



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

**RELEVANCIA DE LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES DE
ESTRÓGENOS EN EL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS
DE MÚSCULOS PÉLVICOS DE LA RATA HEMBRA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Guadalupe Citlaly Hernández Hernández

DIRECTOR

Dr. Francisco Castelán

Tlaxcala, Tlax.

Julio 2019



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

**RELEVANCIA DE LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES DE
ESTRÓGENOS EN EL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS
DE MÚSCULOS PÉLVICOS DE LA RATA HEMBRA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Guadalupe Citlaly Hernández Hernández

Comité Tutorial:

Dr. Francisco Castelán

Dr. Arturo Ortega Soto

Dra. Leticia Nicolás Toledo

Dra. María de los Ángeles Carrasco Ruiz

Tlaxcala, Tlax.

Julio 2019

FINANCIAMIENTO

El trabajo experimental se realizó en el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Foránea Tlaxcala del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, y bajo la dirección del Dr. Francisco Castelán. Se contó con el apoyo técnico del Biol. Jesús Ramsés Chávez Ríos y la Q.F.B Laura García. Esta tesis es requisito para obtener el grado de Maestría en el Programa de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, registrado en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

Para su desarrollo se contó con el financiamiento PAPIIT-UNAM IA203617 a FC: y beca CONACYT 861149 a GCHH.



Universidad
Autónoma de
Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado



**COORDINACIÓN POSGRADO 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 **Guadalupe Citlaly Hernández Hernández** 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 **“Relevancia de la activación de receptores de estrógenos en el metabolismo de carbohidratos de músculos pélvicos de la rata hembra”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., 26 DE JULIO 2019

DR. FRANCISCO CASTELÁN

DR. ARTURO ORTEGA SOTO

DRA. LETICIA NICOLAS TOLEDO

DRA. MARÍA DE LOS ANGELES
CARRASCO RUÍZ

DR. JORGE RODRÍGUEZ ANTOLÍN



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



AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala por haberme permitido ser parte de ellos a través de la maestría, por otorgarme los conocimientos necesarios y fundamentales para mi crecimiento profesional.

Al Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional. Padrón Nacional de Posgrado (PNP). Por los financiamientos PAPIIT-UNAM IA203617 a FC: y beca CONACYT 861149 a GCHH.

A los miembros del Comité al Dr. Arturo Ortega Soto, a la Dra. Leticia Nicolas Toledo, a la Dra. María de los Ángeles Carrasco Ruiz por la dedicación en cada tutorial y cuando los necesitaba, por siempre alentarme a pensar de una manera diferente y aportar de sus conocimientos en el proyecto que realice.

A mi director de tesis al Dr. Francisco Castelán por aceptarme en su grupo de trabajo por siempre creer en mí, alentarme, motivarme, ayudarme y guiarme en mi estudio por la maestría, por jamás dejarme caer, gracias por su paciencia al explicarme el proyecto hasta que me quedara claro. Gracias por siempre estar atento a mis dudas, por su gran disposición, por sus conocimientos, por el gran afecto que le tiene a sus estuantes pero sobre todo por su dedicación al conocimiento.

A Ramsés Chávez Ríos por su gran asistencia técnica en los experimentos que realice, gracias por su dedicación y comprensión, a la Dra. María de los Ángeles por explicarme cada experimento y siempre estar ahí para aclararme mis dudas, gracias por su ayuda en los experimentos y en cada tutorial, son parte fundamental de este gran proyecto.

A mis padres, por la confianza y siempre alentarme a seguir adelante, por ser mi mejor publico para explicarle mi proyecto en cada tutorial aunque no entendieran en su totalidad el tema de investigación, por su amor, esfuerzo, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí. ¡Es un orgullo ser su hija!

Gracias a mis hermanos y sobrino Alexander por la paciencia y todo el apoyo en esta gran etapa de mi vida.

A ti Luis por alentarme todos los días, por la dedicación y paciencia con la que cada día te preocupabas por mí, por tu cariño, por tu amor y las grandes manifestaciones de afecto, por siempre preguntar ¿Cómo te fue?, pero sobre todo por tu paciencia al explicarte mi proyecto y a las observaciones que realizabas.

A mis compañeros de laboratorio Sharet Rodríguez, Verónica Orozco, Omar Vargas, quienes sin esperar nada a cambio compartieron su conocimiento y alegrías conmigo. Gracias Sharet

por tu ayuda en los experimentos y en todo, aunque a veces nos enojábamos sabíamos que el trabajo era primero, pero siempre haciendo un gran equipo ¡Gracias!, Y a todas aquellas personas que durante estos 2 años estuvieron a mi lado apoyándome (chicos de servicio social, compañeros de otros laboratorios, compañeros de cubículo y doctores), gracias por ser parte de este gran sueño.

RESUMEN

En vertebrados, los estrógenos participan en diferentes funciones del músculo estriado que incluyen el metabolismo, la mecánica contráctil y la regeneración muscular. Todas estas son fundamentales para la contracción muscular. La mayoría de esta información proviene de estudios realizados en músculos de las extremidades y desconoce acerca de los efectos estrogénicos ejercidos sobre músculos estriados del área pélvica que cumplen funciones relevantes.

Resulta contradictorio pues la terapia de reemplazo hormonal basada en estrógenos ha sido utilizada frecuentemente para tratar algunas disfunciones relacionadas con alteraciones de músculos del área pélvica en mujeres, como la incontinencia urinaria de esfuerzo. En la controversia actual a la idoneidad de esta terapia estrogénica, existe la necesidad de generar conocimiento básico que contribuya en la elaboración de hipótesis más precisas acerca de los efectos que los estrógenos ejercen sobre la estructura y función de músculos estriados del área pélvica.

Los músculos estriados del piso pélvico, pubococcígeo e iliococcígeo, participan en procesos reproductivos y excretores. La importancia de dicha musculatura es señalada por diversas patologías ocasionadas por su disfunción, entre ellas la incontinencia urinaria de esfuerzo. La IU es una patología común en mujeres postmenopáusicas debido a la disminución de estrógenos. Sin embargo, existen efectos secundarios adversos.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Abreviatura	Definición
RE – α	Receptor de Estrógenos Beta
RE – β	Receptor de Estrógenos Alfa
mPc	Músculo Pubococcígeo
mIc	Músculo Iliococcígeo
IUE	Incontinencia Urinaria de Esfuerzo
mCc	Músculo Coccígeo
mLc	Músculo Iliocaudal
Glut4	Transportador de Glucosa Tipo 4
IRS	Sustrato Receptor de Insulina
PI3K	Fosfoinosítido 3-quinasa
Akt	Proteína Quinasa B
AMPK	Proteína Quinasa Activada por AMP
RE	Receptores de Estrógenos
E2	Estradiol
GPR30	Receptor de Membrana GPR30
RN	Receptores Nucleares
OVX	Ovariectomía
MPP	Antagonista Selectivo del RE α
PHTTP	Antagonista Selectivo del RE β
DMSO	Dimetil Sulfóxido

ÍNDICE

ANTECEDENTES	1
<i>Tejido Muscular</i>	1
<i>Músculo esquelético</i>	1
<i>Músculos esqueléticos del piso pélvico de la rata</i>	3
<i>Respuestas en la expresión de los receptores de estrógenos y Glut 4</i>	5
<i>Músculos pélvicos de la rata y sensibilidad a estrógenos</i>	8
JUSTIFICACIÓN	12
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	14
<i>Objetivo general</i>	14
<i>Objetivos específicos</i>	14
METODOLOGÍA	15

MÉTODOS	16
<i>Cuantificación de analitos séricos (estradiol, glucosa, insulina)</i>	16
<i>Inmunodetección en fase sólida</i>	16
<i>Cuantificación de glucógeno</i>	17
<i>Análisis estadístico</i>	18
DISEÑO EXPERIMENTAL	19
RESULTADOS	20
<i>Análisis de macrovariables</i>	20
<i>Concentración de estradiol sérico</i>	22
<i>Expresión del transportador de glucosa tipo 4 (Glut4)</i>	23
<i>Contenido de glucógeno en el mPc y el mIc</i>	25
<i>Expresión de receptor de estrógenos alfa (RE-α)</i>	26
<i>Cuantificación de la expresión del receptor de estrógenos alfa en el mPc y mIc</i>	27
<i>Expresión de receptor de estrógenos beta (RE-β)</i>	28
<i>Cuantificación de la expresión del receptor de estrógenos beta en el mPc y mIc</i>	29
DISCUSIÓN	30

Niveles de estradiol sérico	30
Metabolismo de glucosa	31
Expresión del receptor de estrógenos alfa y beta	33
Aporte biomédico	34
CONCLUSIÓN	35
PERSPECTIVAS	36
BIBLIOGRAFÍA	37

ANTECEDENTES

Tejido Muscular

El músculo es un tejido dinámico, dependiente del equilibrio entre la síntesis y la degradación de proteínas, que contribuye a múltiples funciones corporales (Frontera & Ochala, 2015).

Hay tres tipos tejidos musculares: esquelético, cardíaco y liso, y difieren entre sí en su anatomía microscópica, localización y control con participación del sistema nervioso y del sistema endocrino (Tortora, 2000).

Los músculos cumplen cuatro funciones claves mediante la contracción sostenida y la relajación alternante: producción de movimientos corporales, estabilización de la posición del cuerpo, almacenamiento y movilización de sustancias dentro del cuerpo y generar calor (Tortora, 2000; Wolfe, 2006).

El tejido muscular tiene cuatro propiedades que permite funcionar y contribuir a la homeostasis (Tortora, 2000). Excitabilidad eléctrica, contractilidad, extensibilidad y elasticidad (Tortora, 2000; Wolfe, 2006)). Es responsable del movimiento de los organismos y de sus órganos. La función de la mayoría de los músculos se centra en la producción de movimientos de manera eficaz (Wolfe, 2006):(Tortora, 2000).

Músculo esquelético

El músculo esquelético es un órgano independiente compuesto por cientos o miles de células denominadas fibras musculares (Tortora, 2000). Está conformado de haces de células musculares largas y cilíndricas, las cuales están rodeadas por tejido conectivo, denominados endomisio, perimisio y epimisio (desde la parte interna a la más externa) que brinda elasticidad al músculo. (Figura 1) (Frontera & Ochala, 2015):(Thomas, 2013). Contribuye a funciones importantes y entre la principal es convertir la energía química en energía mecánica para generar fuerza y como resultado mantener la postura, así como la producción de

movimientos que permiten participar en diferentes actividades cotidianas (Frontera & Ochala, 2015; Wolfe, 2006).

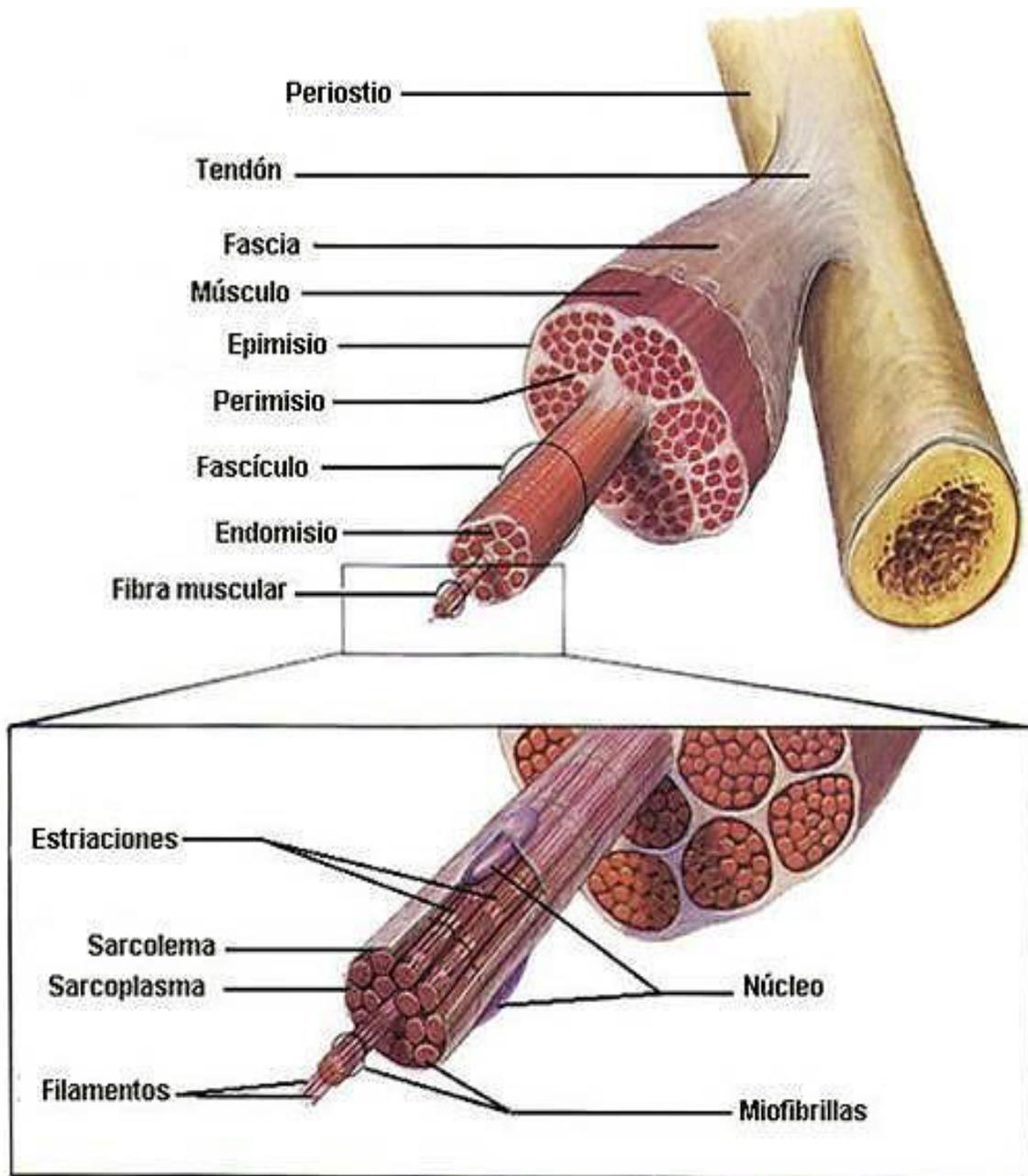


Figura 1. Estructura del músculo esquelético.

Se conforma de células musculares estriadas esqueléticas, son células muy alargadas dispuestas en paralelo formando haces o láminas. Son células no ramificadas y presentan una longitud que puede ir desde unos pocos mm a los 30 cm, con un diámetro de entre 10 a 100 μm . Son multinucleadas (sincitios: dos o más núcleos compartiendo el mismo citoplasma) y sus núcleos se disponen en la periferia celular. El aspecto estriado de las fibras musculares se debe a la disposición especial de los filamentos de actina y miosina de su citoplasma, conjuntamente denominadas miofibrillas, los cuales se organizan en haces paralelos al eje principal de la célula. Las bandas oscuras corresponden a la superposición entre filamentos actina y de miosina, y las claras sólo a filamentos de actina. Las células musculares, aunque pueden incrementar y disminuir su tamaño (hipertrofia), no se suelen dividir en condiciones normales (Frontera & Ochala, 2015; Ottenheijm & Granzier, 2010; Tortora, 2000).

El músculo esquelético proporciona un excelente modelo manejable para estudiar la regeneración y las funciones relativas metabólicas de las células después de una única o repetida serie de lesiones.

Músculos esqueléticos del piso pélvico de la rata

Los músculos estriados del piso pélvico forman un complejo funcional muy importante excreción y reproducción. Forman una estructura similar a una hamaca que cierra la salida pélvica y sostiene las vísceras pélvicas para mantener su posición (Ashton-Miller., 2001). Los músculos pélvicos forman un soporte unido a la pelvis, el cóccix, los ligamentos pélvicos y los órganos vesicales (Wall., 1993). En ratas hembras, el pubococcígeo (mPc) y el iliococcígeo (mIc) están principalmente inervados por el nervio elevador del ano del tronco L6-S1 (Bremer, Barber, Coates, Dolber, & Thor, 2003; Jiang & Damaser, 2011).

En la rata, un grupo de músculos del piso pélvico tiene una participación activa y comprende al músculo pubococcígeo (mPc), (mCc) e iliococcígeo (mIc) (Wyndaele & Poortmans, 2006).

Los músculos estriados del piso pélvico cumplen funciones relevantes para la excreción y reproducción. El debilitamiento de estos, está frecuentemente asociado con la distensión a la que se someten durante el parto, siendo un factor de riesgo importante para padecer incontinencia urinaria de esfuerzo (IUE). Se sabe que el parto vaginal conduce a trastornos del piso pélvico siendo multifactoriales e incluyen daño a nervios (Snooks, Swash, Mathers, & Henry, 1990) tejido conectivo (Rahn, Ruff, Brown, Tibbals, & Word, 2008):(Frontera & Ochala, 2015; Memon & Handa, 2013) y músculos pélvicos lisos y estriados(Catanzarite et al., 2018). Estudios clínicos sugieren que el trauma en los músculos del piso pélvico es el resultado de demandas mecánicas durante el parto que exceden los límites fisiológicos del músculo esquelético por una lesión muscular significativa en las extremidades ocurre de manera cuando existe estiramiento muscular mayor >60% de la longitud (Catanzarite et al., 2018).

El músculo pubococcígeo es el músculo estriado más grande del suelo pélvico en la rata hembra, se origina en la cara interna del hueso pélvico a nivel del acetábulo y se inserta en la tercera y cuarta vértebra caudal (Brink & Pfaff, 1980). Con motoneuronas que se encuentran en los segmentos L6-S1 (Brink & Pfaff, 1980; Cuevas, Camacho, Alvarado, Hudson, & Pacheco, 2006). Las motoneuronas de este músculo son activadas por reflejo mediante una estimulación mecánica (M. Martinez-Gomez, Chirino, Beyer, Komisaruk, & Pacheco, 1992; Pacheco, Martinez-Gomez, Whipple, Beyer, & Komisaruk, 1989). El iliococcígeo tiene su origen en el borde ventromedial del eje posterior a la muesca glútea a nivel del acetábulo (Poortmans & Wyndaele, 1998)

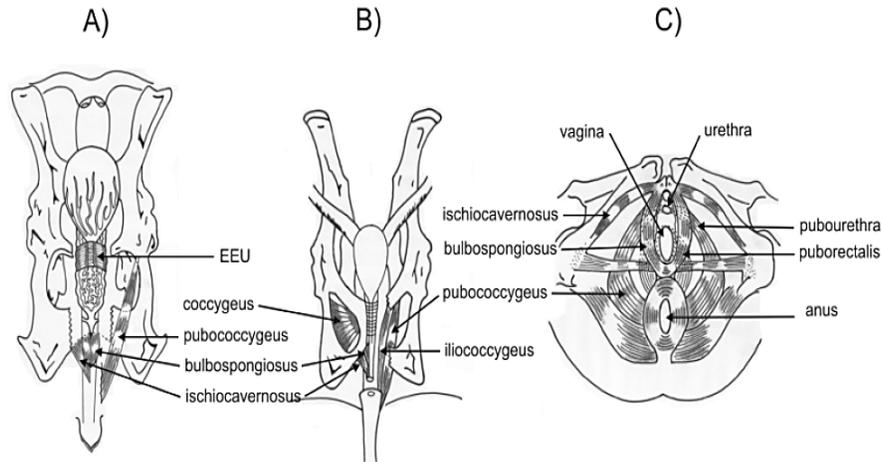


Figura 2: Músculos pélvicos y perineales en la coneja (A), rata hembra (B) y en mujer (C)

La rata de laboratorio se ha utilizado frecuentemente para evaluar la organización y la función de los músculos esqueléticos del piso pélvico (Cruz et al., 2011; Jiang & Damaser, 2011). Se conoce que los músculos como el pubococcígeo e iliococcígeo se activan de manera refleja durante la estimulación genital, el movimiento de la cola y durante la fase de almacenamiento de la orina en el proceso de la micción (Cruz et al., 2011; M. Martinez-Gomez et al., 1992). Ambos músculos están inervados por el nervio elevador del ano a través de las ramas iliocaudal (el mLc) y pubocaudal (el mPc) (Bremer et al., 2003) y están constituidos principalmente por fibras de contracción rápida e intermedia (tipos IIA y IIB) (Wyndaele & Poortmans, 2006). Los músculos iliococcígeo y el pubococcígeo, muestran una contracción máxima (Bremer et al., 2003; Poortmans & Wyndaele, 1998).

Respuestas en la expresión de los receptores de estrógenos y Glut 4

El transportador de glucosa tipo 4 (Glut4) media hasta el 90% de la captación de glucosa por medio de la insulina en los músculos esqueléticos adultos, desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa (Richter & Hargreaves, 2013). La señalización de la insulina promueve la translocación de las vesículas que contienen Glut4 al

sarcolema y facilita la expresión de Glut4 (Im, Kwon, Kim, Kim, & Ahn, 2007). Presenta alta afinidad por la glucosa y se expresa en tejidos sensibles a la insulina, como el músculo esquelético, el tejido adiposo o el corazón. Actualmente se sabe que la insulina estimula la incorporación del Glut4 a la membrana plasmática a partir de vesículas, incrementando el transporte de la glucosa. (Im et al., 2007)

La insulina es una hormona muy importante para el metabolismo, regula el metabolismo de los carbohidratos y la absorción de glucosa en los tejidos sensibles a la insulina (Eckel, Grundy, & Zimmet, 2005; Im et al., 2007).

Cuando la insulina se une a sus receptores, la insulina activa una cascada de fosforilación que involucra varias proteínas, entre ellas el sustrato receptor de insulina (IRS), fosfoinosítido 3-quinasas (PI3K), proteína quinasa B (Akt) y proteína quinasa activada por AMP (AMPK). , y conduce a la translocación del transportador de glucosa 4 (Glut4) de vesículas citoplasmáticas a la membrana celular. Una vez anclado en la membrana plasmática, Glut4 permite el transporte de glucosa a la célula (Figura 3). Glut4 está altamente expresado en el músculo, capaz de ser anclado a la membrana para facilitar el paso a la captación de glucosa inducida por la insulina (Karlsson et al., 2005).

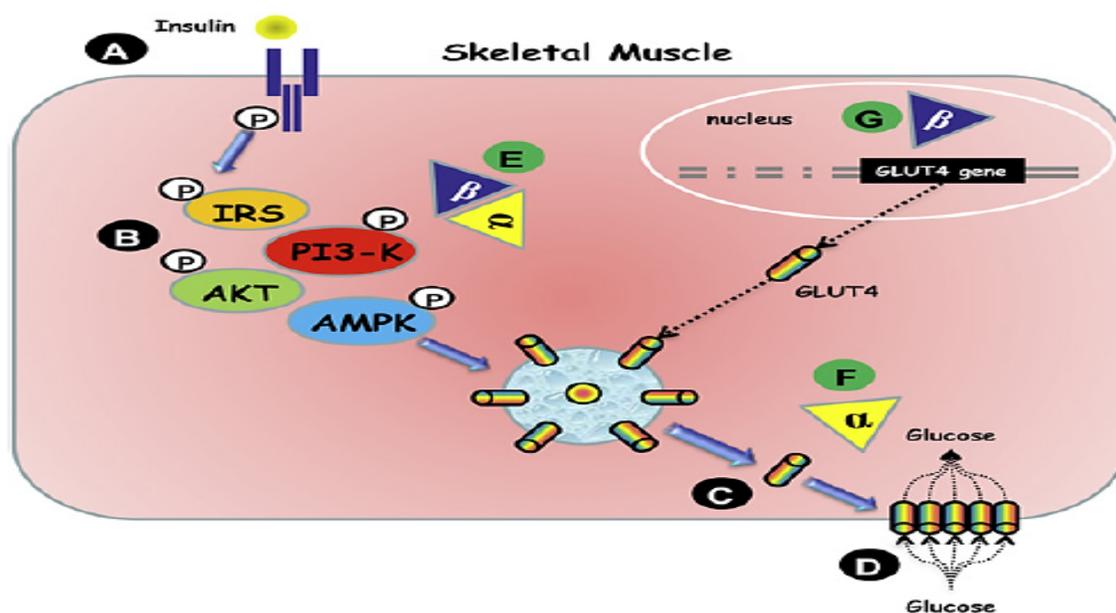


Figura 3. Cascada de señalización en la expresión de GLUT4 en el músculo esquelético. (Barros & Gustafsson, 2011)

El transportador de glucosa tipo 4 (Glut4) es una proteína blanco de acciones genómicas y no genómicas que los estrógenos ejercen en el músculo esquelético (Barros & Gustafsson, 2011). La función de Glut4 es responsable de la mayor parte de la captura de glucosa en el músculo de individuos y su inserción en el sarcolema es dependiente de insulina (Gupte, Pownall, & Hamilton, 2015). Sin embargo, la tasa de transporte de glucosa a las células musculares está limitada por la concentración de Glut4 en la superficie de la célula (Barros, Machado, Warner, & Gustafsson, 2006; Gupte et al., 2015).

No obstante, las acciones genómicas favorecen la expresión de Glut4, las iniciadas por el RE-alfa, pero no por el RE-beta (Barros R., 2011). En cambio, las acciones no genómicas iniciadas por el RE-alfa favorecen la translocación de vesículas de Glut4 del sarcoplasma al sarcolema mientras que las de RE-beta la impiden ((Barros et al., 2006; Gupte et al., 2015))(Barros & Gustafsson, 2011), ciertamente la activación del RE-alfa involucra proteínas de señalización del receptor de insulina (Barros & Gustafsson, 2011). De manera relevante, en estudios se observa mayor expresión de Glut4 en la fase proestro, cuando el organismo tiene una concentración elevada de estradiol sérico, así mismo, se ha observado una alta concentración de insulina (Morimoto, Cerbón, Alvarez-Alvarez, Romero-Navarro, & Díaz-Sánchez, 2001) y con un aparente incremento del contenido de glucógeno en el mPc pero no en el mIc de la rata hembra (Carrasco-Ruiz et al., 2018).

La activación de receptores de estrógeno alfa ($ER\alpha$) y beta ($ER\beta$) ejerce efectos opuestos sobre la regulación de glucosa muscular (Foryst-Ludwig & Kintscher, 2010).

La expresión de Glut4 en la membrana depende en gran medida del $ER\alpha$ (Barros et al., 2006). Es posible que las fluctuaciones hormonales y la disminución de hormonas gonadales por efecto de la ovariectomía podrían modular la capacidad de síntesis local y el metabolismo de la glucosa.

Músculos pélvicos de la rata y sensibilidad a estrógenos

Los músculos estriados del piso pélvico cumplen funciones relevantes para la excreción y reproducción (Barros et al., 2006; Margarita Martinez-Gomez et al., 2012). No obstante, evidencia se percata y advierte sobre la relevancia del factor hormonal, particularmente los estrógenos (Fritel, Ringa, Quiboef, & Fauconnier, 2012; Pereira et al., 2016). Si bien se conoce que algunos músculos pélvicos expresan diversos subtipos del receptor de estrógenos (RE) (Copas, Bukovsky, Asbury, Elder, & Caudle, 2001; Söderberg et al., 2007).

Las acciones estrogénicas en el músculo esquelético estriado se conocen con detalle; entre ellas las relevantes para el metabolismo, la contractilidad y la regeneración muscular, mismas que pueden diferir entre distintos músculos. (Barros et al., 2006; Moran, Nelson, Landisch, Warren, & Lowe, 2007). Durante los períodos perimenopáusico y postmenopáusico, hay un notable descenso en la fuerza muscular que puede revertirse mediante la terapia de reemplazo hormonal (TRH), lo que sugiere que los estrógenos y la progesterona son moduladores importantes de la fisiología muscular (Phillips., 1993).

Estudios recientes proponen que los cambios hormonales tienen un efecto sobre la capacidad del músculo esquelético para regular su plasticidad y su masa (McClung, Davis, Wilson, Goldsmith, & Carson, 2006).

El músculo esquelético es un tejido sensible a esteroides sexuales, ya que expresa receptores para andrógenos y estrógenos (Glenmark et al., 2004). Se desconocen los mecanismos por los cuales E2, a través de sus acciones sobre el músculo, regula el metabolismo. Sin embargo datos sugieren que el E2 es beneficioso para la sensibilidad a la insulina, y está relacionado con la resistencia a la insulina (Livingstone., 2002).

A nivel celular, E2 debe unirse a los receptores de estrógeno (RE) para ejercer sus efectos. En respuesta al tratamiento con E2, los receptores de estrógenos autorregulan su expresión para mantener la función fisiológica normal (Bagamasbad & Denver, 2011; Glenmark et al., 2004). Se han identificado varios tipos de RE, incluidos los receptores nucleares ER α y ER β , y el receptor de membrana GPR30 (Wibowo, Calich, Currie, & Wassersug, 2015). Estudios en roedores hembras sugieren que la privación de hormonas puede alterar

la autorregulación de los receptores de estrógenos en algunas áreas del cerebro que están involucradas con el comportamiento sexual y la cognición, (Bohacek & Daniel, 2009; Wibowo et al., 2015), así como en los músculos del piso pélvico. Los ER se expresan en estos tejidos (Wibowo et al., 2015), lo que sugiere que E2 puede modular sus funciones.

Las hormonas esteroides desempeñan un papel fundamental en el desarrollo, en la fisiología y el comportamiento. El modo clásico de señalización de estas hormonas es a través de la unión a sus receptores nucleares afines (RN), factores de transcripción que son activados por un ligando que regulan la transcripción en un subconjunto de genes expresados por una célula (Bagamasbad & Denver, 2011; Glenmark et al., 2004). Al unirse el ligando, los receptores nucleares experimentan un cambio conformacional y que resulta en la liberación de componentes del complejo chaperón, siendo una secuencia de localización nuclear, cuando ocurre la translocación al núcleo se asocian con la cromatina y regulan la transcripción de genes (Mangelsdorf et al., 1995).

Las principales hormonas estrogénicas que biosintetiza el organismo son: el estradiol, la estrona y el estriol (Figura 4). El sitio principal de biosíntesis de los estrógenos es la célula de la granulosa del ovario a partir de colesterol y andrógenos como intermediarios. Los estrógenos, son hormonas esteroides que controlan una gran variedad de procesos fisiológicos entre los que se encuentran los reproductivos y los no reproductivos (Jellinck, Lee, & McEwen, 2001; Mangelsdorf et al., 1995).

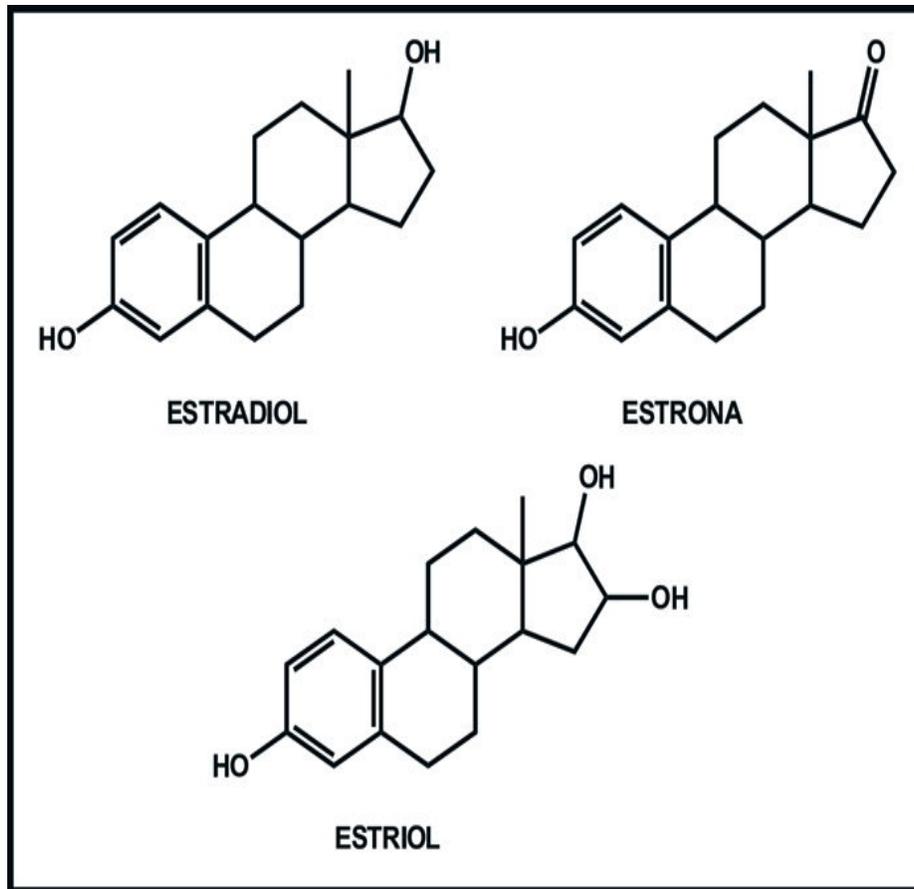


Figura 4. Hormonas estrogénicas. (Espinoza. 2011)

El estradiol (E2) es considerado más que una hormona reproductiva femenina. Esta actúa de manera casi ubicua en el cuerpo humano, está involucrado en procesos fisiológicos y patológicos tanto en hombres como en mujeres, es conocido para modular la sensibilidad a la insulina y, así mismo la homeostasis de la glucosa, pero los mecanismos aún no se entienden claramente (Barros et al., 2006).

Con la pérdida reducción de los niveles séricos de estradiol asociada con la falla ovárica, la capacidad de generación de fuerza de los músculos de los miembros posteriores disminuye (Moran, Warren, & Lowe, 2006). Después de la sustitución con E2, esta baja en la fuerza se recupera totalmente, mostrando que el E2 es una hormona que afecta la función del músculo esquelético y la calidad (Moran et al., 2007, 2006).

La ovariectomía (OVX) elimina la fuente principal de estas hormonas. Sin embargo, el estro puede restablecerse mediante una variedad de regímenes de hormonas administradas (Brandling-Bennett, Blasberg, & Clark, 1999).

Los ensayos de radiolingando e inmunohistoquímica realizados en muestras del complejo muscular levador del ani (Brink & Pfaff, 1980), que incluyen los músculos coccígeos, iliococcígeo y pubococcígeo apoyan la expresión del RE-alfa y sugiere que los músculos pélvicos de la rata son sensibles a las acciones estrogénicas. Estos hallazgos sustentan la participación de los estrógenos en la plasticidad de la inervación (Brink & Pfaff, 1980; Cuevas et al., 2006), el metabolismo de la glucosa (Brink & Pfaff, 1980) y la morfología de los músculos pélvicos (Lara-García et al., 2011; Alvarado et al., 2008).

Sin embargo, las diferencias en los niveles relativos de estrógenos pueden influir en la expresión de Glut4 en el músculo pobococcígeo. Por lo tanto, hallazgos mencionados en ratas ovariectomizadas tratadas con benzoato de estradiol, apoya la idea de que las acciones estrogénicas están involucradas. En contraste, encuentran cambios en el músculo pobococcígeo pero no en el iliococcígeo. Los hallazgos en este estudio sugieren que los niveles altos de estradiol están relacionados con una mayor expresión de Glut4 y el contenido de glucógeno en el músculo pubococcígeo, pero no en el músculo iliococcígeo, aunque ambos músculos expresan RE. Esta información apunta a que la participación de acciones hormonales ováricas debe analizarse. (Carrasco-Ruiz et al., 2018). En la controversia actual que envuelve a la idoneidad de esta terapia estrogénica. Asimismo, existe la necesidad a de generar conocimiento básico que contribuya a información más precisa acerca de los efectos que los estrógenos ejercen sobre la estructura y función de los músculos estriados del área pélvica.

JUSTIFICACIÓN

Los estrógenos juegan un rol importante en la regulación de la fisiología del aparato urogenital inferior y han sido considerados como tratamiento de patologías que incluyen la incontinencia urinaria de esfuerzo. Considerando que los estrógenos actúan a través de la interacción con diversos tipos de receptores, reconocemos que identificar la contribución particular de estos receptores es fundamental para conocer la relevancia de las acciones estrogénicas en los músculos del piso pélvico. La participación de la musculatura pélvica en procesos reproductivos y excretorios es de gran importancia. La terapia de reemplazo hormonal basada en estrógenos ha sido utilizada frecuentemente para tratar algunas disfunciones relacionadas con alteraciones de músculos del área pélvica en mujeres, tales como la incontinencia urinaria. Aunque la evidencia sugiere que los receptores de esteroides clásicos son capaces de mediar muchos de estos eventos. La identificación y caracterización de los receptores clásicos involucrados en estas respuestas son fundamentales para nuestro entendimiento de estas rutas complejas. Conocer la regulación metabólica en tejidos como los del piso pélvico resulta útil, ya que pueden ser un blanco para terapias hormonales basado en estrógenos para minimizar efectos secundarios.

HIPÓTESIS

La activación del receptor de estrógenos tipo alfa modula el metabolismo de glucosa de los músculos iliococcígeo y pubococcígeo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la relevancia de las acciones estrogénicas en el metabolismo de la glucosa en los músculos iliococcígeo y pubococcígeo de la rata hembra.

Objetivos específicos

En ratas ovariectomizadas (OVX) administradas con estradiol (E2) y/o MPP (antagonista selectivo del RE α), PHTTP (antagonista selectivo del RE β) o el vehículo de administración:

1. Cuantificar la concentración sérica de glucosa e insulina.
2. Determinar la expresión del transportador de glucosa tipo 4 en los músculos iliococcígeo y pubococcígeo.
3. Cuantificar la concentración de glucógeno en los músculos iliococcígeo y pubococcígeo.
4. Determinar la expresión de RE α y RE β en los músculos iliococcígeo y pubococcígeo.

METODOLOGÍA

Los procedimientos experimentales descritos en este protocolo fueron aprobados por la Comisión Institucional del Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Animales

Se utilizaron 48 ratas de la cepa Wistar de 3 meses de edad alojadas individualmente en cajas de polipropileno (37x27x16 cm) y mantenidas en condiciones invertidas de luz oscuridad (L:D 12:12, encendido de luces a las 20.00 h), con acceso libre de agua y alimento. Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en un grupo control de ratas sacrificadas durante el diestro (niveles basales de estradiol circulante) después de 2 ciclos regulares (C, n=8); y un grupo sometido a ovariectomía bilateral (OVX, n=40). Al término de la cirugía se administró diclofenaco (10 mg/kg, p.o., dosis única) como procedimiento analgésico. Las fases del ciclo estral del grupo C se determinó mediante citología vaginal realizada diariamente entre las 09:30 y 10:00 h. Las ratas OVX recibieron un régimen de administración de estradiol (OVX+E2) que incrementa la concentración sérica de esta hormona en un rango fisiológico mediante inyecciones subcutáneas de 0.006 mM (días 4-8 y 14-18 post-cirugía) y 0.003 mM 17beta-estradiol (días 9-13 post-cirugía) diluido en DMSO (3:2, v/v) [24]. Las ratas restantes del grupo OVX se administraron (s.c.) con el vehículo de administración del E2 bajo el mismo régimen de administración que las del grupo OVX+E2. Las ratas de estos grupos se sacrificaron el día 21 post-cirugía.

Las ratas OVX+E2 se dividieron en 2 grupos (n=8, c/u). Uno correspondió al grupo OVX+E2. Otro fue tratado con el antagonista de RE-alfa (MPP, Sigma-Aldrich) para formar el grupo OVX+E2+MPP; otro con el del RE-beta (PHTTP; Tocris) para formar el grupo OVX+E2+PHTTP. El MPP se administró a una dosis de 100 ug/kg (s.c.), el PHTTP a 200 ug/kg (s.c.) de acuerdo con estudios reportados por otros autores [25, 26]. Los tres fármacos,

o el vehículo de administración que corresponda (DMSO), se administró cada 24 h, simultáneamente a la administración de estradiol, fue a partir del día 4 y hasta el día 20 post-ovariectomía.

Se obtuvo la sangre mediante punción cardíaca para posteriormente obtener el suero sanguíneo mediante centrifugación, se congeló inmediatamente y se almacenó hasta su procesamiento. Se extirpó el útero, el músculo iliococcígeo y el pubococcígeo, y se registró el peso húmedo. Posterior a su extracción, cada músculo izquierdo se congeló inmediatamente y se almacenó a -80° C hasta su procesamiento para cuantificar la expresión de transportadores de glucosa y el contenido de glucógeno. Los músculos derechos se congelaron con isopentano en una mezcla de hielo seco:acetona inmediatamente después de su extracción para preservar la actividad enzimática de cada músculo.

MÉTODOS

Cuantificación de analitos séricos (estradiol, glucosa, insulina)

La concentración de insulina en suero se midió siguiendo las instrucciones del fabricante del kit (cat. 10-1250-01, Mercodia). Las determinaciones se hicieron por duplicado. Los resultados se expresaron como $\mu\text{UI/L}$.

La cuantificación de glucosa se realizó usando un kit basado en el método de oxidación de la glucosa siguiendo las instrucciones del fabricante (Licon). Las determinaciones se hicieron por duplicado a una absorbancia de 492nm con un espectrofotómetro.

Inmunodetección en fase sólida

Para la expresión de RE-alfa y Glut4 se obtuvo extractos de proteínas totales. El tejido fue homogenizado con un dispositivo electrónico en una solución de buffer de lisis (0.02M Tris

HCl pH 7.4, 0.1M NaCl, 0.1M glicina y Tx 0.1%) adicionándole 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 se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando el sistema Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). Las membranas se incubaron con una solución de 7% de leche descremada y 0.1% tween-20 en TBS (Tris-HCl pH 7.4, NaCl 150 mM) por 60 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 que corresponda diluidos en leche descremada al 1% y 0.1% tween-20 en TBS. Después de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario (goat anti-rabbit goat y anticuerpo secundario goat anti-mouse IgG-HRP sc-2005 (1-2000) acoplados 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 en un equipo de fotodocumentacion de señales quimioluminiscente (MyECL, ThermoFischer). Se midieron mediante densitometría con el programa ImageJ. Los resultados obtenidos se expresaron para cada uno de los grupos en unidades arbitrarias.

Cuantificación de glucógeno

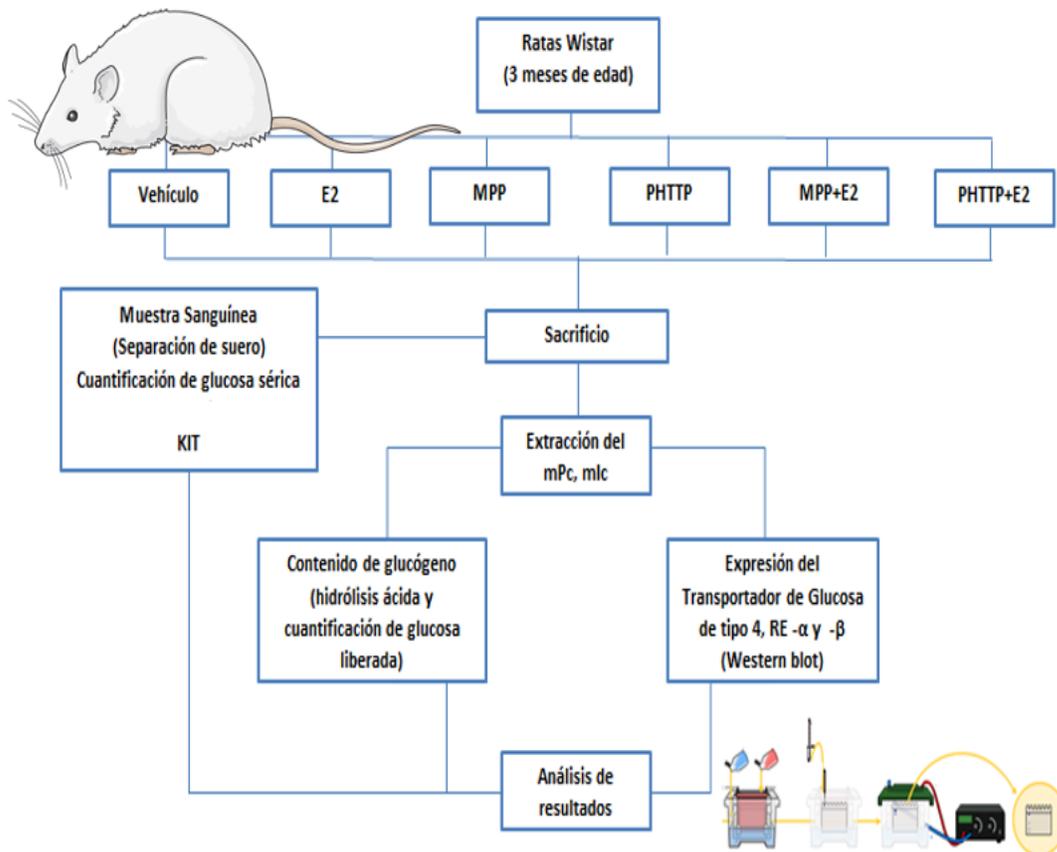
El protocolo para cuantificación de glucógeno fue adaptado del método usado en publicaciones previas de otros autores (Passonneu 1974; Zhang 2012). Se utilizó una porción de músculo congelado y se hidrolizó usando HCL 2N y como control NaOH 2N, se agregó el tejido y se homogenizó, se calentó en un baño maría hirviendo durante una hora y se agitó cada 10 minutos, se centrifugo a 18 10000 rpm por 15 minutos. Para el protocolo se pesa la porción de músculo fue registrado. Para calcular la cantidad de glucógeno se utilizó la formula citada por (Zhang 2012).

Absorbancia (muestra) / Absorbancia (estándar) X Concentración del estándar X Volumen
(estándar) x Volumen total/ Volumen (muestra)/ Peso de la muestra X 1000

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizarán utilizando un análisis de varianza de una vía. Para identificar las diferencias estadísticas ($P < 0.05$) se aplicará una prueba post-hoc de Newman-Keuls. En todos los casos se usará el programa de análisis estadístico Prism 5 para Windows (GraphPad).

DISEÑO EXPERIMENTAL



RESULTADOS

Análisis de macrovariables

	Veh	E2	MPP	PHTTP	MPP+E2	PHTTP+E2	P value
Peso del útero (mg/100 g peso corporal)	134.9±37	385.7±77*	247.8±91**&	168.2±51#&	297.1±21**&	424.2±14*	<0.0001
Peso corporal (g)	288.9±9.9	254.8±8.8*	272.7±11.8	273.8±7.9	246.7±5.2*	253.7±6.6*	0.0106
Ganancia de peso (g)	20.7±4.2	20.3±7.7	23.1±3.6	25.5±3#	7±3.3	24.2±1.5#	0.0014
Glucosa (mmol/L)	8.5±0.5	6.7±0.7	7.4±0.9	6.6±0.9	4.6±0.6**	7±0.5	0.0202
Insulina (μUI/L)[∇]	74.3±2.4	78.4±5.8	69.3±2.6	65.7±3.9	72±5.4	88±6.2	0.0253
MUSCULO PUBOCOCÍGEO							
Peso (mg/100g peso corporal)	31.1±7.2	37.2±7.9	35.2±8.2	33±4.7	39.3±6.3	34.7±8.6	0.2861
Longitud (mm)	16.7±0.1	16.5±0.2	16.2±0.3	16.3±0.3	16.3±0.4	16.7±0.1	0.6488
Ancho (mm)	4.5±0.4	5.±0.1	4.8±0.1	4.6±0.1	4.6±0.1	4.8±0.1	0.4195
MUSCULO ILIOCOCÍGEO							
Peso (mg/100g peso corporal)	14.3±2.3	20±3.9*	18.8±3.1	16.6±3.6	17.3±2.6	14.6±3.8&	0.0075
Longitud (mm)	12.6±0.2	13.±0.2	12.9±0.3	13.3±0.3	13.3±0.2	13.1±0.2	0.9939
Ancho (mm)	3.5±0.1	3.6±0.1	3.4±0.1	3.3±0.1	3.6±0.1	3.5±0.1	0.3624

Tabla 1. Los datos muestran la media ± e.e, n=8; para el grupo MPP+E2, n=7. [∇]Se tuvo una n=7, excepto para MPP+E2, n=6. La comparación entre grupos se realizó utilizando una prueba ANOVA de una vía seguido de una prueba de Newman-Keuls para identificar diferencias significativas (P<0.05) entre grupos. Veh: Vehículo, E2: Estradiol, MPP: Antagonista de Receptor de Estrógenos Alfa, PHTTP: Antagonista de Receptor de

Estrógenos Beta, MPP+E2: Antagonista de Receptor de Estrógenos Alfa + Estradiol,
PHTTP+E2: Antagonista de Receptor de Estrógenos Beta + Estradiol.

La Tabla 1 muestra las macrovariables analizadas a partir de los diferentes grupos experimentales. El peso corporal cambió significativamente entre estos grupos. En comparación con el grupo OVX+Veh, el peso promedio de los grupos E2, E2+MPP, y E2+PHTTP disminuyó significativamente ($P<0.05$ para cada comparación). La ganancia de peso corporal también cambió entre los distintos grupos; las diferencias significativas se limitaron a las siguientes comparaciones: E2 vs. PHTTP ($P<0.05$), E2 vs. PHTTP+E2 ($P<0.05$), MPP+E2 vs. PHTTP ($P<0.01$) y MPP+E2 vs. PHTTP+E2 ($P<0.01$). El peso normalizado del útero (mg/100 g peso corporal) también cambió significativamente entre los grupos. En comparación con el grupo Veh, se observaron incrementos significativos en los grupos E2 ($P<0.0001$), MPP ($P<0.05$), MPP+E2 ($P<0.01$) y PHTTP+E2 ($P<0.0001$). En comparación con el grupo E2 se encontraron reducciones significativas en los grupos MPP ($P<0.01$), PHTTP ($P<0.0001$) y MPP+E2 ($P<0.05$). En comparación con el grupo MPP se observó un incremento significativo en el grupo PHTTP+E2 ($P<0.001$); también se observaron incrementos significativos para las comparaciones PHTTP vs. MPP+E2 ($P<0.05$) y PHTTP vs. PHTTP+E2 ($P<0.0001$), así como para la comparación MPP+E2 vs. PHTTP+E2 ($P<0.05$).

No hubo diferencias significativas en cuanto al peso normalizado y las dimensiones del músculo pubococcígeo de los diferentes grupos (Tabla1). En cuanto al músculo iliococcígeo, se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales sólo en cuanto al peso normalizado, que incrementó significativamente al comparar los grupos E2 vs. Veh y disminuyó al comparar los grupos E2 vs. PHTTP+E2 (Tabla 1).

La concentración de glucosa sérica fue significativamente diferente entre los grupos experimentales (Tabla 1). Al respecto, la concentración del grupo MPP+E2 fue significativamente menor que la del grupo Veh. La concentración de insulina fue significativamente distinta entre los grupos experimentales (Tabla 1). En comparación el grupo PHTTP+E2, las concentraciones de los grupos MPP y PHTTP fueron significativamente menores ($P<0.05$).

Concentración de estradiol sérico

La concentración de estradiol sérico cambió significativamente entre los diferentes grupos experimentales. En comparación con el grupo Veh, los grupos E2, MPP+E2 y PHTTP+E2 incrementaron significativamente (Fig.6), mientras que la del grupo PHTTP fue significativamente menor que la de los grupos MPP+E2 y PHTTP+E2.

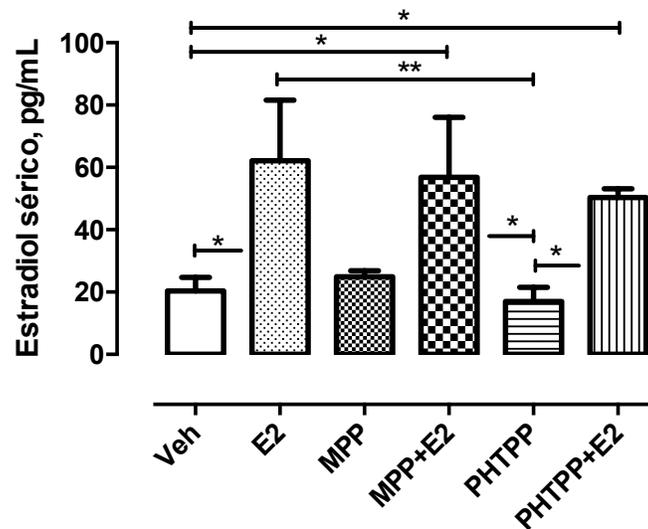


Figura 6. Concentración sérica de estradiol en los diferentes grupos experimentales. Los valores son la media \pm E.E. (n=6 para los grupos E2 y MPP; n=5 para los grupos restantes). Los datos fueron normalizados utilizando la función log10 y después se analizaron con un ANOVA de una vía seguida para detectar diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los grupos experimentales. Para identificar las diferencias significativas entre pares de grupos se utilizó una prueba de Newman-Keuls. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Expresión del transportador de glucosa tipo 4 (Glut4)

La expresión relativa de Glut4 en el mIc y el mPc se cuantificó normalizando la densidad óptica de la banda detectada alrededor de 50 kDa contra el carril correspondiente a la membrana teñida con rojo de Ponceau (Fig.9).

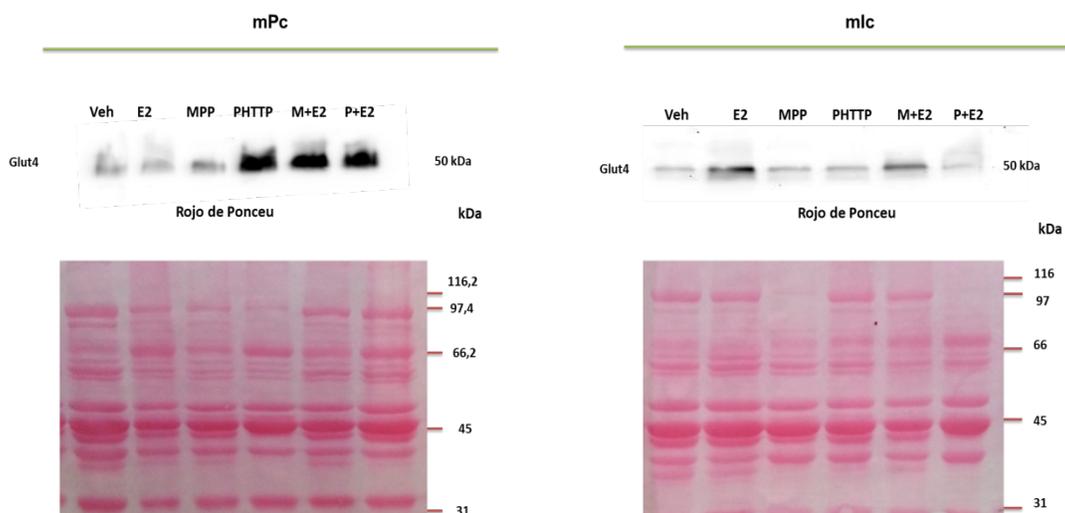


Figura 7. Expresión relativa de Glut4 en los músculos pubococígeo (mPc) e iliococígeo (mIc) en los grupos experimentales. La expresión de Glut4 se encuentra alrededor de los 50 kDa en ambos músculos. La expresión se normalizó contra Rojo de Ponceau.

La expresión de Glut4 en los músculos pubococcígeos muestra diferencias significativas entre los grupos experimentales, el musculo ilicoccígeo no muestra diferencias significativas.

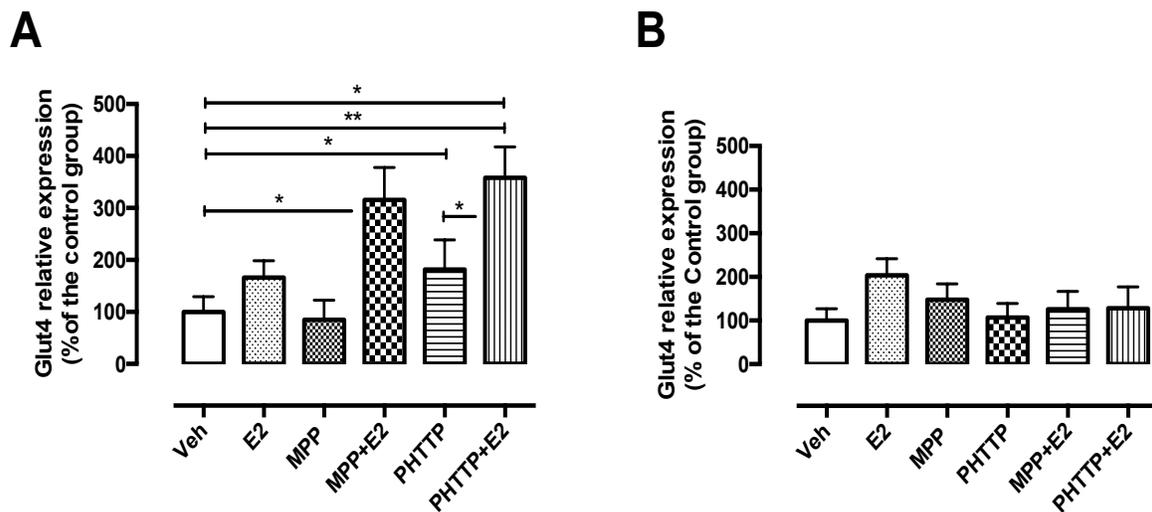


Figura 8. Cuantificación de la expresión relativa de Glut4 de los músculos mPc y mIc en los diferentes grupos experimentales. Los datos se analizaron con un ANOVA de una vía para detectar diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los grupos experimentales ($n = 6$ por grupo). Para identificar las diferencias significativas entre pares de grupos se utilizó una prueba de Newman-Keuls. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Contenido de glucógeno en el mPc y el mIc

La concentración de glucógeno en el musculo pubococcígeo e iliococcígeo muestra diferencias significativas entre los grupos experimentales.

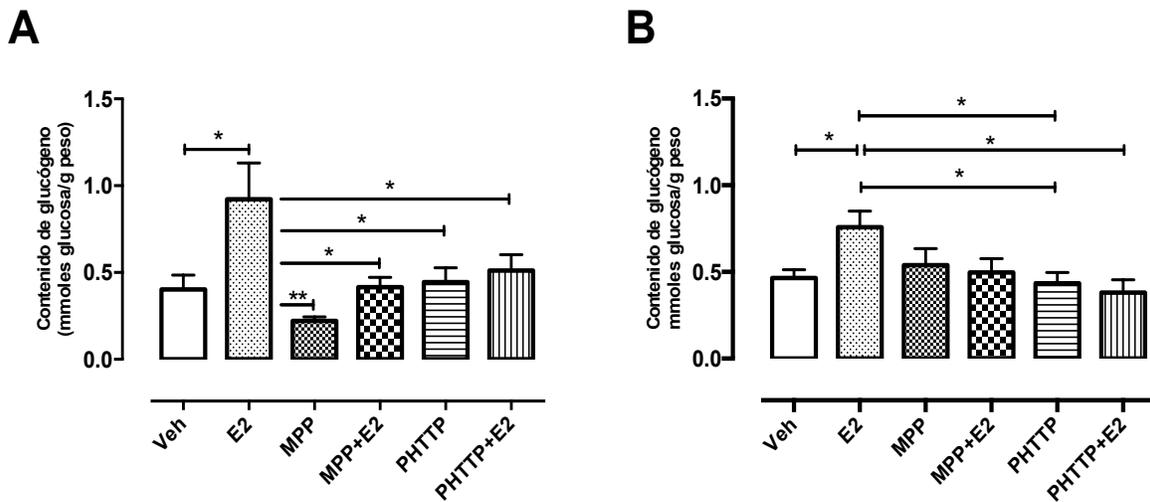


Figura 9. Concentración de glucógeno en los músculos (A) pobococcígeo e (B)

iliococcígeo en los diferentes grupos. Para determinar diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($P < 0.05$) se utilizó una prueba ANOVA de una vía seguido de una prueba de Newman-Keuls; $n = 7-8$ ratas por grupo. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

Expresión de receptor de estrógenos alfa (RE- α)

Se observó la expresión del receptor de estrógenos alfa en los músculos pubococcígeo e ileococcígeo en los diferentes grupos, en el mPc fue mayor en el grupo administrado con estradiol. La expresión del RE- α en el mIc no mostro diferencias entre grupos.

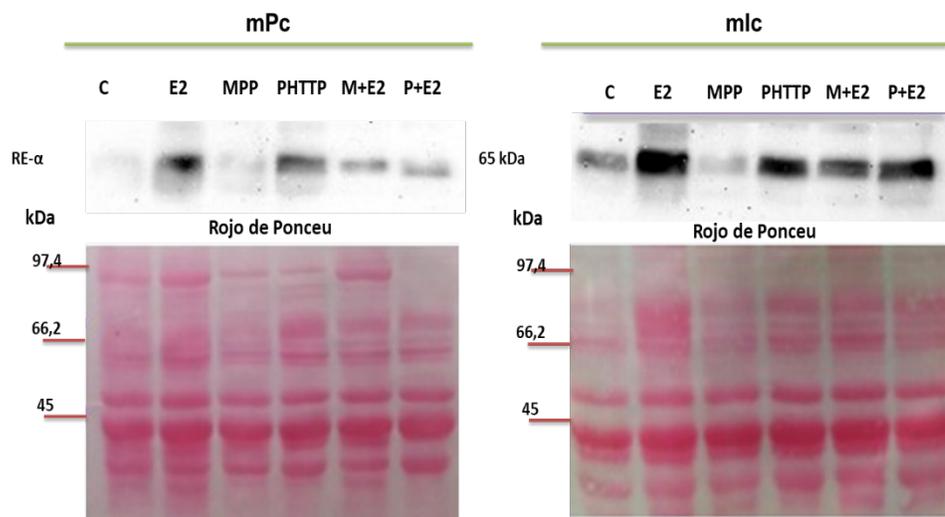


Figura 10. Expresión relativa de receptor de estrógenos alfa en los músculos pubococígeo (mPc) e iliococígeo (mIc) en los diferentes grupos experimentales. La expresión de RE- α se encuentra alrededor de los 65 kDa en ambos músculos. La expresión se normalizó contra Rojo de Ponceau.

Cuantificación de la expresión del receptor de estrógenos alfa en el mPc y mIc

La expresión de RE- α en los músculos pubococcígeo muestra diferencias significativas entre los grupos experimentales, el musculo ilicoccígeo no muestra diferencias significativas.

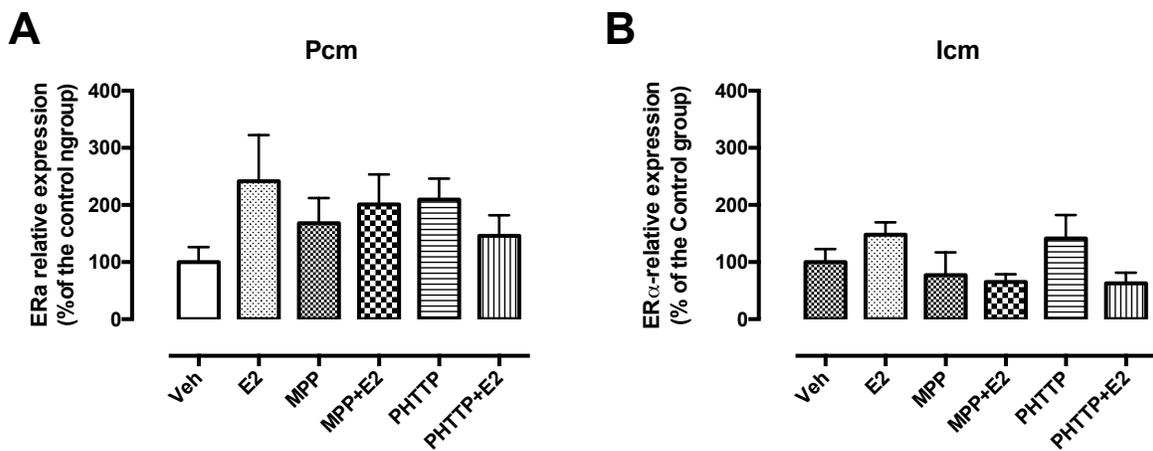


Figura 11. Cuantificación de la expresión relativa del receptor de estrógenos alfa de los músculos mPc y mIc en los diferentes grupos experimentales. Los datos se analizaron con un ANOVA de una vía para detectar diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los grupos experimentales ($n = 8$ por grupo, excepto para MPP, $n = 6$, y MPP+E2, $n = 7$). Para identificar las diferencias significativas entre pares de grupos se utilizó una prueba de Newman-Keuls. *, $P < 0.05$; $P < 0.01$.

Expresión de receptor de estrógenos beta (RE-β)

Se observó la expresión del receptor de estrógenos beta en los músculos pubococcígeo e ileococcígeo en los diferentes grupos, en el mPc fue mayor en el grupo administrado con vehículo. La expresión del RE-β en el mIc no mostró diferencias entre grupos.

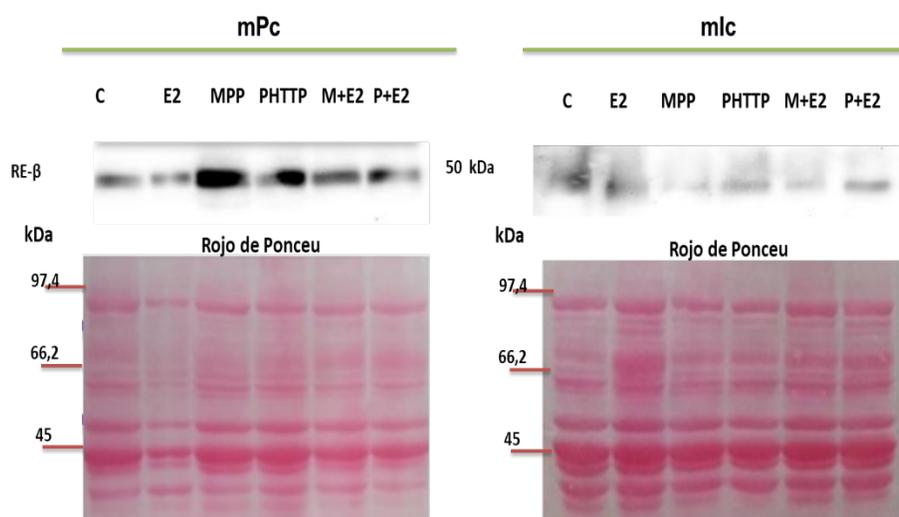


Figura 12. Expresión relativa de receptor de estrógenos beta en los músculos pubococígeo (mPc) e iliococígeo (mIc) en los diferentes grupos experimentales. La expresión de RE-β se encuentra alrededor de los 50 kDa en ambos músculos. La expresión se normalizó contra Rojo de Ponceau.

Cuantificación de la expresión del receptor de estrógenos beta en el mPc y mIc

La expresión de RE- β en los músculos pubococcígeo muestra diferencias significativas entre los grupos experimentales, el musculo ilicoccígeo no muestra diferencias significativas.

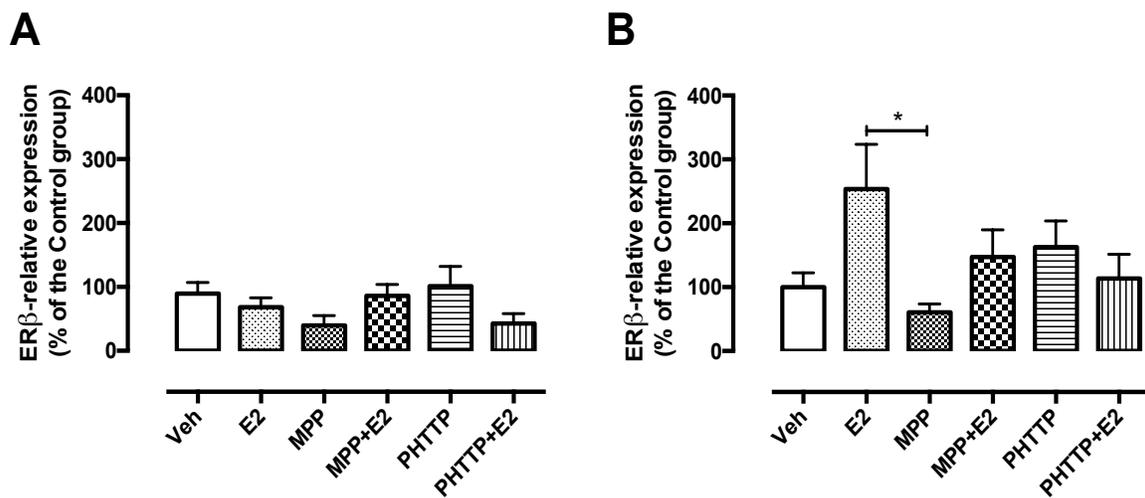


Figura 15. Cuantificación de la expresión relativa del receptor de estrógenos beta de los músculos mPc y mIc en los diferentes grupos experimentales. Los valores representan el promedio+S.D. (n= 6 animales por grupo). Para determinar diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($P<0.05$) se utilizó una prueba ANOVA de una vía seguido de pruebas de Fisher LSD; n=6-8 ratas por grupo. (* $P<0.05$).

DISCUSIÓN

Los hallazgos de esta tesis demuestran que la activación del receptor de estrógenos tipo alfa modula el metabolismo de glucosa en el músculo psoas pero no el iliopsoas. Además, nuestros hallazgos sugieren que existe una posible relación entre las acciones endocrinas de los estrógenos y la modulación de la glucosa en ambos músculos.

Niveles de estradiol sérico

Los cambios hormonales femeninos en periodos como la pubertad, embarazo o menopausia se han asociado con patologías del AUI (Aikawa et al., 2003). Los efectos gonadales son importantes para el organismo. Los ovarios son la fuente principal de hormonas como progesterona, testosterona y estradiol en mamíferos hembras (Arlt, 2006), su eliminación reduce los niveles circulantes de estas hormonas. (Feng y cols., 2004; Moran et al., 2007). Se ha descrito que después de la ovariectomía aumenta el peso corporal (Moran et al., 2006; Suzuki & Yamamuro, 1985) y en el músculo psoas aumenta el área transversal de las fibras (Lara-García et al., 2011). En la rata, se ha observado una disminución de un 63% posterior a la OVX (Kim et al., 2004). Así mismo cuatro semanas después de la ovariectomía, (Kim et al., 2004; Shinoda, Latour, & Lavoie, 2002) reportan que la concentración sérica de E2 disminuye en un 27%. De acuerdo con los datos publicados por otros autores, nuestros resultados coinciden en que existe una disminución de los estrógenos circulantes cuatro semanas después de la OVX.

En el grupo OVX+E2 hay un incremento en la concentración de estradiol sérico con respecto al grupo control, mientras que al grupo administrado solo con el antagonista beta PHTTP la disminución es aproximadamente cuatro veces menor con respecto al grupo administrado con E2, por lo tanto el tratamiento con E2 evita los efectos promovidos por la ovariectomía.

Respecto al peso corporal hay un incremento de peso en el grupo Vehículo en comparación al grupo administrado con MPP+E2, de acuerdo a ganancia de peso se observaron diferencias entre los grupos M+E2 y PHTTP, por lo que se reafirma que la ovariectomía aumenta el peso corporal (Moran et al., 2006; Suzuki & Yamamuro, 1985).

Metabolismo de glucosa

Se ha demostrado que la modulación dada por estrógenos influye en la regulación metabólica de la actividad enzimática de glucosa en el músculo levador ani (Knudsen & Max, 1980). No obstante, es necesario conocer sobre la regulación metabólica de los carbohidratos en la musculatura pélvica y con ello obtener indicadores de interés para evaluar su función.

La insulina es la hormona más importante para regular el metabolismo de glucosa en tejidos sensibles a la insulina, es decir, el músculo esquelético (Eckel et al., 2005) inicia una cascada de señalización que da como resultado la translocación de las vesículas que contiene el transportador de glucosa tipo 4 a la membrana plasmática para la captura de glucosa (Zhou et al., 1999). Estudios mencionan, que entre los factores de riesgo para padecer incontinencia urinaria se encuentra la disminución de los niveles hormonales durante la menopausia (Lu, Zhang, Zhang, & Shao, 2016; Zhou et al., 1999) y problemas relacionados con glucosa (Hsu et al., 2014; Lu et al., 2016; Zhou et al., 1999). Por ello se decide medir Glut4 ya que se considera como blanco metabólico de estrógenos.

Los resultados muestran la expresión de Glut4 en el músculo psoas mayor y iliococcígeo, los datos apoyan que los niveles altos de estradiol pueden aumentar la expresión de Glut4 en el psoas mayor, entre los grupos que mostraron mayor expresión fue el administrado con estradiol en comparación al administrado con el antagonista alfa MPP, sin embargo al administrar un antagonista con estradiol se puede observar que su expresión incrementa, que al solo ser administrado con el antagonista que silencia la expresión, mientras que en el iliococcígeo la expresión fue similar entre los grupos (Barros, Gabbi, Morani, Warner, &

Gustafsson, 2009; Carrasco-Ruiz et al., 2018). Los mecanismos implicados en la modulación de Glut4 deben estudiarse a través de la activación de los receptores de estrógenos. La diferencia que presentan los músculos podría deberse por la proporción entre los subtipos de receptores de estrógenos expresados en los músculos púbicocccígeo e iliococccígeo (Barros et al., 2009; Carrasco-Ruiz et al., 2018). Es importante tener en cuenta que la expresión de Glut4 en los músculos es dada por la activación del receptor de estrógenos alfa que promueve, mientras que la activación del receptor de estrógenos beta lo reprime (Barros et al., 2009).

El incremento de glucógeno en los músculos puede ser reflejo del incremento en la expresión de Glut4 (Carrasco-Ruiz et al., 2018; Castaneda et al., 2002). La enzima glucógeno sintetiza se ve incrementada cuando existe mayor expresión de Glut4 (Holten et al., 2004). Por lo tanto, los hallazgos actuales muestran que en el mPc existe mayor concentración glucógeno en el grupo administrado con E2 comparado al administrado con MPP, lo que apoya la idea de que las acciones estrogénicas están involucradas. En contraste, se observaron cambios del contenido de glucógeno en el mIc en el grupo E2. Los hallazgos favorecen la propuesta de que los músculos son sensibles a cambios hormonales, el contenido de glucógeno puede relacionarse a los niveles esteroides altos (Carrasco-Ruiz et al., 2018; Holten et al., 2004).

Sin embargo los niveles bajos de estradiol se ven relacionado con una aumento de glucosa en sangre (Narasimhan, Sampath, Jayaraman, & Karundevi, 2013). Los resultados muestran la concentración de glucosa sérica, en donde se observa concentraciones similares entre los grupos experimentales aunque se podría observar un ligero aumento de la concentración de glucosa en el grupo administrado con vehículo. Los hallazgos en este documento sugieren que los niveles altos de estradiol se ve relacionado con una mayor expresión de Glut4 y contenido de glucógeno en el músculo púbicocccígeo, pero no en el músculo iliococccígeo, aunque ambos músculos expresan receptores de estrógenos (Carrasco-Ruiz et al., 2018).

Expresión del receptor de estrógenos alfa y beta

Para entender como el E2 puede modular el metabolismo de glucosa, es necesario comprender el mecanismo dados por el E2 a través de sus receptores y los efectos que ejercen (Barros et al., 2006).

Tras la unión a E2, los receptores de estrógenos se activan actuando como moduladores transcripcionales mediante unión en elementos de respuesta de estrógenos en los genes promotores(Barros et al., 2006; Nilsson et al., 2001). Debido a la variación en la distribución de los receptores de estrógenos y el papel que desempeñan el RE- α y RE- β es un tema a debatir para entender las distintas funciones biológicas (Barros et al., 2006).

En el músculo esquelético se ha descrito la presencia de RE- α como RE- β (Barros et al., 2006) de igual manera en rata en los músculos pélvicos se corrobora la presencia de ambos receptores (Carrasco-Ruiz et al., 2018). Uno de los primeros estudios para abordar las diferentes acciones de RE se utilizó agonistas selectivos donde para RE- α causa una proliferación celular y los agonistas para RE- β inhiben el crecimiento celular(Helguero, Faulds, Gustafsson, & Haldosén, 2005). Esta es una herramienta para comprender las acciones individuales de los RE (Krege et al., 1998). En este trabajo utilizamos bloqueadores selectivos para cada subtipo de receptor y evaluamos la respuesta de expresión. Los resultado muestran la expresión de RE- α es mayor en el grupo administrado con E2, seguido por el grupo administrado con PHTTP, con respecto a la expresión de RE- β es mayor en el grupo administrado con MPP+E2, sin embargo en el mIc la respuesta de ambos receptores se comportó sin diferencias significativas. Sin embargo, estudios han demostrado que los RE- α / β tienen comportamiento, efectos distintos y en ocasiones opuestos (Carrasco-Ruiz et al., 2018).

Aporte biomédico

Nosotros utilizamos a la rata OVX como modelo de estudio para simular las condiciones postmenopáusicas y de esta forma conocer los efectos en la disminución de los estrógenos sobre la musculatura pélvica en particular en el mPc y mIc. En mujeres postmenopáusicas se ha correlacionado la aparición IUE debido a la disminución de los niveles séricos de E2. Se ha reportado que los músculos del piso pélvico son importantes para la cópula, el parto (Cruz y cols. 2002) y la micción (Corona y cols. 2009) estos músculos son sensibles a acciones estrógenicas y es posible que la disminución en los niveles séricos de E2 influya en esta patología, nosotros determinamos evaluar el metabolismo de glucosa a través de indicadores y la expresión de Glut4 para esclarecer el rol que tienen en estos músculos cuando son blancos para terapias de reemplazo hormonal (TRH).

Dada la controversia alrededor del uso de estrógenos sería importante esclarecer el papel que juega dichos RE al ser modulado por estrógenos.

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados indican que el incremento de la expresión de Glut4 ocurre en el músculo pibococcígeo pero no en el iliococcígeo y que tal efecto requiere de la activación del RE-alfa.

En cambio, el contenido de glucógeno en ambos músculos incrementó en respuesta a la administración de estradiol y fue bloqueado al administrar antagonistas de RE-alfa y RE-beta, para glucosa existe un aumento en la concentración en respuesta a los niveles bajos de estradiol.

Con respecto a la expresión de los receptores de estrógenos sugieren que únicamente la expresión del RE-alfa en el músculo pibococcígeo es modulable por los niveles de estradiol.

PERSPECTIVAS

Este trabajo permitió conocer el efecto de la disminución de los niveles circulantes de E2 sobre el transportador de glucosa tipo 4 (Glut4) en la musculatura pélvica y como esta modulación impacta en procesos metabólicos.

Al mismo tiempo me permite generar nuevas dudas y permite considerar temas para nuevas investigaciones tales como:

Evaluar el efecto hormonal sobre las uniones neuromusculares de la musculatura pélvica.

Evaluar el efecto rápido de los estrógenos, pero ahora bloqueando el receptor membranaral GPR30.

Cuantificar las concentraciones hormonales de manera local en la musculatura pélvica.

Realizar experimentos pero ahora con extractos membranales y verificar la cantidad de concentración de la proteína Glut4.

BIBLIOGRAFÍA

- Aikawa, K., Sugino, T., Matsumoto, S., Chichester, P., Whitbeck, C., & Levin, R. M. (2003). The effect of ovariectomy and estradiol on rabbit bladder smooth muscle contraction and morphology. *The Journal of Urology*, *170*(2 Pt 1), 634–637.
- Alvarado, M., Cuevas, E., Lara-García, M., Camacho, M., Carrillo, P., Hudson, R., & Pacheco, P. (2008). Effect of gonadal hormones on the cross-sectional area of pubococcygeus muscle fibers in male rat. *Anatomical Record*, *291*(5), 586–592.
- Arlt, W. (2006). Androgen therapy in women. *European Journal of Endocrinology*, Vol. 154, pp. 1–11. <https://doi.org/10.1530/eje.1.02062>
- Bagamasbad, P., & Denver, R. J. (2011). Mechanisms and significance of nuclear receptor auto- and cross-regulation. *General and Comparative Endocrinology*, *170*(1), 3–17.
- Barros, R. P. A., Gabbi, C., Morani, A., Warner, M., & Gustafsson, J.-A. (2009). Participation of ERalpha and ERbeta in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *297*(1), E124–E133.
- Barros, R. P. A., & Gustafsson, J.-Å. (2011). Estrogen Receptors and the Metabolic Network. *Cell Metabolism*, Vol. 14, pp. 289–299. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.005>
- Barros, R. P. A., Machado, U. F., Warner, M., & Gustafsson, J.-A. (2006). Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ERbeta and ERalpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(5), 1605–1608.
- Bohacek, J., & Daniel, J. M. (2009). The ability of oestradiol administration to regulate protein levels of oestrogen receptor alpha in the hippocampus and prefrontal cortex of middle-aged rats is altered following long-term ovarian hormone deprivation. *Journal of Neuroendocrinology*, *21*(7), 640–647.
- Brandling-Bennett, E. M., Blasberg, M. E., & Clark, A. S. (1999). Paced mating behavior in female rats in response to different hormone priming regimens. *Hormones and Behavior*, *35*(2), 144–154.
- Bremer, R. E., Barber, M. D., Coates, K. W., Dolber, P. C., & Thor, K. B. (2003). Innervation of the levator ani and coccygeus muscles of the female rat. *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, *275*(1), 1031–1041.
- Brink, E. E., & Pfaff, D. W. (1980). Vertebral Muscles of the Back and Tail of the Albino

- Rat (*Rattus norvegicus albinus*); pp. 24–47. *Brain, Behavior and Evolution*, Vol. 17, pp. 24–47. <https://doi.org/10.1159/000121789>
- Carrasco-Ruiz, M. de L. Á., Hernández-Aragón, L. G., Chávez-Ríos, J. R., Rodríguez-Antolín, J., Pacheco, P., Martínez-Gómez, M., ... Castelán, F. (2018). High Estradiol Differentially Affects the Expression of the Glucose Transporter Type 4 in Pelvic Floor Muscles of Rats. *International Neurourology Journal*, 22(3), 161–168.
- Castaneda, C., Layne, J. E., Munoz-Orians, L., Gordon, P. L., Walsmith, J., Foldvari, M., ... Nelson, M. E. (2002). A randomized controlled trial of resistance exercise training to improve glycemic control in older adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 25(12), 2335–2341.
- Catanzarite, T., Bremner, S., Barlow, C. L., Bou-Malham, L., O'Connor, S., & Alperin, M. (2018). Pelvic muscles' mechanical response to strains in the absence and presence of pregnancy-induced adaptations in a rat model. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Vol. 218, pp. 512.e1–e512.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2018.02.001>
- Copas, P., Bukovsky, A., Asbury, B., Elder, R. F., & Caudle, M. R. (2001). Estrogen, progesterone, and androgen receptor expression in levator ani muscle and fascia. *Journal of Women's Health & Gender-Based Medicine*, 10(8), 785–795.
- Cruz, Y., Jiang, H.-H., Zaszczurynski, P., Juarez, R., Pastelin, C., & S., M. (2011). Electromyography of Pelvic Floor Muscles in Rats. *Advances in Applied Electromyography*. <https://doi.org/10.5772/23879>
- Cuevas, E., Camacho, M., Alvarado, M., Hudson, R., & Pacheco, P. (2006). Participation of estradiol and progesterone in the retrograde labeling of pubococcygeus motoneurons of the female rat. *Neuroscience*, 140(4), 1435–1442.
- Eckel, R. H., Grundy, S. M., & Zimmet, P. Z. (2005). The metabolic syndrome. *The Lancet*, 365(9468), 1415–1428.
- Foryst-Ludwig, A., & Kintscher, U. (2010). Metabolic impact of estrogen signalling through ERalpha and ERbeta. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 122(1-3), 74–81.
- Fritel, X., Ringa, V., Quiboef, E., & Fauconnier, A. (2012). Female urinary incontinence, from pregnancy to menopause: a review of epidemiological and pathophysiological findings. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 91(8), 901–910.

- Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified Tissue International*, 96(3), 183–195.
- Glenmark, B., Nilsson, M., Gao, H., Gustafsson, J.-A., Dahlman-Wright, K., & Westerblad, H. (2004). Difference in skeletal muscle function in males vs. females: role of estrogen receptor-beta. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 287(6), E1125–E1131.
- Gupte, A. A., Pownall, H. J., & Hamilton, D. J. (2015). Estrogen: an emerging regulator of insulin action and mitochondrial function. *Journal of Diabetes Research*, 2015, 916585.
- Helguero, L. A., Faulds, M. H., Gustafsson, J.-Å., & Haldosén, L.-A. (2005). Estrogen receptors alfa (ER α) and beta (ER β) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene*, Vol. 24, pp. 6605–6616. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208807>
- Holten, M. K., Zacho, M., Gaster, M., Juel, C., Wojtaszewski, J. F. P., & Dela, F. (2004). Strength training increases insulin-mediated glucose uptake, GLUT4 content, and insulin signaling in skeletal muscle in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 53(2), 294–305.
- Hsu, A., Conell-Price, J., Cenzer, I. S., Eng, C., Huang, A. J., Rice-Trumble, K., & Lee, S. J. (2014). Predictors of urinary incontinence in community-dwelling frail older adults with diabetes mellitus in a cross-sectional study. *BMC Geriatrics*, Vol. 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2318-14-137>
- Im, S.-S., Kwon, S.-K., Kim, T.-H., Kim, H.-I., & Ahn, Y.-H. (2007). Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes. *IUBMB Life*, 59(3), 134–145.
- Jellinck, P. H., Lee, S. J., & McEwen, B. S. (2001). Metabolism of dehydroepiandrosterone by rat hippocampal cells in culture: possible role of aromatization and 7-hydroxylation in neuroprotection. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 78(4), 313–317.
- Jiang, H.-H., & Damaser, M. S. (2011). Animal Models of Stress Urinary Incontinence. *Urinary Tract*, pp. 45–67. https://doi.org/10.1007/978-3-642-16499-6_3
- Karlsson, H. K. R., Hällsten, K., Björnholm, M., Tsuchida, H., Chibalin, A. V., Virtanen, K. A., ... Zierath, J. R. (2005). Effects of metformin and rosiglitazone treatment on insulin

- signaling and glucose uptake in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a randomized controlled study. *Diabetes*, 54(5), 1459–1467.
- Kim, N. N., Min, K., Pessina, M. A., Munarriz, R., Goldstein, I., & Traish, A. M. (2004). Effects of ovariectomy and steroid hormones on vaginal smooth muscle contractility. *International Journal of Impotence Research*, 16(1), 43–50.
- Knudsen, J. F., & Max, S. R. (1980). Aromatization of androgens to estrogens mediates increased activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase in rat levator ani muscle. *Endocrinology*, 106(2), 440–443.
- Krege, J. H., Hodgin, J. B., Couse, J. F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J. F., ... 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.
- 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. *Anatomical Record*, 294(7), 1242–1248.
- Lu, S., Zhang, H.-L., Zhang, Y.-J., & Shao, Q.-C. (2016). Prevalence and risk factors of urinary incontinence among perimenopausal women in Wuhan. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences = Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ying De Wen Ban = Huazhong Keji Daxue Xuebao. Yixue Yingdewen Ban*, 36(5), 723–726.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., ... Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83(6), 835–839.
- Martinez-Gomez, M., Chirino, R., Beyer, C., Komisaruk, B. R., & Pacheco, P. (1992). Visceral and postural reflexes evoked by genital stimulation in urethane-anesthetized female rats. *Brain Research*, 575(2), 279–284.
- Martinez-Gomez, M., Luz, D., Cruz-Gomez, Y., Zempoalteca, R., Rodriguez-Antolin, J., & Castela, F. (2012). The Role of Pelvic and Perineal Muscles in Reproductive and Excretory Functions. *Applications of EMG in Clinical and Sports Medicine*. <https://doi.org/10.5772/27393>

- McClung, J. M., Davis, J. M., Wilson, M. A., Goldsmith, E. C., & Carson, J. A. (2006). Estrogen status and skeletal muscle recovery from disuse atrophy. *Journal of Applied Physiology*, *100*(6), 2012–2023.
- Memon, H. U., & Handa, V. L. (2013). Vaginal Childbirth and Pelvic Floor Disorders. *Women's Health*, Vol. 9, pp. 265–277. <https://doi.org/10.2217/whe.13.17>
- Moran, A. L., Nelson, S. A., Landisch, R. M., Warren, G. L., & Lowe, D. A. (2007). Estradiol replacement reverses ovariectomy-induced muscle contractile and myosin dysfunction in mature female mice. *Journal of Applied Physiology*, Vol. 102, pp. 1387–1393. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01305.2006>
- Moran, A. L., Warren, G. L., & Lowe, D. A. (2006). Removal of ovarian hormones from mature mice detrimentally affects muscle contractile function and myosin structural distribution. *Journal of Applied Physiology*, *100*(2), 548–559.
- Morimoto, S., Cerbón, M. A., Alvarez-Alvarez, A., Romero-Navarro, G., & Díaz-Sánchez, V. (2001). Insulin gene expression pattern in rat pancreas during the estrous cycle. *Life Sciences*, *68*(26), 2979–2985.
- Narasimhan, A., Sampath, S., Jayaraman, S., & Karundevi, B. (2013). Estradiol Favors Glucose Oxidation in Gastrocnemius Muscle through Modulation of Insulin Signaling Molecules in Adult Female Rats. *Endocrine Research*, Vol. 38, pp. 251–262. <https://doi.org/10.3109/07435800.2013.775148>
- Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., ... Gustafsson, J.-Å. (2001). Mechanisms of Estrogen Action. *Physiological Reviews*, Vol. 81, pp. 1535–1565. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.4.1535>
- Ottenheijm, C. A. C., & Granzier, H. (2010). Lifting the nebula: novel insights into skeletal muscle contractility. *Physiology*, *25*(5), 304–310.
- Pacheco, P., Martinez-Gomez, M., Whipple, B., Beyer, C., & Komisaruk, B. R. (1989). Somato-motor components of the pelvic and pudendal nerves of the female rat. *Brain Research*, *490*(1), 85–94.
- Pereira, L. C., Botelho, S., Marques, J., Adami, D. B. V., Alves, F. K., Palma, P., & Riccetto, C. (2016). Electromyographic pelvic floor activity: Is there impact during the female life cycle? *Neurourology and Urodynamics*, *35*(2), 230–234.
- Poortmans, A., & Wyndaele, J. J. (1998). M. Levator Ani in the rat: Does it really lift the

- anus? *The Anatomical Record*, Vol. 251, pp. 20–27. <https://doi.org/3.0.co;2-i>>10.1002/(sici)1097-0185(199805)251:1<20::aid-ar5>3.0.co;2-i
- Rahn, D. D., Ruff, M. D., Brown, S. A., Tibbals, H. F., & Word, R. A. (2008). Biomechanical properties of the vaginal wall: effect of pregnancy, elastic fiber deficiency, and pelvic organ prolapse. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 198(5), 590.e1–e6.
- Richter, E. A., & Hargreaves, M. (2013). Exercise, GLUT4, and Skeletal Muscle Glucose Uptake. *Physiological Reviews*, Vol. 93, pp. 993–1017. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2012>
- Shinoda, M., Latour, M. G., & Lavoie, J.-M. (2002). Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 26(3), 335–343.
- Snooks, S. J., Swash, M., Mathers, S. E., & Henry, M. M. (1990). Effect of vaginal delivery on the pelvic floor: a 5-year follow-up. *The British Journal of Surgery*, 77(12), 1358–1360.
- Söderberg, M. W., Johansson, B., Masironi, B., Byström, B., Falconer, C., Sahlin, L., & Ordeberg, G. E. (2007). Pelvic floor sex steroid hormone receptors, distribution and expression in pre- and postmenopausal stress urinary incontinent women. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 86(11), 1377–1384.
- Suzuki, S., & Yamamuro, T. (1985). Long-term effects of estrogen on rat skeletal muscle. *Experimental Neurology*, Vol. 87, pp. 291–299. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(85\)90219-5](https://doi.org/10.1016/0014-4886(85)90219-5)
- Thomas, G. D. (2013). Functional muscle ischemia in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Frontiers in Physiology*, 4, 381.
- Tortora, G. J. (2000). *Principios de Anatomia E Fisiologia (12a. Ed.)*.
- Wibowo, E., Calich, H. J., Currie, R. W., & Wassersug, R. J. (2015). Prolonged androgen deprivation may influence the autoregulation of estrogen receptors in the brain and pelvic floor muscles of male rats. *Behavioural Brain Research*, 286, 128–135.
- Wolfe, R. R. (2006). The underappreciated role of muscle in health and disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(3), 475–482.
- Wyndaele, J.-J. J., & Poortmans, A. (2006). Functional and histological effects of

intravaginal electrical stimulation on the pelvic muscles: a study in the rat. *International Urogynecology Journal and Pelvic Floor Dysfunction*, 17(5), 444–448.

Zhou, L., Chen, H., Xu, P., Cong, L. N., Sciacchitano, S., Li, Y., ... Quon, M. J. (1999). Action of insulin receptor substrate-3 (IRS-3) and IRS-4 to stimulate translocation of GLUT4 in rat adipose cells. *Molecular Endocrinology*, 13(3), 505–514.