Laudénbach U, Fritzemeier K.H, Diela P(2010). Estradiol and genistein antagonize the ovariectomy effects on skeletal muscle myosin heavy chain expression via ER- β -mediated pathways *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 120 (2010) 53–59.

Wang, H, Eriksson, H y Sahlin, L (2000). Estrogen receptors α and β in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, Vol. 63, No.5, (November 1, 2000), pp. 1331–1340, ISSN 1529-726.

Wang. J y Chen, S (1992). Identification of a promoter and a silencer at the 3'-end of the first intron of the human aromatase gene. *Mol. Endocrinol.* 6: 1479-1488.

Yang C, Zhou DJ y Chen S (1998). Modulation of aromatase expression in the breast tissue by ERR alpha-1 orphan receptor. *Cancer Research* 58 5695–5700.

Zhao H, Zhanzhuang T., Cheng L. y Chen B (2004). Electroacupuncture enhances extragonadal aromatization in ovariectomized rats. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4, 2:18.

Zhou C, Zhou D, Esteban J, Murai J, Siiteri PK, Wilczynski S, Chen S (1996). Aromatase gene expression and its exon I usage in human breast tumors. Detection of aromatase messenger RNA by reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **59**: 163–171.

Zhao H, Zhanzhuang T., Junwei H. and Chen B (2005). Extragonadal aromatization increases with time after ovariectomy in rats. *Reproductive Biology and Endocrinology* , 3:6 doi:10.1186/1477-7827-3-6.

12. ABREVIATURAS

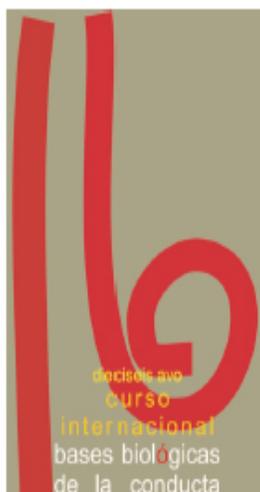
ArKO	Ratones knockout de aromatasa
AMPc	Adenosín Monofosfato cíclico
AUI	Aparato urogenital inferior
BE	Benzoato de estradiol
C	Control
DHEA	Dehidroepiandosterona
DHEA-S	Sulfato de dehidroepiandosterona
EDL	Músculo extensor largo de los dedos
E2	Estradiol
FSH	Hormona Folículo Estimulante
HSP27	Proteína de choque térmico 27
GLUT 4	Transportador de glucosa tipo 4
MAPKS	Proteínas Kinasas activadas por mitógenos
mBe	Músculo bulboesponjoso
mPc	Músculo pubococcigeo
OVX	Ovariectomía y/o ovariectomizadas
OVX+BE	Ovariectomizadas mas reemplazo con benzoato de estradiol
PI3K	Fosfoinositol 3-Quinasa
PKA	Proteína Kinasa A
RE	Receptores a estrógenos
SHBG	Globulina fijadora de hormonas sexuales
T	Testosterona
3 β -HSD	3 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa
17 β -HSD	17 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa

13. PUBLICACIONES

Los resultados de esta tesis se organizaron para su presentación en congresos nacionales:

Carrasco Ruiz MA, López García K, Nicolás Toledo, Martínez Gómez y Castelán F. Expresión del enzima aromatasa en los músculos estriados pubococcigeo y bulboesponjoso de conejas intactas, ovariectomizadas y ovariectomizadas tratadas con benzoato de estradiol. XVI Curso Internacional Bases biológicas de la conducta. Tlaxcala, Tlax. 2011.

Carrasco Ruiz MA, García Villamar V, López García K, Sánchez García O, Nicolás L, Cuevas E, Pacheco P, Jiménez Estrada I, Martínez Gómez M, Castelán F. Relación entre la síntesis local de estrógenos y sensibilidad estrógenica en el músculo pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja. XXXVIII Reunión Nacional del AIBIR. Cholula, Puebla 2013.



Expresión del enzima aromatasa en los músculos estriados pubocóccigeo y bulboesponjoso de conejas intactas, ovariectomizadas y ovariectomizadas tratadas con benzoato de estradiol

María de los Ángeles Carrasco Ruiz¹, Kenia López García², Margarita Martínez Gómez^{3, 4} y Francisco Castelán⁴

¹Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx);

²Doctorado en Neuroetología, Universidad Veracruzana;

³Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM;

⁴Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, UATx.

La musculatura estriada pélvica y la perineal participan en conductas reproductivas y de micción. En la coneja hemos encontrado que la ovariectomía crónica (OVX) reduce el área transversal de la fibra e incrementa el número de mionúcleos periféricos de un músculo pélvico, el pubococcigeo (mPc); estas variables no se modifican en uno perineal como el bulboesponjoso (mBe). El tratamiento con benzoato de estradiol (BE) no fue efectivo para revertir los efectos sobre el mPc. Debido a que la concentración sérica de estradiol (E2) del grupo con OVX fue similar a la del grupo control, suponemos que la OVX pudo haber influido sobre la sensibilidad (expresión de subtipos del receptor de estrógenos) y/o síntesis estrogénica en el mPc pero no en el mBe. El enzima aromatasa (*CYP19*) limita la síntesis de estrógenos a partir de testosterona. Considerando que este enzima se expresa en la musculatura estriada, el objetivo de este proyecto es cuantificar la expresión del *CYP19* en el mPc y el mBe de conejas intactas (C), OVX y OVX+BE. Con tal fin se utilizarán conejas de seis meses de edad a las que se extirparán ambos ovarios. Catorce semanas después se les realizará otra cirugía para implantar cápsulas porosas vacías (OVX) o conteniendo BE (OVX+BE). Después de seis semanas, los animales serán sacrificados y se obtendrán los músculos mPc y mBe; los del grupo C, cuando tengan la misma edad que la de los otros grupos. La expresión del *CYP19* se cuantificará mediante Western blot. Los datos obtenidos serán analizados con una ANDEVA de una vía seguido de una prueba *post-hoc* de Tukey Kramer.

Con financiamiento de PROMEP-SEP (UATLX-PTC-109 a FC) y PAPIIT-UNAM (228110 a MMG); y becas CONACYT a MACR (261596) y KLG (218156).

Relación entre la síntesis local de estrógenos y sensibilidad estrógena en el músculo pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja

Carrasco Ruiz MA¹, García Villamar V¹, López García K², Sánchez García O², Nicolás L³, Cuevas E³, Pacheco P³, Jiménez Estrada I⁴, Martínez Gómez M^{3,5}, Castelán F⁵



¹Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx); ²Doctorado en Neuroetología, Universidad Veracruzana; ³Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; ⁴Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV; ⁵Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, UATx

Durante la menopausia, la concentración sérica de estrógenos se ve disminuida. En esta etapa, la concentración de estas hormonas se mantiene principalmente por síntesis en tejidos periféricos. La musculatura estriada es uno de los tejidos periféricos capaz de sintetizar estrógenos por acción de enzimas esteroidogénicas. Se ha demostrado que los estrógenos son importantes para el aparato urogenital inferior y la musculatura del piso pélvico. Esta musculatura estriada, pélvica y perineal, es determinante para la fisiología del aparato urogenital femenino en el humano y varias especies de mamíferos. En este contexto, conocer si en un músculo del piso pélvico como el pubococcígeo (mPc) y en uno perineal como el bulboesponjoso (mBe) existe síntesis de estradiol (E2) sería de gran relevancia para determinar si pueden funcionar como órganos blanco durante la aplicación de terapias hormonales en mujeres. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la reducción de hormonas esteroideas sobre la expresión del enzima aromatasa y los receptores de estrógenos en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso. Se utilizaron 18 conejas divididas en 3 grupos: control (C) y ovariectomizadas (OVX) por 3.5 meses, y suplementadas (OVX+BE) o no con benzoato de estradiol durante 1.5 meses. La concentración sérica de E2 y testosterona se cuantificó mediante ELISA. La expresión de ambos subtipos de receptores de estrógenos (RE) se realizó por inmunohistoquímica y la expresión del enzima aromatasa se realizó por Western Blot. Los resultados mostraron que la concentración de E2 fue similar entre los grupos C y OVX; la del OVX+BE fue mayor que ambos. La concentración de testosterona disminuyó en los grupos OVX y OVX+BE, los RE aumentaron en el mPc después de la ovariectomía y el reemplazo con BE no revirtió tal efecto en el mBe no hubo cambios. El análisis en la expresión de aromatasa mostró aumento en el mPc y el reemplazo con BE revirtió tal efecto, en el mBe la expresión de aromatasa disminuyó en los grupos OVX y OVX+BE. En conclusión la expresión diferente en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso muestran evidencia que pueden ser blancos para tratamientos relacionados con la disfunción del piso pélvico.

Financiamiento de PROMEP-SEP (UATLX-PTC-109 a FC) y CONACYT (105882 a MMG); y becas CONACYT a MACR (261596) y KLG (218156).

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE TLAXCALA DIRECTORIO

Dr. Víctor Job Paredes Cuahquentzi
Rector

Mtro. René Elizalde Salazar
Secretario Académico

Mtra. Dora Juárez Ortiz
Secretaria de Investigación Científica y
Posgrado

Mtro. Efraín Ortiz Linares
Secretario de Extensión universitaria y Difusión
Cultural

Mtro. Rubén Reyes Córdova
Secretario Administrativo

Dr. Sergio Eduardo Algarra Cerezo
Secretario Técnico

Mtro. Mauro Sánchez Ibarra
Secretario de Autorrealización

Mtro. Adolfo Cuevas Sánchez
Coordinación de la División de Ciencias
Biológicas

Mtra. Samantha Viñas Landa
División de Ciencias y Humanidades

Mtro. Marlon Luna Sánchez
División de Ciencias Básicas, Ingeniería y
Tecnología

Dra. Margarita Martínez Gómez
Coordinadora del Centro Tlaxcala de Biología
de la Conducta

M. C. Antonio Durante Murillo
Coordinador General de Cuerpos Académicos