



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Expresión del receptor de estrógenos GPR30 en los
músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de
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

Sharet Yolisma Rodríguez Jaimes

C o d i r e c t o r e s

Dr. Francisco Castelán

Dr. Jorge Rodríguez Antolín

Tlaxcala, Tlax.

Agosto 2018



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Expresión del receptor de estrógenos GPR30 en los
músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de 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

Sharet Yolisma Rodríguez Jaimes

C o m i t é T u t o r a l

Dr. Francisco Castelán

Dr. Jorge Rodríguez Antolín

Dra. Esterla Cuevas Romero

Dr. Pablo Pacheco Cabrera

Tlaxcala, Tlax.

Agosto 2018

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Francisco Castelán el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Foránea del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El comité tutorial estuvo integrado por los Dres. Estela Cuevas Romero, Pablo Pacheco Cabrera y Jorge Rodríguez Antolín. La asistencia técnica brindada por el Biol. Exp. Jesús Ramsés Chávez Ríos y la Q.F.B Laura García Rivera fue fundamental para la realización de esta tesis.

Se contó con financiamiento de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico-UNAM (PAPIIT-IA203617 a FC) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante un donativo de apoyo a infraestructura (225126 al Cuerpo Académico de Fisiología del Comportamiento) y una beca para estudios de maestría (781480 a SYRJ).



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado
Posgrado en Ciencias Biológicas



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 **Sharet Yolisma Rodríguez Jaimes** 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: **“Expresión del receptor GPR30 en los músculos bulboesponjoso y pubococcígeo de la coneja”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., JULIO 13 DE 2018

DR. PABLO PACHECO CABRERA

DR. JORGE RODRÍGUEZ ANTOLÍN

DR. MIGUEL ÁNGEL LARA GARCÍA

DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO

DR. FRANCISCO CASTELÁN



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala Biología de la Conducta, por brindarme la oportunidad de seguir creciendo profesionalmente y a las personas que con su soporte científico y humano han colaborado en la realización de este trabajo de investigación.

A las instituciones que han hecho posible la realización del trabajo presentado en esta tesis, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) por la beca 781480 a SYRJ y al apoyo para proyectos de investigación PAPIIT-UNAMIA203617 a FC, con la que pude realizar mi proyecto de maestría.

Agradezco a los doctores Estela Cuevas Romero y Pablo Pacheco Cabrera por su amable aceptación para revisar el desarrollo de mi tesis y ahora su conclusión, porque en cada oportunidad de tutorial me brindaban la ayuda y me hacían ser una persona más analítica.

Al Dr. Jorge Rodríguez Antolín por la aceptación a su grupo de trabajo.

A la Dra. Dora luz Corona Quintanilla por ayudarme en diversas ocasiones a resolver dudas y enseñarme la forma de trabajo de una mejor manera.

A mis compañeros de trabajo y maestría, agradezco por los buenos momentos que compartimos, especialmente a la Lic. Guadalupe Hernández Hernández y el Biol. Ramsés Chávez Ríos por su simpatía y apoyo técnico en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Francisco Castelán por la confianza brindada para unirme a su grupo de trabajo, durante el desarrollo de los experimentos y la entrega de resultados, por su apreciable ayuda y paciencia para ayudarme a entender el proyecto, a resolver mis dudas académicas y personales.

DEDICATORIA

Todos los logros que uno obtiene suelen ser compartidos, pues siempre hay personas detrás de nosotros que nos apoyan o impulsan incondicionalmente. Por eso dedico este trabajo a las personas más importantes en mi vida.

Mamá a ti por estar ahí para escucharme cuando lo necesito, por tus consejos y esas cosas tan de ella que me dice que siempre logran sacarme una sonrisa, cada una de tus enseñanzas y palabras me han motivado para llegar hasta donde estoy, gracias por todo lo que desde pequeña me enseñaste, los valores, y el siempre luchar por lo que quiero. Estaré eternamente agradecida contigo, Te Amo.

Xcaret y Shaden mis pequeñas traviesas, una de las razones de mi existir, mi alegría, gracias por tanto, por nuestras pláticas, sus risas, consejos, juegos, peleas y por estar ahí cada que lo necesité ya sea para escucharme, abrazarme, darme lata, hacerme enojar o simplemente haciéndome saber que a pesar de la distancia podré contar con ustedes y ustedes conmigo, en mi mente por siempre y para siempre las amo.

Ross y Dave por creer en mí y alentarme con sus palabras, fotos y videos, por recordarme constantemente lo mucho que me quieren y por la gran complicidad que existe entre nosotros.

A mi familia en general que cada que llego a casa me hacen saber lo orgullosos que están de mí.

A mis amigos, los que han permanecido conmigo a lo largo de muchos años y a los nuevos que han estado para escucharme en cada momento, para levantarme durante cada tropiezo que he tenido, por todas esas pláticas a media noche, las caminatas, conciertos y demás, por aguantar mi mal carácter pero sobre todo por no dejarme cuando los he necesitado.

Y a ti que aunque nuestras vidas tomaron rumbos diferentes tenías que recordarme que es bueno darse una tregua pero nunca claudicar, gracias por todo.

RESUMEN

Los músculos estriados del piso pélvico participan de manera importante en la reproducción y la micción. El debilitamiento de músculos del piso pélvico está relacionado con la aparición de incontinencia urinaria de esfuerzo (IUE) en la mujer. En nuestro grupo de trabajo hemos reportado la expresión de receptores de estrógenos (RE), particularmente los subtipos nucleares, en un músculo pélvico como el pubococcígeo (mPc) y otro perineal como el bulboesponjoso (mBe). Sin embargo, la comprensión de los efectos estrogénicos sobre ambos músculos requiere evaluar la expresión del receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPR30). En el presente trabajo se determinó la expresión del GPR30 en el mPc y el mBe y su relación con los niveles séricos de estradiol. Con tal fin se utilizaron conejas domésticas de la raza chinchilla de 6 meses de edad (*Oryctolagus cuniculus*), que fueron divididas en los grupos control (C), ovariectomizado (OVX), y ovariectomizado tratado con benzoato de estradiol (OVX+BE). Se prepararon extractos de proteínas totales a partir de músculos congelados, y se cuantificó la expresión relativa de GPR30 mediante inmunodetección en fase sólida. Los niveles séricos de estradiol disminuyeron en el grupo OVX y se incrementaron en el grupo OVX+BE. Nuestros resultados demostraron la expresión del GPR30 en los músculos Pcm y Bsm. Sin embargo, esta expresión no fue significativamente diferente entre los grupos experimentales. Estos hallazgos sugieren no existe una relación positiva entre los niveles séricos de estradiol y la expresión de GPR30 en los músculos del piso pélvico de la coneja.

ÍNDICE

<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	11
<u>1.1 Incontinencia urinaria</u>	12
<u>1.1.2 Incontinencia urinaria de esfuerzo</u>	13
<u>1.1.3 Incontinencia urinaria de urgencia</u>	13
<u>1.1.4 Incontinencia urinaria mixta</u>	13
<u>1.2 Factores de la incontinencia urinaria en la mujer</u>	14
<u>1.2.1 Embarazo</u>	14
<u>1.2.2 Parto</u>	15
<u>1.2.3 Menopausia</u>	16
<u>1.3. Anatomía y fisiología básica del tracto inferior bajo</u>	16
<u>1.3.1 Vejiga</u>	16
<u>1.3.2 Uretra</u>	17
<u>1.3.3 Fascia endopélvica</u>	17
<u>1.3.4 Soporte muscular del piso pélvico</u>	17
<u>1.4. Fisiología de la micción</u>	18
<u>1.5 Tratamientos para IU</u>	19
<u>1.5.1 Técnicas conductuales</u>	19
<u>1.5.2 Opciones quirúrgicas</u>	20
<u>1.5.3 Tratamiento farmacológico</u>	20
<u>1.6 Músculos estriados pélvicos y perineales</u>	21
<u>1.6.1 La rata como modelo de estudio</u>	22
<u>1.6.2 La coneja como modelo de estudio</u>	22
<u>1.7 Estrógenos</u>	23
<u>1.8 Receptores de estrógenos</u>	24
<u>1.8.1 Receptores de estrógenos clásicos</u>	24
<u>1.8.2 Receptor de estrógenos acoplado a proteína G</u>	25
<u>1.8.3 GPR30 y músculo esquelético</u>	26
<u>2. ANTECEDENTES</u>	28
<u>3. JUSTIFICACIÓN</u>	30
<u>4. HIPÓTESIS</u>	31

<u>5. OBJETIVOS</u>	32
<u>5.1 Objetivo General</u>	32
<u>5.2 Objetivos Específicos</u>	32
<u>6. METODOLOGÍA</u>	33
<u>6.1 Animales</u>	33
<u>6.2 Grupos experimentales</u>	33
<u>6.3 Cuantificación de estradiol sérico</u>	34
<u>6.4 Disección y técnica histológica de los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso</u>	34
<u>6.5 Cortes histológicos</u>	34
<u>6.6 Inmunohistoquímica</u>	35
<u>6.7 Western Blot e Inmunotransferencia de GPR30</u>	35
<u>6.8 Análisis estadístico</u>	36
<u>7. RESULTADOS</u>	37
<u>7.1 Niveles de estradiol sérico</u>	37
<u>7.2 Expresión de GPR30 en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso</u>	38
<u>7.3 Localización de GPR30 en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso</u>	39
<u>8. DISCUSIÓN</u>	40
<u>8.1 Niveles de estradiol sérico</u>	40
<u>8.2 Expresión de GPR30 en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso</u>	41
<u>8.3 Localización de GPR30 en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso</u>	42
<u>8.4 Aporte biomédico</u>	43
<u>9. CONCLUSIONES</u>	44
<u>10. PERSPECTIVAS</u>	45
<u>11. REFERENCIAS</u>	46

1. INTRODUCCIÓN

Los músculos esqueléticos pélvicos y perineales juegan un rol significativo en la fisiología del aparato urogenital inferior (AUI) en donde cumplen funciones reproductivas y excretoras.

Las alteraciones morfológicas y funcionales en estos músculos se han relacionado con la aparición de disfunciones ginecológicas y urinarias en mujeres. La variación en la expresión de los receptores de estrógenos (RE) en el AUI se ha asociado con algunas disfunciones pélvicas. La terapia de reemplazo de estrógenos se prescribe comúnmente para el tratamiento de patologías como la incontinencia urinaria de esfuerzo (IUE); sin embargo, su eficacia es cuestionable. El efecto de la administración de estrógenos en los músculos esqueléticos pélvicos y perineales ha sido discutido anteriormente, aunque hace falta esclarecer aspectos relacionados con la expresión de receptores de estrógenos (RE).

En la coneja doméstica, el músculo pubococcígeo (Pcm, un músculo pélvico) y el bulboesponjoso (Bsm, un músculo perineal) muestran diferencias con respecto a la composición del tipo de fibra, durante la actividad refleja, la micción y las respuestas de reparación/daño muscular.

En trabajos anteriores, nuestro grupo de investigación ha propuesto que algunas de estas características podrían estar relacionadas con la expresión de RE, particularmente los subtipos alfa y beta.

En este contexto es importante identificar la expresión del RE acoplado a proteínas heterotriméricas ligadas a GTP (proteínas G; GPR30), a la vez que determinar su relación con los niveles séricos de estradiol.

1.1 Incontinencia urinaria

La incontinencia urinaria (IU) se ha definido por la Sociedad Internacional de la Continencia (ICS) como la afección de la pérdida involuntaria de orina (Abrams y cols. 2002). Las estimaciones acerca de la prevalencia de la IU varían notablemente, pero aunque no es parte normal del proceso de envejecimiento hay una relación entre la edad avanzada y el desarrollo de esta patología (Hannestad y cols. 2000). Otro factor importante que se ha relacionado con la IU es el embarazo, donde se ha visto que hay una prevalencia de incontinencia urinaria de esfuerzo durante el tercer trimestre (Whitford y cols. 2007). En México la prevalencia promedio de IU es de 46.5%, habiendo una incidencia del 30.2% en mujeres de 20-29 años, 55.9% en mujeres de 40-59 años, e incrementándose en mujeres en un rango de edad de 70-79 años con una prevalencia del 71.4%, **Fig. 1.** (Velázquez y cols. 2007).

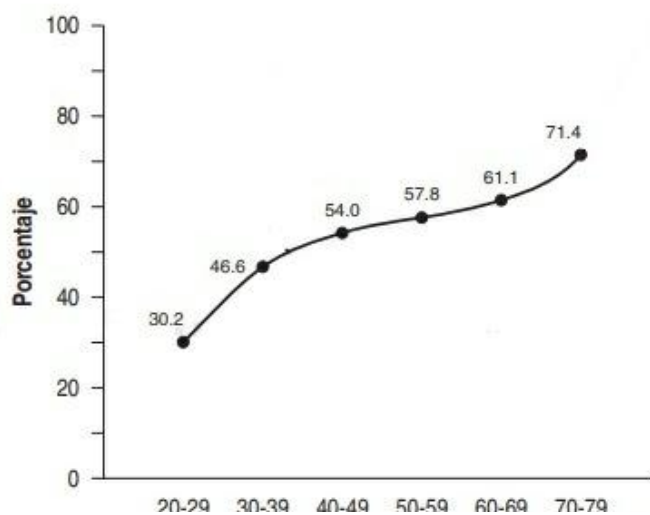


Fig. 1. Prevalencia de incontinencia urinaria relacionada con la edad.
(Modificado de Velázquez 2007).

La ICS clasifica la IU en las siguientes categorías: de esfuerzo (IUE), de urgencia (IUU) y mixta (IUM) (Abrams y cols. 2002).

1.1.2 Incontinencia urinaria de esfuerzo

Se define como la salida involuntaria de orina que ocurre como resultado de un aumento de la presión abdominal sobre la vejiga que sobrepasa la contracción de cierre de la uretra y se

asocia con esfuerzo físico en actividades como toser, reír o hacer ejercicio. (Abrams y cols. 2002). En México existe una prevalencia del 54.2% en un población de 20-89 años, siendo este tipo más frecuente que la IUU y la IUM. **Fig. 2.** (Velázquez y cols. 2007).

1.1.3 Incontinencia urinaria de urgencia

Es la pérdida involuntaria de orina acompañada o inmediatamente precedida de “urgencia”. Por “urgencia” se entiende cuando la paciente se queja de la aparición súbita de un deseo miccional claro e intenso, difícil de demorar (Abrams y cols. 2002).

1.1.4 Incontinencia urinaria mixta

Es la percepción de pérdida involuntaria de orina asociada tanto a urgencia como al esfuerzo (Abrams y cols. 2002).

Grupos de edad (años)	Incontinencia urinaria						Total	
	De esfuerzo		De urgencia		Mixta		n	%
	n	%	n	%	n	%		
20-29	25	36.8	22	32.3	21	30.9	68	100.0
30-39	57	54.8	33	31.7	14	13.5	104	100.0
40-49	58	56.9	16	15.7	28	27.4	102	100.0
50-59	46	68.7	8	11.9	13	19.4	67	100.0
60-69	11	50.0	6	27.3	5	22.7	22	100.0
70-79	2	40.0	1	20.0	2	40.0	5	100.0
80-89	2	66.7	1	33.3	0	0.0	3	100.0
Total	201	54.2	87	23.4	83	22.4	371	100.0

Fig. 2. Prevalencia de los tipos de incontinencia urinaria relacionados con la edad. (Velázquez 2007).

1.2 Factores de la incontinencia urinaria en la mujer

La IU es considerada una patología multifactorial, y aunque se han realizado diversos estudios que abordan las posibles causas para su desarrollo, la mayoría de estos son transversales o de casos-controles por lo tanto, hay limitaciones a la hora de establecer conclusiones acerca de sus causas (Hunskaar y cols. 2000).

Sin embargo se han descrito algunos factores que por diversos mecanismos, predisponen a la aparición de la IU y en algunos casos, la agravan. Entre ellos destacan: diabetes, obesidad, embarazo, parto, menopausia y envejecimiento, discapacidades cognitivas y/o funcionales, entre otros (Hunskaar y cols. 2000).

De esa forma la alteración de uno o varios de los factores mencionados anteriormente, condicionan la aparición de los diferentes tipos de incontinencia. En este apartado solo se abordaran tres de los múltiples factores de la IU.

1.2.1 Embarazo

Un estudio encontró que la prevalencia de IUE que en mujeres gestantes aumento a 70.5% respecto al 29.5% en mujeres nulíparas con dicha patología. Se observó que la IUE aumenta con el número de embarazos en donde se reportó una incidencia del 47.8% con uno a tres embarazos versus 84.6% con siete o mas embarazos. **Fig. 3.** (Velázquez y cols. 2007).

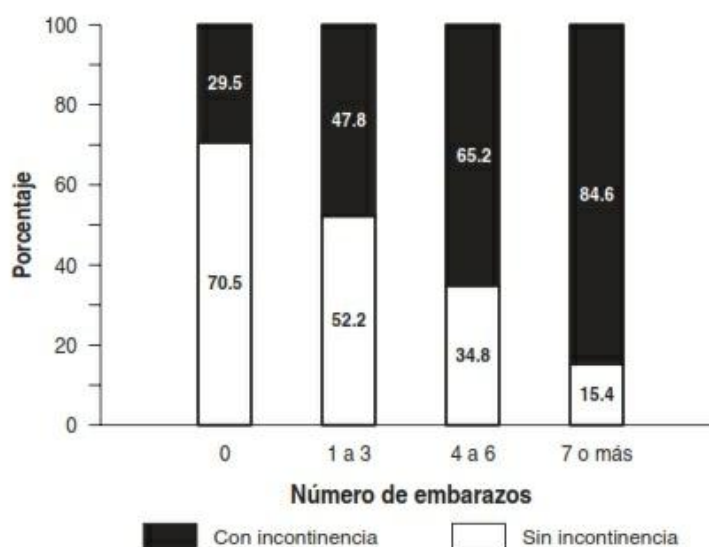


Fig. 3. Prevalencia de IUE de acuerdo con el número de embarazos (Velázquez 2007).

A pesar de que se ha establecido una relación entre la paridad y la incidencia de IU, hay una controversia acerca de cuáles son los mecanismos anatómicos y/o funcionales que favorecen su desarrollo.

Está claro que el paso de la cabeza fetal a través del canal del parto supone un traumatismo directo para los músculos específicamente los músculos del elevador del ano ya que están sujetos a los valores mas grandes de estiramiento y tensión (Parente y cols. 2008) y el tejido conectivo del suelo de la pelvis y por lo tanto, éstos se pueden debilitar. La innervación de la musculatura también puede dañarse con consecuencias a largo plazo, pues se ha observado que los nervios que innervan al esfínter anal sufren una tensión 15% mayor al umbral normal (Lien y cols. 2005).

Sin embargo otros autores apuntan que la IU no solo es provocada por el embarazo, sino que los cambios que se ocasionan en los tejidos por variaciones las concentraciones hormonales (Hvidman y cols. 2002)

1.2.2 Parto

El papel del parto como factor predisponente a incontinencia urinaria ha sido apoyado por varios estudios que demostrado una asociación entre IU y parto.

Estas disfunciones son la consecuencia directa de tres hechos: a) un piso pélvico excesivamente relajado, secundario a la distensión de músculos y fascias que se producen durante el parto vaginal (Parente y cols. 2008); b) secundarios a las lesiones directas (desgarros, episiotomía) sobre las paredes vaginales y que pueden afectar al soporte y a la posición de la vejiga, el recto y el útero o lesiones del esfínter anal (Boyles y cols. 2009), y c) una lesión directa de los nervios por compresión o elongación excesiva y prolongada de éstos, lo cual impedirá que el músculo estriado (pubococcígeo y esfínteres) pueda contraerse de forma voluntaria o refleja (Lien y cols. 2005).

Finalmente otros autores apuntan que una incidencia de IU durante el embarazo conlleva a un riesgo mayor de síntomas a larga duración (Burgio y cols. 2003; Viktrup y cols. 2006)

1.2.3 Menopausia

Los cambios atróficos debido al cambio de un estado premenopáusico a postmenopáusico incrementan la susceptibilidad para las infecciones del tracto urinario (TUI) y pueden provocar síntomas urinarios tales como el aumento de la frecuencia, la urgencia miccional e incluso la IU (Hunskaar y cols. 2000). La atrofia de estos tejidos puede ser revertida con

estrógenos puesto que se ha confirmado que TUI femenino actúa como un órgano diana para acciones estrogénicas (Blakema y cols. 2000).

Además, se ha comprobado que el tratamiento de reemplazo hormonal con estrógenos reduce la IU en algunos casos. Por ello, parece razonable proponer que la pérdida estrogénica contribuye al problema (Hunskaar y cols. 2000).

Estudios demuestran que un tratamiento local de estrógenos puede mejorar la IU. Sin embargo, hay poca evidencia acerca del período posterior al tratamiento con estrógenos y los efectos a largo plazo de esta terapia. Por el contrario, la terapia sistémica de reemplazo hormonal con estrógenos equinos conjugados puede empeorar la incontinencia (Cody y cols 2012), por lo tanto se ha sugerido que los estrógenos no se deben considerar parte del tratamiento de rutina para mujeres con IUE.

1.3. Anatomía y fisiología básica del tracto inferior bajo

Para la comprensión del mecanismo de continencia urinaria es preciso un recordatorio anatómico de las estructuras más importantes implicadas en el mismo.

1.3.1 Vejiga

La vejiga es un órgano muscular hueco donde se colecta la orina proveniente de los uréteres de forma regular y rítmica, tiene la capacidad de relajarse y dilatarse para acumular un volumen de orina de entre 300 y 500 mililitros. Sus paredes tienen la capacidad de distenderse y contraerse para provocar su vaciamiento a través de la uretra. En general, la vejiga mantiene su forma esférica cuando está llena que será más o menos dilatada según el estado de repleción vesical, y al estar vacía asemeja un tetraedro. (Tresguerres 2005).

1.3.2 Uretra

La uretra es una estructura tubular compleja que se extiende por debajo de la vejiga, pasa por el espacio de Retzius, atraviesa la membrana perineal y llega hasta el meato externo. Tiene una longitud total aproximada de 3-4 cm. Está constituida por diferentes elementos musculares que permiten su función de llenado y vaciado. El músculo liso de la uretra es continuación con el trígono y el detrusor. La función de este músculo liso es la de mantener

el tono de la uretra, por lo que la mantiene cerrada durante la fase de llenado. (Tresguerres 2005).

1.3.3 Fascia endopélvica

La uretra se mantiene en su posición gracias a su apoyo sobre la pared anterior de la vagina y la tensión ejercida por los ligamentos pubouretrales que son a su vez, condensaciones de la fascia endopélvica y están fijados al arco tendinoso de dicha fascia. Los ligamentos pubouretrales van desde la cara interna de la sínfisis púbica hasta la parte media de la uretra. Los ligamentos uretropolvianos sin embargo, son el principal soporte del cuello vesical y uretra proximal. Estos ligamentos son también condensaciones de la fascia endopélvica y al igual que los ligamentos pubouretrales están sujetos al arco tendinoso de fascia endopélvica. Dicho arco emite fibras que se desdoblán y pasan por debajo de la uretra, formando una capa suburetral a modo de hamaca. La fascia suburetral adquiere un grosor especial creando un verdadero suelo bajo ésta. (Tresguerres 2005).

1.3.4 Soporte muscular del piso pélvico

Los músculos elevadores del ano y el cóccigeo, que están sujetos a la cara interna de la pelvis menor, forman el suelo muscular de la pelvis. Con sus correspondientes músculos del lado opuesto forman el diafragma pélvico. El músculo elevador del ano está compuesto por dos grandes músculos, de medial a lateral: el músculo pubococcígeo y el iliococcígeo. El músculo pubococcígeo, la parte medial más gruesa del elevador del ano surge de la parte posterior del pubis y la parte anterior del arco tendinoso y llega hasta la parte posterior del recto y el cóccix. El borde interno forma el margen del hiato urogenital, a través del cual pasan la uretra, la vagina y el ano. Se han definido varias subdivisiones del músculo en la porción medial del pubococcígeo que serían los que se unirían al músculo de la uretra, la vagina, el ano y el recto: el pubouretral, el pubovaginal, el puboanal y el puborrectal, o colectivamente como los puboviscerales. La parte más delgada y lateral del elevador del ano es el músculo iliococcígeo, que va del arco tendíneo del elevador del ano hasta la espina isquiática. En la parte posterior se une a los dos últimos segmentos del cóccix. Las fibras de ambos lados también se fusionan para formar un rafe y contribuyen al ligamento

anococcígeo. Este rafe medial entre el ano y el coxis es la llamada lámina del elevador y es sobre la que yacen los órganos de la pelvis. Está formado por la fusión del iliococcígeo y las fibras posteriores de ambos músculos pubococcígeos. El músculo coccígeo se extiende desde la espina isquiática hasta el cóccix y la parte más inferior del sacro y forma la parte posterior del diafragma pélvico. **Fig. 4.** (Tresguerres 2005).

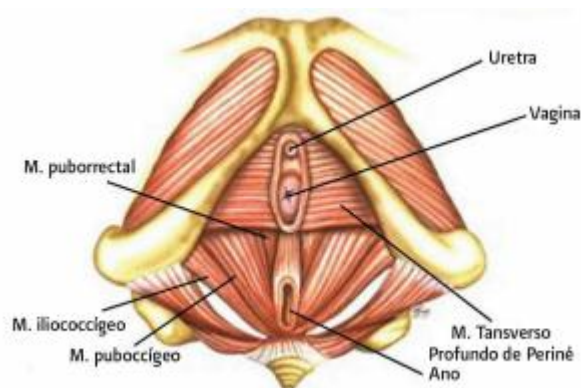


Fig. 4. Músculos del piso pélvico (Incontinencia urinaria en el adulto mayor, guía de consulta, 2010).

1.4. Fisiología de la micción

La micción se divide en dos fases. Fase de llenado: el esfínter interno y el externo están en contracción para evitar que se produzcan escapes de orina, mientras la vejiga se distiende con la entrada de orina por los uréteres, dependiendo de la distensión de la vejiga o del volumen alcanzado. Debido a la capacidad de la corteza cerebral de controlar la necesidad de miccionar, al final de la fase de llenado, a pesar de que aparezcan deseos de miccionar, el músculo detrusor sigue relajado y el esfínter uretral cerrado, hasta que se encuentre el lugar adecuado para la micción. Todo ello está mediado por los nervios hipogástricos, pélvicos y pudendos. Fase de vaciado o micción: Se abre el esfínter interno, se relaja el esfínter uretral externo (voluntario), el suelo pélvico pierde tono y, al caer la presión intrauretral, se contrae el detrusor y se inicia la micción. **Fig. 5.** (Tresguerres 2005).

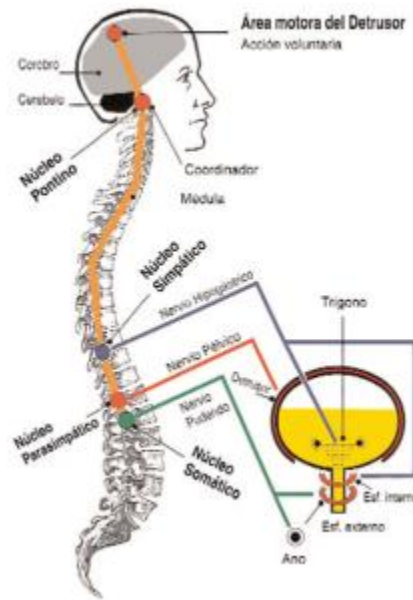


Fig. 5. Fisiología de la micción (Incontinencia urinaria en el adulto mayor, guía de consulta, 2010).

1.5 Tratamientos para IU

El tratamiento de la incontinencia urinaria depende del tipo de incontinencia, la gravedad y la causa de fondo. Probablemente se necesite una combinación de tratamientos.

Al principio se sugieren tratamientos menos invasivos y continúa con otras opciones solo si estas técnicas fallan.

1.5.1 Técnicas conductuales

Para la IU de urgencia, de esfuerzo o mixta. Ejercicios musculares para reforzar el suelo pélvico (ejercicios Kegel). Son recomendables para IU de esfuerzo, mixta y de urgencia. Especialmente recomendados tras el parto. Consiste en tres series de 8 a 12 contracciones lentas y sostenidas durante seis a ocho segundos cada una, tres a cuatro veces por semana al menos durante 15 a 20 semanas. Ejercicio físico, sobre todo para reforzar la musculatura abdominal. (Scharoder y cols. 2010).

1.5.2 Opciones quirúrgicas

Son limitadas y conllevan una morbilidad significativa. La cirugía se considera el tratamiento adecuado en las pacientes en las que el tratamiento conservador ha fracasado o

en aquellas con IUE moderada-intensa. Su propósito es incrementar la resistencia uretral para evitar el escape de orina por la uretra durante los aumentos de la presión intraabdominal, preservando el vaciamiento vesical completo a baja presión. Existen alrededor de 200 procedimientos quirúrgicos diferentes para tratar la IUE, pero, pueden agruparse en tres tipos básicos: colposuspensiones, cabestrillos uretrales e inyectables uretrales. (Scharoder y cols. 2010).

1.5.3 Tratamiento farmacológico

Los medicamentos que suelen utilizarse para tratar la incontinencia comprenden **Fig. 6.** (Scharoder y cols. 2010):

- Anticolinérgicos. Estos medicamentos pueden calmar la vejiga hiperactiva y ser útiles para la incontinencia imperiosa.
- Alfabloqueantes. En los hombres con incontinencia imperiosa o por rebosamiento, estos medicamentos relajan los músculos del cuello de la vejiga y las fibras musculares de la próstata, mientras facilitan el vaciamiento de la vejiga.
- Estrógeno tópico. Con respecto a las mujeres, aplicar estrógeno tópico de dosis baja en presentaciones de crema, anillo o parche vaginal puede ayudar a tonificar y a rejuvenecer los tejidos de la uretra y la zona vaginal. Para la incontinencia urinaria, no se recomienda el estrógeno sistémico (tomar la hormona en píldoras), ya que incluso podría empeorar el cuadro.

Medicamento	GCC	GR
• Duloxetina	1	B
• Imipramina	3	NR
• Clenbuterol	3	C
• Metoxamina	2	NR
• Midodrina	2	C
• Efedrina	3	NR
• Norefedrina (fenilpropanolamina)	3	NR
• Estrógenos	2	NR

GR = grado de recomendación; NR = ninguna recomendación posible.

Fig. 6. Medicamentos utilizados para el tratamiento de la IUE (Scharoder y cols., 2010).

1.6 Músculos estriados pélvicos y perineales

Los músculos estriados pélvicos y los perineales están asociados con el AUI de machos y hembras de distintas especies de mamíferos (Thor y DeGroat 2007). Los que están dentro de la cavidad pélvica son conocidos como músculos pélvicos y constituyen junto con algunos huesos (el íleo, el isquion, el pubis y el sacro) y ligamentos el llamado suelo pélvico.

En la especie humana, el complejo muscular *levator ani*, formado por los músculos iliococcígeo, pubococcígeo y puborrectal, contribuye de manera importante en el sostén de las vísceras supradycacentes al suelo pélvico (Ashton-Miller y DeLancey 2007). Los músculos perineales se localizan fuera la cavidad pélvica y, algunos cumplen funciones esfintéricas como el rabdoesfínter uretral y el esfínter anal, dada su estrecha localización anatómica con las cavidades de que derivan estos nombres (Thor y DeGroat 2007). Otros músculos perineales como el isquiocavernoso y el bulboesponjoso también contribuyen a sostener vísceras pélvicas.

La actividad de los músculos pélvicos y perineales es un componente relevante para el reflejo de micción y para algunos reflejos reproductivos como el reflejo vaginocaveroso (Martínez y cols. 2012). En la mujer, la posición anatómica de ambos grupos de músculos los hace vulnerables a rupturas de miofibras y denervaciones debido a la fuerza de distensión a la que son sometidos durante el parto (Ashton-Miller y DeLancey 2007). Como consecuencia del parto también ocurren alteraciones en el tejido conectivo (p.ej. fascias y ligamentos) localizado alrededor del aparato urogenital inferior y los músculos pélvicos y perineales.

1.6.1 La rata como modelo de estudio

La rata es una especie muy utilizada para evaluar la contribución de los estrógenos sobre la organización del tejido conectivo, la innervación y la actividad refleja de músculos pertenecientes al piso pélvico. Los efectos sobre la morfometría muscular han sido analizados recientemente y se ha encontrado que son sexualmente dimórficos (Lara y cols. 2011). En la rata hembra el área transversal de las fibras (CSA) del músculo pubococcígeo aumenta 2 semanas después de la ovariectomía, efecto que es revertido después de 4

semanas de administrar estradiol (Lara y cols. 2011). Nuestro grupo de investigación ha demostrado la expresión de los subtipos alfa y beta del receptor de estrógenos (RE) en los músculos pubococcígeo e iliococcígeo de la rata hembra (Carrasco y cols. 2018 (aceptado)). Por otra parte, se ha reportado que la expresión de Glut4, un efector relacionado con la expresión de RE en músculos esqueléticos, está asociada con altos niveles de estradiol en el músculo pubococcígeo pero no en el iliococcígeo (Carrasco y cols. 2018 (aceptado)). En la rata hembra algunos músculos perineales son vestigiales lo que dificulta la realización de experimentos similares a los realizados en el músculo pubococcígeo.

1.6.2 La coneja como modelo de estudio

En la coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*), dos de los músculos estriados involucrados en la fisiología de la micción y la reproducción son el bulboesponjoso y el pubococcígeo. El primero participa en la expulsión orina mientras que el segundo lo hace en la continencia de orina (Corona y cols. 2009). A pesar de las diferencias en la organización del TUI entre la mujer y la coneja, y entre la musculatura pélvica y perineal de una especie bípeda y otra cuadrúpeda, la similitud entre la actividad refleja de músculos pélvicos, perineales y vísceras pélvicas ha permitido modelar en la coneja algunos procesos involucrados en la fisiopatología de disfunciones del piso pélvico (Martínez y cols. 2012).

Los músculos bulboesponjoso y pubococcígeo de la coneja expresan el RE-alfa y el RE-beta en las miofibras y el tejido conectivo (López y cols. 2013). Interesantemente, la multiparidad incrementa la proporción de mionúcleos inmunorreactivos anti-RE alfa y beta en ambos músculos (López y cols. 2013). La expresión de REs en el músculo pubococcígeo, pero no en el bulboesponjoso, también está asociada con los niveles de estradiol sérico en conejas con ovariectomía crónica (5 meses) tratadas o no con benzoato de estradiol (Carrasco y cols. 2015). Estos hallazgos han llevado a proponer que el músculo pubococcígeo podría exhibir una mayor sensibilidad estrogénica. Debido a la relevancia de las acciones estrogénicas, a través de la interacción con REs, para la regeneración muscular, en un estudio posterior se evaluó dinámica de regeneración en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de conejas múltiparas (López y cols. 2016).

1.7 Estrógenos

Estudios realizados proponen que los cambios hormonales tienen un efecto sobre la capacidad del músculo esquelético para regular su plasticidad y su masa (McClung y cols. 2006).

Se ha observado que la musculatura estriada es un órgano diana de las hormonas gonadales (Brown 2008). Los estrógenos, son hormonas esteroides que controlan una gran variedad de procesos fisiológicos entre los que se encuentran los reproductivos y los no reproductivos (Lee y McEwen, 2001). Las principales hormonas estrogénicas que sintetiza el organismo son: el estradiol, la estrona y el estriol. El sitio principal de biosíntesis de los estrógenos es la célula de la granulosa del ovario y la placenta a partir de colesterol y andrógenos como intermediarios, aunque también se producen en pequeñas cantidades en los testículos, glándulas suprarrenales y tejidos periféricos. (Leblanc y cols. 2017).

Se sugiere que los estrógenos aumentan la fuerza del músculo esquelético, las variaciones en la fuerza muscular voluntaria se ha observado durante el ciclo menstrual humano (Glenmark y cols. 2004).

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 cols. 2006). Después de la sustitución con 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 cols. 2007). El músculo estriado es capaz de sintetizar E2 mediante aromatización interna (Larionov y cols. 2003).

1.8 Receptores de estrógenos

El músculo esquelético es un tejido sensible a esteroides sexuales, ya que expresa receptores para andrógenos y estrógenos (Glenmark 2004).

La mayor parte de los efectos de los estrógenos descritos anteriormente están mediados por los receptores de estrógenos intracelulares (RE). Estos pertenecen a una superfamilia de receptores intracelulares con estructura y funcionamiento similares, son factores de

transcripción, funcionalmente activos tras unirse su ligando y que producen efectos genómicos a largo plazo (Prossnitz y cols 2008).

Hasta este momento se conocen dos clases de receptores que actúan a través de los estrógenos, estos dos receptores hormonales intracelulares y un receptor acoplado a proteína G que se localiza en el retículo endoplásmico, el termino RE se utiliza únicamente para los receptores nucleares, mientras que para el receptor acoplado a proteína G se utiliza el termino GPR30 o GPER (Leblanc y cols. 2017).

1.8.1 Receptores de estrógenos clásicos

Se sabe que existen dos RE intracelulares, que están representados por genes individuales y localizados en regiones cromosómicas distintas, estos son: el receptor de estrógenos alfa (RE- α) y el receptor de estrógenos beta (RE- β).

Ambos son miembros de la superfamilia de receptores nucleares que son factores de transcripción activados por ligando (Matthews y Gustafsson 2003). Estos receptores pueden encontrarse en los tejidos sensibles a estrógenos de manera simultánea. Aunque comúnmente se distribuyen de manera desigual entre los órganos y tejidos. Por un lado, el RE- α se encuentra predominantemente en la glándula mamaria, el útero, las células de la teca del ovario, el hueso, el sistema reproductivo masculino, el hígado y el tejido adiposo, mientras que, el ER- β se encuentra en la mayoría de los casos en la vejiga, células de la granulosa del ovario, colon, tejido adiposo y sistema inmune. Ambos receptores son prevalentes en el tejido cerebral neuronal y no neuronal (Leblanc y cols. 2017).

Los receptores de estrógenos después de la activación mediante la unión con su ligando comúnmente estradiol (E2) pueden cambiar la señalización celular a través de tres posibles interacciones de las que son capaces: 1. la capacidad como factor de transcripción dependiente del ligando, 2. la influencia directa sobre las proteínas diana citosólicas, 3. los mecanismos de anclaje a través de otros factores de transcripción además de sí mismo. (Fig. 7).

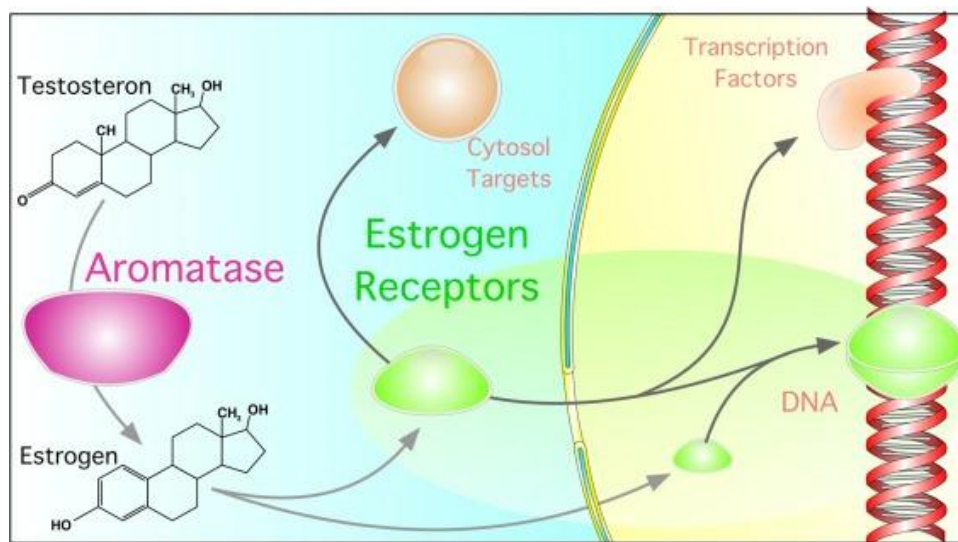


Fig. 7. Señalización celular de los RE's clásicos (Leblanc y cols., 2017).

1.8.2 Receptor de estrógenos acoplado a proteína G

Tradicionalmente, se pensaba que los estrógenos actuaban a través de RE nucleares clásicos, RE- α y RE- β . Sin embargo, se observó que algunos estrógenos inducían efectos biológicos solo minutos después de su aplicación. Este efecto rápido, "no genómico" de los estrógenos está mediado por un receptor anclado a la membrana llamado receptor 1 de estrógenos acoplado a la proteína G (GPR30) (Rodenas y cols. 2017). El GPR30, fue identificado a principios de la década de 2000 por laboratorios independientes y ahora está incluido en la nomenclatura oficial de GPCR y fue designado estrógeno acoplado a proteína G (GPER) por la Unión Internacional de Farmacología en 2007.

Las respuestas rápidas al estrógeno son importantes para una serie de funciones celulares y se han implicado en la regulación de la señalización de la insulina, la vasodilatación, la regulación de la presión arterial y la señalización neuronal (Barton 2012). Por lo tanto, GPER30 se identificó como el receptor que media los efectos no genómicos de los estrógenos a través de la movilización de calcio intracelular y la síntesis de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato. Además, los mecanismos de señalización de GPER1 incluyen la activación rápida de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK),

MAPK 1 regulado extracelularmente (ERK-1), ERK-2 y fosfatidilinositol 3-quinasa, así como cAMP y calcio citosólicos incrementados (Rodenas y cols. 2017) (**Fig. 8**).

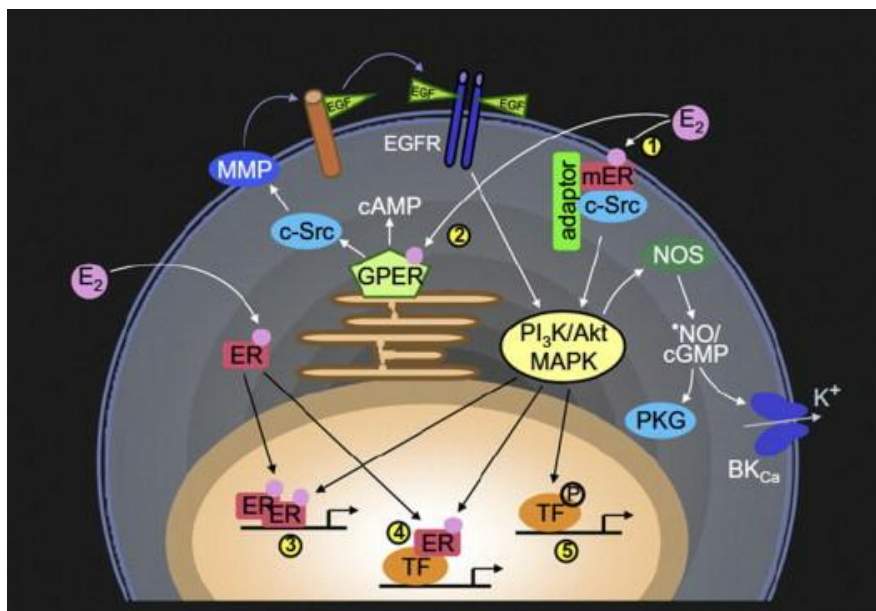


Fig. 8. Vías de señalización celular activadas por los RE's clásicos (1) y el receptor acoplado a proteína G (2), expresión de genes celulares mediante la unión de dímeros de RE en la región promotora (3), interacción de RE con otros factores de transcripción (TF) (4), regulación de la fosforilación del factor de transcripción (5) (Barton 2012).

1.8.3 GPR30 y músculo esquelético

La acción de GPER se manifiesta en tejidos metabólicamente activos como el páncreas, el tejido adiposo, el hígado y el músculo esquelético. Los estudios celulares y en animales han establecido que GPER está involucrado en la regulación del peso corporal, el comportamiento de alimentación, la inflamación, así como la homeostasis de la glucosa y los lípidos (Sharma y Prossnitz 2017).

Los estudios sobre el envejecimiento del músculo esquelético en las mujeres es importante ya que, al presentar sarcopenia severa, hay menos fuerza y potencia muscular así como un riesgo mayor de discapacidad, se ha observado una correlación entre la fuerza muscular y los niveles de estrógenos circulantes (Cauley y cols. 1989). Por lo tanto sugieren un vínculo entre la sarcopenia, la debilidad del músculo esquelético y la pérdida de estrógenos. Aunque estudios en animales muestran que el reemplazo de E₂ mejora la función del músculo esquelético en ratas ovariectomizadas (OVX), los ensayos clínicos de

hormonoterapia basada en estrógenos en mujeres posmenopáusicas han sido contradictorios con respecto a la función física (Wang y cols, 2016).

El GPR30 es un RE recientemente reconocido expresado en diversos tejidos, incluido el músculo esquelético. Además, en ratones hembra C57BL / 6, la expresión de GPR30 es varias veces mayor en músculo esquelético y cerebro en comparación con otros tejidos. Sin embargo, sus funciones en el músculo esquelético y su capacidad de respuesta a los cambios en los estrógenos circulantes no están claras. Dado que la activación de GPR30 protege el músculo cardíaco de las tensiones que incluyen la pérdida de estrógenos en modelos animales hipotetizamos que la activación de GPR30 por su agonista selectivo G1 tiene efectos protectores en el músculo esquelético de las viejas ratas (Wang y cols. 2016).

2. ANTECEDENTES

Los músculos estriados del piso pélvico cumplen funciones relevantes para la excreción y reproducción. El debilitamiento de estos, frecuentemente asociado con la distensión a la que se someten durante el parto, es un factor de riesgo importante para el desarrollo de distintas patologías uroginecológicas (Martinez-Gómez y cols, 2012).

Estudios revelan que la presión en el tracto urinario bajo, ejercida por el feto durante el trabajo de parto causa daño muscular y nervioso a las estructuras pélvicas así como pérdida de tejido conectivo. La falta de recuperación de este proceso causa trastornos musculares y de micción permanentes en el suelo pélvico (Abdool y cols, 2009).

Durante un estudio que aborda la relación que existe entre el parto vaginal y la incontinencia urinaria, se encontró que las mujeres desarrollan incontinencia urinaria de esfuerzo (IUE) después del primer parto, esto debido a anomalías en los músculos del elevador del ano (DeLancey y cols, 2003).

El debilitamiento del piso pélvico puede aparecer a cualquier edad, sin embargo con el paso de los años y la caída estrogénica durante la menopausia o tras el embarazo y el parto, se provoca síntomas como dolor pélvico, incontinencia urinaria de esfuerzo, de urgencia y mixta. Cabe destacar que estas patologías no siempre están relacionadas con la edad o la menopausia (Estudillo y cols, 2004).

Si bien es cierto que los problemas del tracto urinario no son una consecuencia directa del déficit hormonal, el tracto urinario inferior y el aparato genital femenino tienen un origen embriológico común lo que hace que ambas estructuras sean sensibles a la acción de las hormonas, particularmente de los estrógenos (Fritel y cols 2012).

La incertidumbre sobre los mecanismos relacionados con su activación contribuye a la controversia alrededor del uso de estrógenos en el tratamiento de la IUE (Cody y cols 2012). Estudios demuestran que un tratamiento local de estrógenos puede mejorar la IU. Sin embargo, hay poca evidencia acerca del período posterior al tratamiento con estrógenos y los efectos a largo plazo de esta terapia. Por el contrario, la terapia sistémica de

reemplazo hormonal con estrógenos equinos conjugados puede empeorar la incontinencia (Cody y cols 2012).

Se sabe que los esteroides cumplen un rol importante en la fisiología normal y en el tratamiento de patologías, en algunos músculos de las extremidades se conocen a detalle las acciones estrogénicas, entre ellas las relevantes para el metabolismo, la contractilidad y la regeneración muscular (Enns y cols 2010)

Si bien se conoce que algunos músculos pélvicos expresan diversos subtipos del receptor de estrógenos (RE), dichos receptores se han descrito como factores que median efectos a largo plazo en tejidos regulados hormonalmente, aunque la evidencia sugiere que los receptores de esteroides clásicos son capaces de mediar muchos de estos eventos, ahora se sabe que los esteroides también median eventos de señalización rápida asociados con el GPR30 (Prossnitz y cols 2008).

Un estudio demuestra que la activación de GPR30 mitiga los efectos adversos de la pérdida de estrógenos sobre la capacidad de ejercicio y la función contráctil del músculo esquelético en ratas envejecidas (Wang y cols 2016).

La coneja doméstica es un modelo animal en donde se ha caracterizado la musculatura pélvica y perineal (Martínez-Gómez y cols 1997). Los músculos del piso pelvico se encuentra bien desarrollado y son accesibles para manipulación y registro electromiográfico. El pubococcígeo (Pcm) y el bulboesponjoso (Bsm) muestran diferencias con respecto a la composición del tipo de fibra (López-García y cols 2014), durante la actividad reflejo de la micción (Corona-Quintanilla y cols 2009) y las respuestas de reparación muscular / daño en conejos hembras (López-García y cols 2014).

Las características morfométricas de las fibras y la expresión de ER en estos músculos se ven afectadas diferencialmente por la multiparidad, lo que sugiere una sensibilidad de estrógeno diferente (López-García y cols 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se conoce la participación que tiene los estrógenos en diferentes funciones del músculo estriado como el metabolismo, la mecánica contráctil y la regeneración muscular. La mayoría de esta información proviene de estudios realizados en músculos de las extremidades; sin embargo se conoce poco acerca de los efectos estrogénicos ejercidos sobre músculos estriados del área pélvica que cumplen funciones en procesos de excreción y reproducción.

Aunado al importante rol que juegan los estrógenos en la regulación de la fisiología normal se han ocupado frecuentemente terapias de reemplazo hormonal basada en estrógenos para el tratamiento de patologías como la IUE. Esta situación resulta controversial dado que no existen casos de estudio que hayan abordado los mecanismos que la sustenten, por otro lado, hay estudios que muestran un relación entre dicha terapia y la aparición de ciertos tipos de cáncer o el agravamiento de la IUE.

Es posible que algunos músculos del piso pélvico respondan a la administración de estrógenos pero también puede suceder que otros no lo hagan o que respondan a otras hormonas o a otro tipo de receptores estrogénicos.

Si bien se han descrito y caracterizado a profundidad los receptores de estrógenos nucleares del tipo alfa y beta como factores que median efectos a largo plazo en tejidos regulados hormonalmente, actualmente se sabe conoce la existencia del GPR30 que también podría intervenir en las acciones que los estrógenos ejercen sobre músculo del piso pélvico.

Ciertamente la evidencia sugiere que los receptores de esteroides clásicos son capaces de mediar muchos de estos eventos. No obstante la identificación y caracterización de los receptores no clásicos involucrados en estas respuestas son fundamentales para nuestro entendimiento de estas rutas complejas, además de la generación de conocimiento que contribuya a la elaboración de hipótesis más precisas.

4. HIPÓTESIS

Los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso de la coneja expresan el GPR30 en una relación dependiente de la concentración sérica de estradiol.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar la expresión del receptor GPR30 en los músculos del piso pélvico en conejas control (C), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas tratadas con benzoato de estradiol (OVX + BE).

5.2 Objetivos Específicos

En conejas control (C), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas tratadas con benzoato de estradiol (OVX + BE):

Conocer la concentración sérica de estradiol.

Cuantificar la expresión de GPR30 en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso.

Identificar la localización del receptor GPR30 en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso.

Determinar la relación de los niveles séricos de estradiol con la expresión del receptor de estrógenos GPR30 en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso.

6. METODOLOGÍA

6.1 Animales

Se utilizaron conejas de la raza Chinchilla (*Oryctolagus cuniculus*) de aproximadamente 8 meses de edad. Las conejas fueron mantenidas en el bioterio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Fueron alojadas en jaulas individuales de acero inoxidable (50 x 60 x 40 cm) en condiciones ambientales habituales (16 h / 8 h de luz y oscuridad; T= 22 ± 2°C) y se alimentaron con pellets (Conejina, Purina) y agua ad libitum. Las intervenciones experimentales que recibieron estas conejas fueron autorizadas por la Comisión de Ética del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

6.2 Grupos experimentales

Se utilizaron 18 conejas que fueron divididas en un grupo control (C, n = 6), un grupo de conejas ovariectomizadas (OVX, n = 6) y otro de conejas OVX tratadas con benzoato de estradiol durante (OVX+BE, n = 6). Para realizar la ovariectomía bilateral, las conejas fueron anestesiadas por vía intramuscular con una combinación de ketamina (0.2 ml/Kg) y xilazina (0.15 ml/Kg). Para extraer los ovarios se realizaron incisiones bilaterales que se suturaron con hilo de seda. Un mes después de la cirugía, las conejas pertenecientes al grupo OVX+BE fueron implantadas con una cápsula de Silastic conteniendo ~8 mg de BE. Las conejas del grupo OVX fueron sacrificadas un mes después de la cirugía; las del grupo OVX+BE, 15 días después de recibir el implante con BE; y las del grupo C cuando alcanzaron los 7 meses de edad. Las conejas fueron sacrificadas mediante la administración de una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg / Kg de peso, i.p, Pfizer).

6.3 Cuantificación de estradiol sérico

Las muestras sanguíneas se obtuvieron por punción cardíaca al momento de sacrificar a cada individuo. El suero se separó por centrifugación (10 min a 1000 rpm) y se almacenó a -80 °C hasta su cuantificación, por duplicado, utilizando un kit de ELISA (Cayman). Para

esta cuantificación se partió de extractos totales de esteroides preparados siguiendo el protocolo descrito por (López-García y cols, 2013).

6.4 Procesamiento histológico de los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso

Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/ Kg, ip.), posteriormente se hizo una incisión sobre la línea media desde la cavidad abdominal hasta la vagina perineal. Los músculos abdominales y el tejido adiposo fueron extraídos. Los huesos isquion y pubis, así como los músculos obturador externo e interno fueron extraídos ligando venas y arterias que irrigan el plexo venoso para evitar hemorragias severas hasta disecar los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso. Los tejidos se colocaron en un porta muestras de plástico. La fijación de tejidos se hizo por inmersión en solución de Bouin-Duboscq (ácido pícrico 0.39 %, formalina 26.66%, ácido acético 6.66%, etanol 80%) durante 24 h. Posteriormente, los músculos se deshidrataron con alcohol etílico de concentraciones ascendentes (80, 96 y 100%) y fueron aclarados en xileno. Completada la deshidratación, el tejido se incluyó en paraplast X-tra (Sigma).

6.5 Cortes histológicos

De cada músculo se obtuvieron cortes de 7µm de grosor de la región media utilizando un microtomo Leica (RM2135). Los cortes fueron desparafinados sumergiéndolos serialmente en xileno y alcohol etílico de concentraciones descendentes (100, 96, 80 y 70 %) y agua.

6.6 Inmunohistoquímica

Una laminilla de la región media del músculo/coneja fueron utilizadas para realizar la técnica de inmunohistoquímica que se realizó en base al método avidina-biotina-peroxidasa-HRP (ABC), donde los cortes, ya hidratados, se incubaron en una solución buffer de citratos (pH= 6) durante una noche. Posteriormente, los cortes se incubaron con el primer anticuerpo anti-G-protein coupled receptor 30 (abcam, ab39742; homología del antígeno esperado en conejo con el GPR30 humano, 87%) hecho en conejo diluido 1:100 y 1:200 para ambos músculos mPc y mBe respectivamente en una cámara húmeda a 4°C

durante una noche. Seguido de ello, los cortes se incubaron con un anticuerpo secundario Goat anti-rabbit biotinilado (1:200; Santa Cruz. Biotechnology) durante dos horas a temperatura ambiente. Después, los cortes se lavaron con una solución buffer de fosfatos (PBS; pH= 7.2) y se incubaron con el ABC durante 1 h. Para luego realizar el revelado en una solución de diaminobenzidina (DAB) al 5% y H₂O₂ al 5% en PBS hasta obtener el marcaje de las células. Finalmente, se utilizó la tinción de hematoxilina de Mayer para contrastar el marcaje de receptores inmunoreactivos, se deshidrataron los cortes en alcoholes de concentraciones ascendentes y se cubrieron con Cytoseal TM 60 y un cubreobjetos.

6.7 Expresión del GPR30

Los músculos congelados se cortaron por la mitad y fueron tratados con un homogeneizador electrónico en buffer de lisis, inhibidores de proteasas, (PMSF) 1mM y ditioneitol (DTT) 1mM. Los homegenados se centrifugaron a 13400 rpm por media hora a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford. La separación electroforética de proteínas se realizó utilizando geles de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) las muestras serán aplicadas en el gel, utilizando 100 y 75 µg de proteínas de extractos totales de mPc y mBe respectivamente. Posteriormente se separarán mediante una corriente de 100 volts con el sistema *Mini-Protean Tetra System* (Bio-Rad). Las proteínas serán transferidas a una membrana de nitrocelulosa usando el sistema *Mini Trans-Blot Cell* (Bio-Rad), aplicando una corriente de 100 volts por 60 minutos a 4°C. Después de la transferencia las membranas se tiñeron con rojo de ponceau para visualizar las bandas de proteínas. Las membranas se bloquearon con una solución de 7% de leche y en PBS-T (Na₂HPO₄ 80 mM, NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 al 0,1%, pH 7,5) durante 60 min a temperatura ambiente, para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. Las membranas se incubarán durante 16-18 hr a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente (anti-G-protein coupled receptor 30: cat.ab39742, abcam) diluido en 1% de leche y TPBS. Después serán incubadas durante 2 hr con el anticuerpo secundario correspondiente (Goat Anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology) 1:2000, diluido en 1% de leche y TPBS Las bandas inmunorreactivas se revelarán utilizando un kit de quimioluminiscencia (SuperSignal West

Pico, Pierce). Se midió la expresión de GPR30 por densitometría contra la membrana teñida con rojo de ponceau con el programa ImageJ versión 1.50i. Los resultados obtenidos serán expresados como densidad óptica.

6.8 Análisis estadístico

El análisis de resultados para los niveles de estradiol sérico y western blot se realizará mediante un análisis de varianza de una vía. Para identificar las diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre los grupos una prueba post-hoc de Tukey-Kramer y Neuman respectivamente. Se utilizara el programa de análisis estadístico Prism 5 para Windows (GraphPad).

7. RESULTADOS

7.1 Concentración sérica de estradiol

La concentración sérica de estradiol fue significativamente diferente entre los grupos C, OVX, y OVX+BE (**Fig. 9**). La prueba post-hoc indicó que esta concentración fue significativamente menor en el grupo OVX que en el C ($P < 0.0138$). En cambio, la concentración del grupo OVX+BE fue significativamente mayor que la de los grupos C y OVX ($P < 0.0001$ en cada caso).

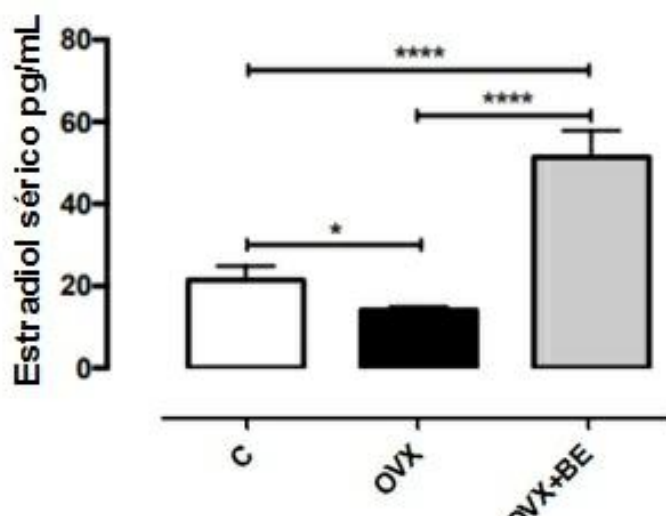


Fig. 9. Niveles de estradiol sérico en suero (pg/mL) en animales control (C), ovariectomizados (OVX) y tratados con benzoato de estradiol (OVX+BE). Los datos muestran la media \pm error estándar. La comparación entre grupos se realizó usando un ANOVA de una vía con una post-hoc de Tukey.

7.2 Expresión de GPR30 en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso

La presencia de una banda de aproximadamente 50 kDa detectada en extractos de proteínas totales de los mPc y mBe demostraron la expresión del GPR30 (**Fig. 10 A, B**).

La expresión relativa del GPR30 no fue significativamente diferente entre los grupos C, OVX, y OVX+BE ($F=0.5745$, $P=0.5778$; **Fig. 11 A, B, C**). Para el mBe, la expresión relativa del GPR30 tampoco fue diferente entre estos grupos ($F=0.6872$, $P=0.5217$; **Fig. 12 A, B, C**).

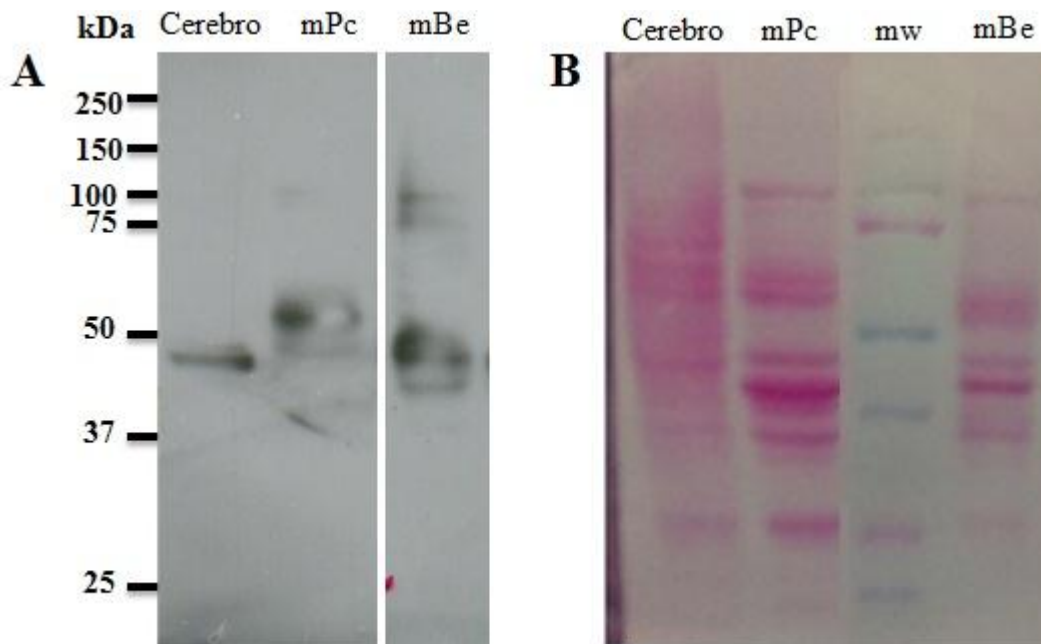


Figura 10. Inmunoblot representativo de la expresión de GPR30 de los músculos mPc, mBe y cerebro (A) en animales control. Se normalizo contra rojo de Ponceau (mPc: 100 μ g de proteína), (mBe: 75 μ g de proteína).

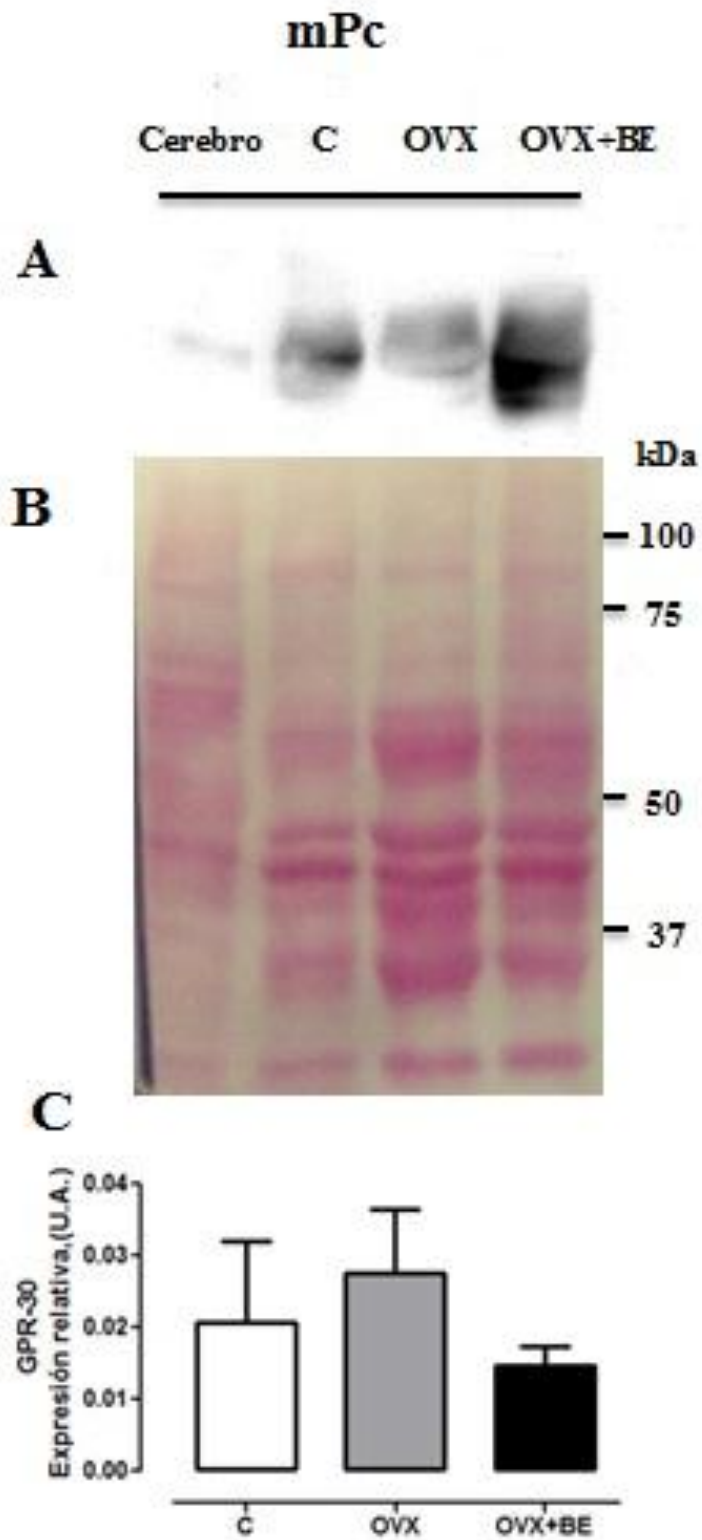


Fig. 11. Inmunoblot representativo de la expresión de GPR30 en el mPc y cuantificación de la expresión relativa entre los diferentes grupos experimentales (A-C) (mPc: 100 μ g de proteína).

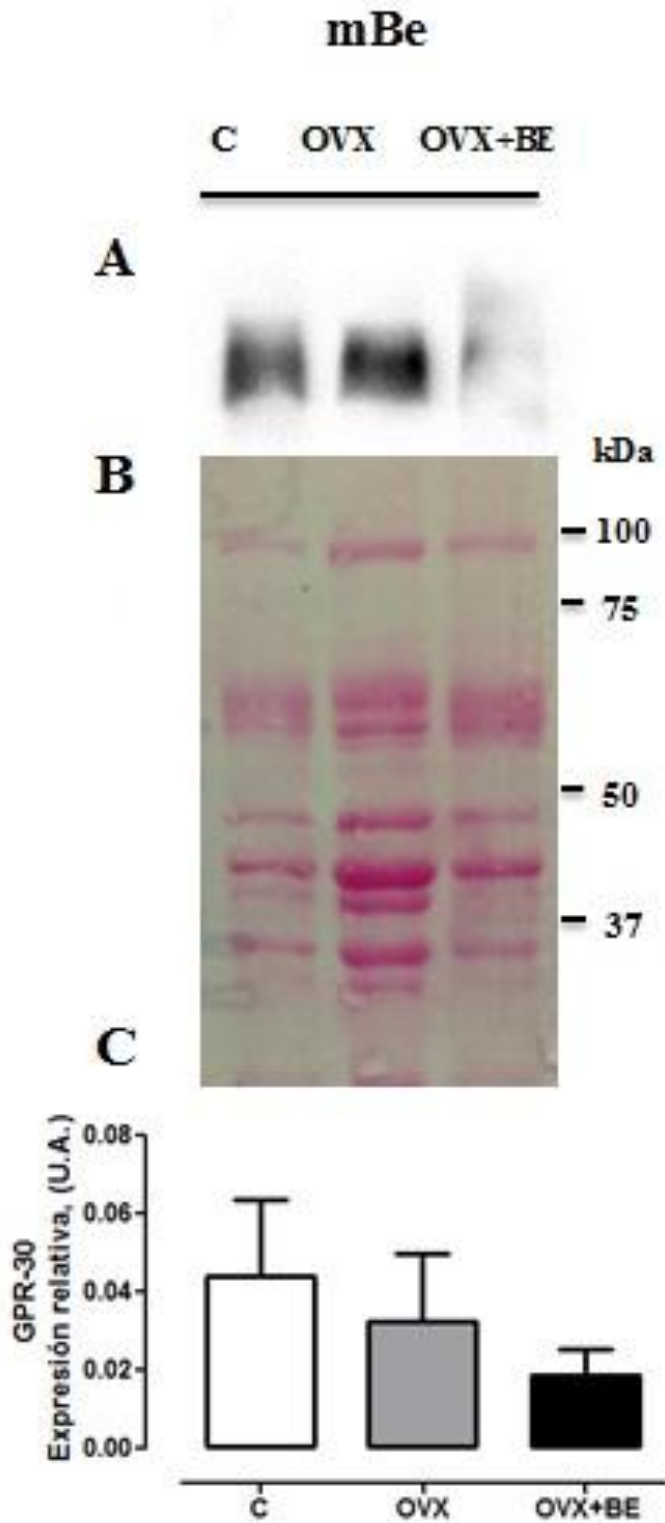


Fig. 12. Inmunoblot representativo de la expresión de GPR30 en el mBe y cuantificación de la expresión relativa entre los diferentes grupos experimentales (A-C) (mBe: 75µg de proteína).

7.3 Localización del GPR30 en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso

Para el mPc, la expresión del GPR30 se observó en algunos mionúcleos, aparentes células polimorfonucleares y capilares sanguíneos (**Fig.13 A**). Para el mBe se observó una distribución similar (**Fig. 13 D**). Ni la ovariectomía ni el tratamiento con BE parecieron alterar esta distribución en el mPc (**Fig.13 B,C**) y el mBe (**Fig.13 E,F**).

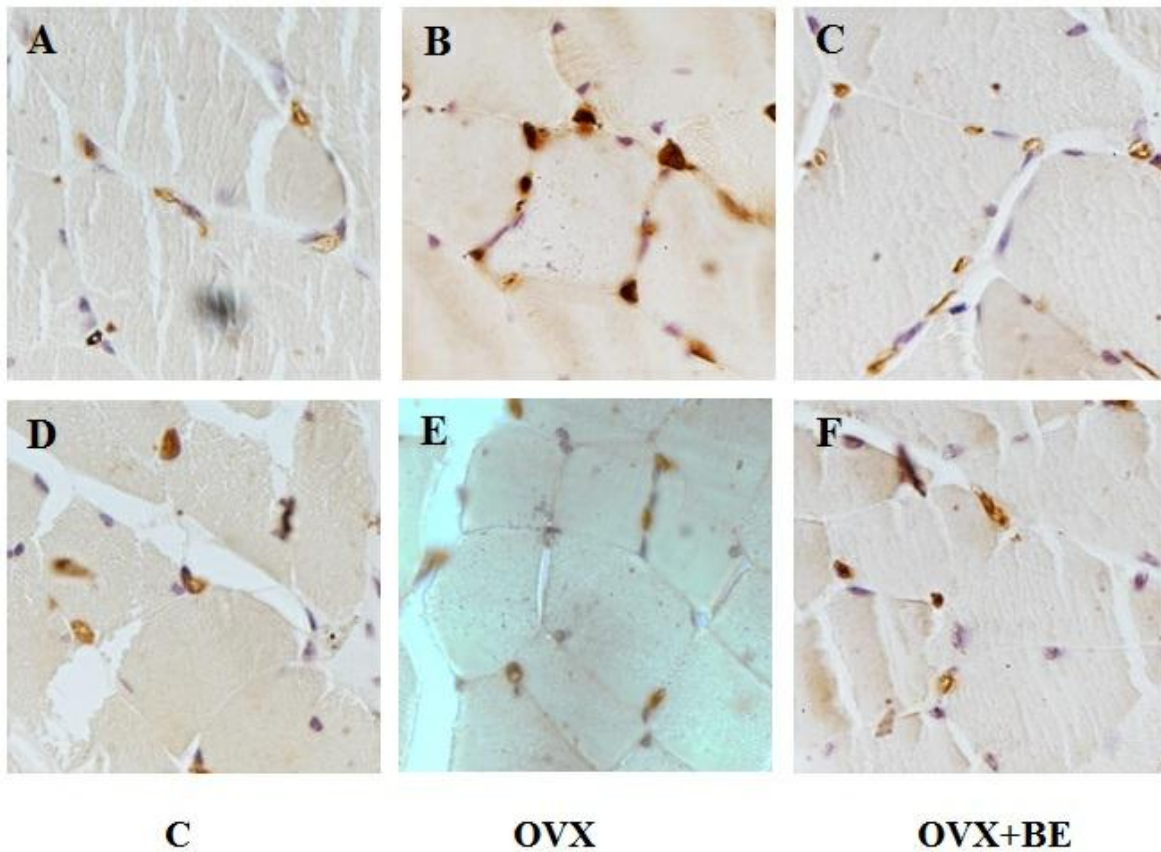


Fig. 13. Localización de GPR30 en músculos pubococcígeo (A-C) y bulboesponjoso (D-F) en conejas control (C), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas con benzoato de estradiol (OVX+BE). Cortes transversales de 7 μ m de espesor, contrateñidos con Hematoxilina.

8. DISCUSIÓN

Los hallazgos de esta tesis demuestran que el mPc y el mBe expresan el GPR30. La distribución del GPR30 se observó en miofibras (solo mionúcleos), células polimormonucleares, y capilares sanguíneos. Además, nuestros hallazgos sugieren que no existe una relación entre los niveles séricos de estradiol y la expresión del GPR30 en ambos músculos.

8.1 Niveles de estradiol sérico

Las fluctuaciones hormonales femeninas en periodos de cambio como la pubertad, embarazo o menopausia se han asociado con patologías del AUI (Akiwa y cols. 2003). Estudios realizados en conejas OVX demuestran una disminución del 50% en los estrógenos circulantes, mientras que, el tratamiento con estradiol resulta en un incremento de cinco veces (Akiwa y cols. 2003). En la rata se ha observado que hay una disminución de un 63% posterior a la OVX (Kim y col. 2004). Así mismo cuatro semanas después de la ovariectomía, Shinoda y cols. (2002) reportan que la concentración sérica de E2 disminuye en un 27%. Mientras que en el ratón, Moran y cols. (2007) muestra que hay una disminución del 50% en los niveles séricos de E2 60 días después de la ovariectomía. De acuerdo con los datos publicados por otros autores, nuestros resultados coinciden en que hay una disminución de los estrógenos circulantes 1 mes después de la OVX. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que en la coneja existe una importante aromatización extragondal, ya que los niveles de estradiol entre conejas controles y ovariectomizadas no es significativamente diferente después de 5 meses de la ovariectomía bilateral (Carrasco-Ruiz y col. 2015). Ciertamente, este proceso podría ser diferente entre especies ya que en ratas ovariectomizadas la concentración de estradiol incrementa pero no alcanza el nivel de la de ratas control (Zhao y cols. 2006).

En el grupo OVX+BE hay un aumento de aproximadamente tres veces en la concentración de estradiol sérico con respecto al grupo control, mientras que con respecto al grupo OVX el aumento es de aproximadamente cuatro veces más, por lo tanto el tratamiento con BE elude los efectos promovidos por la OVX. Como se ha reportado en la coneja Nueva Zelanda donde al utilizar una dosis de 250 mg de E₂ se observa un aumento de 11 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 control (Aikawa y cols. 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 cols. 2002). En el ratón 30 días después del tratamiento con una capsula de 18 mg de E₂ los niveles séricos aumentan al doble.

8.2 Expresión del GPR30 en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso

En el músculo esquelético Wang y cols. (2016) reportan la expresión de GPR30 en el músculo soleo de ratas viejas en ensayos de inmunotransferencia con una sola banda correspondiente en ~50kDa, por otra parte la activación de GPR30 por su agonista selectivo G1 restaura la capacidad de ejercicio y fuerza muscular en los músculos soleo y gastrocnemio en ratas brown norway OVX. Baltgalvis y col. (2010) demostraron que la expresión del gen Gpx3 y RE- α son sensibles a los estrógenos circulantes en el músculo esquelético y es más abundante RE- α que GPR.

A pesar de las escasas observaciones que otros autores han hecho acerca de la expresión del GPR30 en músculos esqueléticos (Baltgalvis y cols. 2010; Wang y cols. 2016), la participación del mPc en el almacenamiento y la del mBe en la expulsión de orina permiten especular que la activación del GPR30 en cada uno de ellos influiría diferencialmente en la micción. En este contexto es interesante considerar que la expresión del GPR30 en los vasos de las fibras musculares ha llevado a proponer que podría actuar como regulador del tono vascular (cita). Dada la diferente composición del tipo de miofibras para el mPc (oxidativas) y el mBe (glucolíticas), es posible especular que la función del GPR30 en cada uno alteraría su contractilidad.

Una de las acciones estrogénicas mejor caracterizadas en el músculo esquelético es la que modula eventos participantes en la degeneración y regeneración muscular (Enn y Tiidus 2010). Es bien conocido que la activación de REs conduce al reclutamiento de neutrófilos y macrófagos proinflamatorios en músculos de las extremidades en ratas ovariectomizadas tratadas con benzoato de estradiol (Enns y Tiidus 2010). Esta invasión de células PMN es

necesaria para el inicio de la fase de regeneración muscular que involucra la activación y diferenciación de células satélite (Enns y Tiidus 2010), también dependiente de acciones estrogénicas. Ciertamente, la estrategia utilizada para disecar la participación de acciones estrogénicas en la invasión de células PMN estuvo basada en la administración de ICI182780, un bloqueador selectivo de RE alfa y beta (Enns y Tiidus 2008). Sin embargo este compuesto actúa como agonista del GPR30. Nuestros hallazgos fortalecen la necesidad de considerar la participación del GPR30 en la respuesta inflamatoria de músculos de las extremidades y, particularmente, de los del piso pélvico. De manera interesante, la multiparidad afecta diferencialmente el daño que sufren los mPc y mBe en la coneja (López-García y cols. 2016).

En apoyo del argumento anterior, y en el contexto inflamatorio, la activación selectiva del GPR30 inhibe la expresión de citocinas inflamatorias como el IFN- γ , el factor de crecimiento tumoral tipo alfa (TNF-alfa), IL17 y CCL4 en un modelo animal de esclerosis múltiple (Blasko y col. 2009). En cultivos de neutrófilos, la activación del GPER30 extiende la vida media y promueve la activación de neutrófilos (Rodenas y col. 2017). Por otro lado, la activación de GPR30 tiene un efecto antioxidante en corazón de ratón (Wang y col. 2018). Entre los mecanismos propuestos para discutir el efecto antioxidante de la activación del GPER30 en músculo esquelético destaca la modulación de la expresión de proteínas de choque térmico (HSPs) (Wang y col. 2016). De tal manera que futuros experimentos diseñados para elucidar la participación del GPR30 deberían considerar un modelo de lesión muscular y la subsecuente evaluación de algunos de estos marcadores.

Por otro lado no hay datos que muestren si hay una mayor o menor afinidad de los estrógenos por GPR30 o los RE del subtipo α y β , por lo tanto se tendrían que realizar estudios utilizando antagonistas selectivos para los RE y con efecto agonista para GPR30 como el ICI o fulvestrant (Barton 2015). O bien agonistas selectivos a GPR30 como G1, aunque la administración subcutánea podría afectar al músculo esquelético a través de sus efectos sistémicos en todo el cuerpo (Wang y cols. 2016).

8.3 Localización de GPR30 en los músculos pubococcígeo y bulboesponjoso

El GPR30 es un nuevo receptor que se ha descrito que media efectos proliferativos inducidos por el estrógeno y algunos de sus agonistas como el tamoxifeno o fulvestrant en carcinomas de mama primarios, en un análisis inmunohistoquímico se observó la presencia de GPR30 en dos patrones distintos, predominante nuclear (53.9%) y/o predominante citoplasmático (19.3%) en células de tejido mamario (Samartzis y cols. 2014).

Méndez y cols. (2013) reportaron la presencia de GPR30 mediante inmunorreactividad con microscopía confocal en el citoplasma del epitelio en de la superficie ovárica en mujeres postmenopáusicas.

Por otro lado en ratas macho y hembra adultas se han reportado altos niveles de inmunorreactividad de GPR30 en cuerpos celulares y fibras del sistema nervioso central en el cerebro anterior, núcleos específicos del cerebro y en neuronas de Purkinje del cerebelo, en este mismo estudio se detectó la presencia de GPR30 en tejidos periféricos como: en la zona glomerulosa de la corteza en la médula suprarrenal, en células de músculo liso de pelvis renal y en células de la teca del ovario (Hazell y cols. 2009).

Pang y cols. (2005) reportan la presencia de GPR30 como una proteína capaz de responder a estrógenos localizada con uniones de alta afinidad y baja capacidad, localizado en membrana plasmática y en el retículo endoplasmático en células de cáncer de mama.

Nuestros resultados extienden esta información a músculos esqueléticos del piso pélvico de la coneja; particularmente al mPc y al mBe. Complementariamente, estos hallazgos complementan la caracterización de RE en ambos músculos del piso pélvico, estableciendo así la necesidad de considerar a los subtipos alfa y beta (López-García y cols. 2013; Carrasco-Ruiz y cols. 2015) y al GPR30 como blancos farmacológicos de las acciones estrogénicas.

8.4 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 como el mPc y uno perineal como el mBe. En mujeres postmenopáusicas se ha correlacionado la aparición IUE debido a la disminución de los niveles séricos de E_2 . En la coneja doméstica, se ha reportado que los músculos mPc y mBe son importantes para la cópula, el parto (Cruz y cols. 2002) y la micción (Corona y cols. 2009) estos músculos son sensibles a estrógenos y es posible que la disminución en los niveles séricos de E_2 influya en esta patología nosotros determinamos la expresión del receptor de estrógenos GPR30 para saber el rol que juega en estos músculos cuando son blancos para terapias de reemplazo hormonal (TRH).

Dada la controversia alrededor del uso de estrógenos en el tratamiento de la IUE (Cody y cols 2012). Y la asociación de la TRH con la aparición de algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Wang y cols. 2016), con la expresión y localización de GPR30 en tejidos cancerígenos, sería importante esclarecer el papel que juega dicho receptor al ser modulado por estrógenos.

9. CONCLUSIONES

1. El mPc y el mBe expresan el GPR30.
2. La distribución del GPR30 se observó en miofibras (solo mionúcleos), células polimormonucleares, y capilares sanguíneos.
3. No existe una relación entre los niveles séricos de estradiol y la expresión del GPR30 en ambos músculos.

10. PERSPECTIVAS

El debilitamiento de músculos del piso pélvico es una de las causas de disfunciones del piso pélvico como la incontinencia fecal, el prolapso de órganos pélvicos, y la incontinencia urinaria de esfuerzo (IUE). Estas disfunciones son muy prevalentes en mujeres durante la gestación y el postparto, y representan un problema de salud que deteriora importantemente la calidad de vida. La terapia de reemplazo hormonal es un tratamiento conservador para el manejo de la IUE, aunque es muy controversial en la actualidad. Uno de los factores que podría contribuir a esclarecer la idoneidad de este tratamiento implica caracterizar la contribución de los distintos REs en procesos fisiológicos involucrados en la fisiopatología de la IUE. Este trabajo abre la puerta a identificar la contribución del GPER30 en aspectos relacionados con la respuesta inflamatoria de los músculos bulboesponjoso y pubococcígeo en la coneja doméstica.

Si la expresión del GPR30 está relacionada con la respuesta inflamatoria muscular, y la experiencia reproductiva induce una respuesta inflamatoria particular en los músculos mPc y mBe de la coneja, entonces la participación del GPER en la respuesta inflamatoria da cada músculo es diferente en conejas gestantes y primíparas.

1. Identificar la relación entre la expresión del GPER30 y la respuesta inflamatoria en los músculos bulboesponjoso y pubococcígeo de conejas nulíparas, gestantes y primíparas.
2. Determinar el papel de la activación del GPER30 en la respuesta inflamatoria en los músculos bulboesponjoso y pubococcígeo de conejas nulíparas, gestantes y primíparas.

11. REFERENCIAS

- Abdool, Z., Shek, K. L. & Dietz, H. P. (2009). The effect of levator avulsion on hiatal dimension and function. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 201, 89–94.
- Abrams, P., Cardozo, L., Fall, M., Griffiths, D., Rosier, P., Ulmsten, U. (2002) The standardisation of terminology in lower urinary tract function. Report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn*; 21: 167-178.
- 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.
- Ashton-Miller JA, DeLancey JO. (2007) Functional anatomy of the female pelvic floor. *Ann N Y Acad Sci*;1101:266-96.
- Baltgalvis KA, Greising SM, Warren GL, Lowe DA (2010) El estrógeno regula los receptores de estrógeno y la expresión génica antioxidante en el músculo esquelético del ratón. *PLoS ONE* 5 (4): e10164.
- Barton M. Position paper: The membrane estrogen receptor GPER-Clues and questions. *Steroids* 77, 10: 935-942
- Blakeman P. J, Hilton P, Bulmer J.N (2000) Oestrogen and progesterone receptor expression in the female lower urinary tract, with reference to oestrogen status. *BJU International* 86; 32-38
- Bottino, María Cecilia, & Lanari, Claudia. (2010). Localización extra nuclear de receptores esteroides y activación de mecanismos no genómicos. *Medicina (Buenos Aires)*, 70(2), 173-184
- Boyles S. H, Li H, Mori T, Osterweil P, Guise JM. (2009) Effect of mode of delivery on the incidence of urinary incontinence in primiparus women. *Obstet Gynecol*; 113: 134-141.
- Brown M. (2008) Skeletal muscle and bone: effect of sex steroids and aging. *Advances Physiology Education* 32: 120-126.

- Burgio KL, Zyckzynski H, Locher JL, Richter HE, Redden DT, Wright KC. (2003) Urinary incontinence in the 12-month postpartum period. *Obstet Gynecol*;102: 1291-8.
- Carrasco-Ruiz MA, García-Villamar V, López-García K, Sánchez-García O, Pacheco P, Cuevas E, Martínez-Gómez M, Castelán F. (2015) Aromatase expression is linked to estrogenic sensitivity of periurethral muscles in female rabbits. *Cell Biochem Funct.*;33(4):188-95.
- Carrasco-Ruiz MA, Hernández-Aragón LG, Chávez-Ríos JR, Rodríguez-Antolín J, Pacheco P, Martínez-Gómez M, Cuevas-Romero E, Castelán F (corresponding author). High estradiol levels increase the expression of glucose transporter type 4 in the pubococcygeus but not in the iliococcygeus of female rats. *International Neurourology Journal*, en revisión.
- Cody JD, Jacobs ML, Richardson K, Moehrer B, Hextall A. (2012) Oestrogen therapy for urinary incontinence in post-menopausal women. *Cochrane Database of Systematic Reviews, Issue 10*.
- Corona-Quintanilla DL, Castelán F, Fajardo V, Manzo J, Martínez-Gómez M. (2009). Temporal coordination of pelvic and perineal striated muscle activity during micturition in female rabbits. *J Urol*; 181: 1452–1458.
- Culey J. A., Gutai J. P., Kuller L. H., Ledonne D., Powell J. G.(1989) The epidemiology of serum sex hormones in postmenopausal women. *American Journal of Epidemiology*; 129 (6): 1120-1131
- DeLancey, J. O. L., Kearney, R., Chou, Q., Speights, S., & Binno, S. (2003). The Appearance of Levator Ani Muscle Abnormalities in Magnetic Resonance Images After Vaginal Delivery. *Obstetrics and Gynecology*, 101(1), 46–53.
- Enns, D.L. & Tiidus, P.M. (2010) The Influence of Estrogen on Skeletal Muscle. *Sports Med*, 40, 41-58.
- Estudillo, G. F, Garrido, I. S, Sánchez, F. C, Nieto, B. M & Rodríguez, R. C. (2004) Incontinencia Urinaria en la mujer ¿Qué debemos saber? *Enfuro*, 91, 10-13.
- Fritel X, Ringa V, Quiboef E, Fauconnier A. (2012) Female urinary incontinence, from pregnancy to menopause: a review of epidemiological and pathophysiological findings. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 91:901–910.

- 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 β . *American Journal of Physiology* 287: E1125–E1131.
- Hannestad YS, Rortveit G, Sandvik H, Hunnskaar S. (2000) A community-based epidemiological survey of female urinary incontinence: The Norwegian EPICONT Study. *J Clin Epidemiol*; 53(11):1150-1157.
- Hazell, G. G. J., Yao, S. T., Roper, J. A., Prossnitz, E. R., O'Carroll, A.-M., & Lolait, S. J. (2009). Localization of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues. *The Journal of Endocrinology*, 202(2), 223–236.
- Hunnskaar S, Arnold E, Burgio K, Diokno A, Herzog A, Mallett V. (2000) Epidemiology and natural history of urinary incontinence. *International Urogynecology Journal*; 11(5): 301-319.
- Hvidman L, Foldspang A, Mommsen S, Bugge Nielsen J. (2002) Correlates of urinary incontinence in pregnancy. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*;13: 278-83.
- Julio E., y Marco-Franco. (2005). Fisiología de la micción. En Tresguerres J.A.F. (Ed. 3), *Fisiología humana* (pp. 432-435). México, Mex: McGraw-Hill Interamericana
- 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.
- Lara-García M, Alvarado M, Cuevas E, Cortés-sol A, Domínguez A, Tovar A, Pacheco P. (2011) The effects of castration and hormone replacement on the cross-sectional area of pubococcygeus muscle fibers in the female rat. *Anat Rec (Hoboken)*.;294(7):1242-8.
- Larionov AA, Vasylyev DA, Mason JI, Howie AF, Bernstein LM y Millyer WR. (2003) Aromatase in skeletal muscle. *Journal of Steroid Biochemistry y Molecular Biology* 84: 485-492.

- Leblanc D.R, Schneider M., Angele P., Vollmer G., Docheva D., (2017) The effect of estrogen on tendon and ligament metabolism and function. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 172: 106-116
- Lee SJ y McEwen BS. (2001) Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41:569-91.
- Lien K, Morgan D, DeLancey J, Ashton-Miller J. (2005) Pudendal nerve stretch during vaginal birth: a 3D computer simulation. *AJOG*;192:1669-1676.
- 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? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*; 169: 113–120.
- López-García K, Cuevas E, Sánchez García O, Pacheco P, MartínezGómez M, Castelán F. (2014). Differential damage and repair responses of pubococcygeus and bulbospongiosus muscles in multiparous rabbits. *Neurourol Urodyn*; in press.
- López-García K, Cuevas E, Sánchez-García O, Pacheco P, Martínez-Gómez M, Castelán F. (2016) Differential damage and repair responses of pubococcygeus and bulbospongiosus muscles in multiparous rabbits. *Neurourol Urodyn*;35(2):180-5.
- López-García K, Mariscal-Tovar S, Martínez-Gómez M, Jiménez-Estrada I, Castelán F. (2014) Fiber type characterization of striated muscles related to micturition in female rabbits. *Acta Histochem*; 116: 481–486.
- López-García K, Mariscal-Tovar S, Serrano-Meneses MA, Castelán F, Martínez-Gómez M, Jiménez-Estrada I. (2017) Fiber type composition of pubococcygeus and bulbospongiosus striated muscles is modified by multiparity in the rabbit. *Neurourol Urodyn.*;36(6):1456-1463. do
- Lozano D., Calleja O. (2010) Guía de Consulta para el Médico de Primer Nivel de Atención. Incontinencia Urinaria en la Persona Adulta Mayor. Secretaria de Salud, Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades.
- Martínez-Gómez M, Corona-Quintanilla DL, Cruz-Gómez Y, Zempoalteca R, Rodríguez-Antolín J, Castelán F. (2012) The role of pelvic and perineal muscles in

reproductive and excretory functions. En: *Applications of EMG in Clinical and Sports Medicine*, Steele C (ed). Rijeka. Intech. pp. 269-88.

- Matthews J., Gustafsoon J.A. (2003) Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol. Interv.*, 3 (5): 281-292
- McClung JM, Davis JM, Wilson MA, Goldsmith y Carson JA. (2006) Estrogen status and skeletal muscle recovery from disuse atrophy. *Journal of Applied Physiology*. 100: 2012-2023.
- Mendez, C., Morales-Vasquez, F., Perez-Montiel, D., Gomora, M. J., Espinola-Zetina, C., Hernandez-Martinez, A., Pedernera, E. (2013). Estrogen and androgen receptor expression in surface epithelium and inclusion cyst in the ovary of premenopausal and postmenopausal women. *Journal of Ovarian Research*, 6, 85.
- 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. *Journal of Applied Physiology*. 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. *Journal of Applied Physiology* 100: 548-559.
- Parente MPL, Natal-Jorge RM, Mascarenhas T, Fernandes AA, Martins JAC. (2008) Deformation of the pelvic floor muscles during a vaginal delivery. *Int Urogynecol J*;19: 65-71.
- Prossnitz, Eric R., Arterburn, Jeffrey B., Smith, Hrriet O., Oprea, Tudor I., Sklar, Larry A. & Hathaway Helen J. (2008) Estrogen Signaling through the Transmembrane G Protein-Coupled Receptor GPR30. *Annu. Rev. Physiol*, 70:165-90.
- Rodenas M.C., Tamassia N., Cabas I., Calzetti F., Mesenguer J., Cassatella M.A., García-Ayala A., Mulero V., (2017) G protein-couple estrogen receptor 1 regulates human neutrophil fuction. *Biomed Hub* 2:454981
- Samartzis, E. P., Noske, A., Meisel, A., Varga, Z., Fink, D., & Imesch, P. (2014). The G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) Is Expressed in Two Different Subcellular Localizations Reflecting Distinct Tumor Properties in Breast Cancer. *PLoS ONE*, 9(1), e83296.

- Scharoder A., Abrams P., Andersson K-E., Artibani W., Chapple C.R., Drake M., Hampell C., Neisius A., Tubaru A., Thurof, J.W (2010) Guía clínica sobre la incontinencia urinaria. *European association of urology*; 779-841.
- Sharma G., Prossnitz E.R. (2017) G-Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) and Sex-Specific Metabolic Homeostasis. *Sex and Gender Factors Affecting Metabolic Homeostasis, Diabetes and Obesity. Advances in Experimental Medicine and Biology*; 1043: 427-453
- 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.
- Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. (2005) Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*; 146: 624-32.
- Thor KB, de Groat WC. (2010) Neural control of the female urethral and anal rhabdosphincters and pelvic floor muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*;299(2):R416-38.
- Velázquez-Magaña M, Aguirre-Ramos G, Álvarez-Valero R, Méndez-González J.A, González-Cofrades J. (2007) Incontinencia urinaria en mujeres del Distrito Federal. *An Med (Mex)*; 52(1): 14-21..
- Viktrup L, Rortveit G, Lose G. (2006) Risk of stress urinary incontinence twelve years after the first pregnancy and delivery. *Obstet Gynecol*;108:248-54.
- Wang H, Alencar A, Lin M, Sun X, Sudo RT, Zapata-Sudo G, Lowe DA, Groban L. (2016) Activation of GPR30 improves exercise capacity and skeletal muscle strength in senescent female Fischer344 × Brown Norway rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 17;475(1):81-6.
- Withford HM, Alder B, Jones M. (2007) A cross-sectional study of knowledge and practice of pelvic floor exercises during pregnancy and associated symptoms of stress urinary incontinence in North-East Scotland. *Midwifery*; 23(2): 204-217.

