



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Mayra Xochitemol Nava

Director de tesis
Dr. Francisco Castelán

Tlaxcala, Tlax.

Agosto 2021



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto del péptido XT1 sobre el daño bioquímico
de músculos pélvicos en el postparto temprano de
ratas primíparas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Nombre del Alumno

Mayra Xochitemol Nava

Director de tesis

Dr. Francisco Castelán

Comité Tutorial

Dr. Rene Zempoalteca Ramirez

Dra. María de los Ángeles Carrasco Ruiz

Tlaxcala, Tlax.

Agosto 2021

FINANCIAMIENTO

El trabajo de la presente tesis se efectuó en las instalaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología otorgó una beca a Mayra Xochitemol Nava (749822) para cursar los estudios de maestría en el Programa en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, debido a que cuenta con reconocimiento del Padrón Nacional de Posgrados de Calidad.



**COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Mayra Xochitemol Nava** 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 **“Efecto del compuesto XT1 sobre el daño de músculos pélvicos en el post-parto temprano de ratas primíparas”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., AGOSTO 13 DE 2021

DR. RENÉ ZEMPOALTECA RAMÍREZ

DR. FRANCISCO CASTELÁN

DR. JORGE RODRÍGUEZ ANTOLÍN

DRA. DORA LUZ CORONA QUINTANILLA

DRA. MARÍA DE LOS ÁNGELES CARRASCO RUIZ

CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado

Tlaxcala, Tlax., a 29 de julio de 2021

COMITÉ ACADÉMICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sirva este medio para describir el resultado del análisis de similitud del documento de la tesis titulada **“Efecto del péptido XT1 sobre el daño bioquímico de músculos pélvicos en el postparto temprano de ratas primíparas”**, realizada por la L.Q.C. Mayra Xochitemol Nava para optar por el grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**.

Después de revisar el documento con la aplicación web Turnitin (<https://uatx.turnitin.com>), comparto con ustedes la siguiente información:

==AJUSTES DE LA APLICACIÓN==

Depósitos de búsqueda (seleccionados para comparar el contenido de la tesis).

Internet, publicaciones, base de datos Crossref, contenido disponible en Crossref, trabajos entregados.

Exclusiones del informe de similitud. (Partes de la tesis donde no desea que se revisen las coincidencias. Turnitin recomienda excluir la bibliografía y las citas textuales. Todas las selecciones se pueden anular en el visor de la aplicación).

Bibliografía, citas textuales, citas y coincidencias menores (menos de 15 palabras).


==RESULTADO==

Similitud general: 3%

Considerando que la mayoría de las similitudes encontradas en el documento de tesis corresponden a descripciones de procesos bioquímicos ubicadas en la sección Introducción, en las que se incluyen las citas a las referencias correspondientes, puedo informar a ustedes que **no he encontrado elementos suficientes para advertir alguna práctica cuestionable en la redacción de la tesis.**

Sin otro asunto que tratar, reciban un saludo cordial.

Atentamente


Dr. Francisco Castelán
Director de tesis



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



Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Francisco Castelán en la Unidad Foránea de Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, con sede en el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Fue dirigida por el Dr. Francisco Castelán y en el Comité Tutoral participaron los Dres. René Zempoalteca Ramírez y María de los Ángeles Carrasco Ruiz. Durante el desarrollo experimental se contó con apoyo técnico del Biol. Jesús Ramsés Chávez Ríos y la Q.F.B Laura García.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones biomédicas de la Universidad Autónoma de México.

Al CONACYT, por haberme otorgado la beca (749822) con la finalidad de cursar la Maestría en Ciencias Biológicas.

Mis más sinceros agradecimientos al Dr. Francisco Castelán, por aceptar mi participación en su grupo de trabajo y en su proyecto de investigación, por cada una de sus explicaciones las cuales fueron brindadas de una manera muy humilde y con toda la paciencia posible, por su confianza y el apoyo que día a día hizo posible la conclusión de esta tesis, ¡Muchísimas gracias Dr.!

A mi comité tutorial, el Dr. René Zempoalteca Ramírez y a la Dra. María de Los Ángeles Carrasco Ruiz por el tiempo dedicado para cada uno de sus comentarios, correcciones y observaciones que amablemente me hicieron llegar durante la elaboración de este proyecto, muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A Dios, por guiarme y darme las oportunidades para seguir cada uno de mis sueños.

Al Dr. Francisco Castelán; ya que, sin conocerme bien, me acepto en su grupo de trabajo y me permitió trabajar en su proyecto de investigación, por darme la confianza al expresar aquellos problemas que al inicio de la maestría llegué a tener, por resolver cada una de mis dudas y explicarme de la manera más paciente para que pudiera comprender, por el apoyo que me ha proporcionado para seguir en este camino de la investigación, en verdad muchísimas gracias.

A Ramsés Chávez Ríos y a la Dra. María de los ángeles Carrasco Ruiz por su gran asistencia técnica en los experimentos, muchísimas gracias por apoyarme.

A Lupita por ayudarme en los experimentos, por aclarar cada una de mis dudas, por esas explicaciones que amablemente me hizo llegar, porque desde el primer día que llegué al laboratorio, recibí mucha ayuda de su parte, muchísimas gracias.

A mis compañeros de Laboratorio, Sharet, Mónica, Iván, Emanuel, Key gracias por su apoyo en los experimentos.

A mi mamá, gracias por apoyarme y no dejarme caer, representas una pieza fundamental en la conclusión de este trabajo, a mi papá, que no está físicamente, pero me inculco el gusto por el estudio.

A mis hermanos, por tener su apoyo, cariño y ánimo, que todo este trabajo que realizo sea un ejemplo que seguir. A Rodrigo Peralta, por motivarme para que entrara a la maestría, por apoyarme y por mostrarme que puedo ser fuerte.

Dedico esta tesis especialmente a mi mamá, porque sin su ayuda, aliento y amor no hubiera logrado seguir con este sueño, no va a existir manera de devolverte todo el sacrificio que has dado por nosotros, eres un ejemplo para mí y a ti te debo este logro.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Abreviatura	Definición
GLUT4	Transportador de Glucosa tipo 4
MPP	Músculos del Piso Pélvico
IUE	Incontinencia Urinaria de Esfuerzo
POP	Prolapso de Órganos Pélvicos
RI	Receptor de insulina
SRI-1	Sustrato de Receptor de Insulina-1
PI3K	Fosfatidilinositol Cinasa 3
PKB/Akt	Proteína Cinasa B
AS160	Sustrato Akt de 160 kDa
CH	Cadena pesada
CL	Cadena ligera
NT	Neurotrofinas
NGF	Factor de crecimiento neuronal
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
NT-4	Neurotrofina 4
MEA	Músculo Elevador del Ano
NP	Nervio Pudendo
PKA	Proteína Cinasa A
mPc	Músculo Pubococcígeo
mIc	Músculo Iliococcígeo
mCc	Músculo Coccígeo
Null	Nulíparas
P3+XT1	Ratas primíparas sacrificadas el día 3 postparto y administradas con XT1
P3+SS	Ratas primíparas sacrificadas el día 3 postparto y administradas con solución salina

RESUMEN

Diferentes estudios han demostrado que el parto puede conducir a un daño en los músculos del piso pélvico, influyendo en el desarrollo de incontinencia urinaria de esfuerzo, debido a la distensión de fibras musculares, lo cual representa un problema a medida que la población envejece, su incidencia máxima es en mujeres multíparas y posmenopáusicas, siendo una piedra angular de este trastorno pélvico, conocerlo ayudaría a la calidad de vida de este piso pélvico. En músculos de las extremidades, el daño muscular está relacionado con alteraciones metabólicas que impactan el metabolismo de carbohidratos, lo que podría resultar de interés para comprender la regeneración de músculos del piso pélvico después del parto. Dado que la regeneración muscular depende en gran medida de la degeneración muscular, existe la necesidad de comprender ambos procesos en músculos como el pubococcígeo (mPc) e iliococcígeo (Ic).

Dado que las afecciones musculares constituyen una de las condiciones debilitantes más severas, es posible suponer la evaluación de una amplia variedad de compuestos y estrategias farmacológicas para reducir el daño o acelerar la regeneración muscular. Uno de estos compuestos es el péptido XT1 capaz de activar vías de señalización relevantes para la activación y diferenciación de precursores celulares involucrados en regeneración.

Es por ello, que el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del péptido XT1 sobre el daño bioquímico en los músculos pélvicos en el posparto temprano de ratas primíparas. Para ello se ocuparon 18 ratas de la cepa Wistar divididas en 3 grupos: Nulíparas (Null), ratas primíparas sacrificadas a los 3 días posparto y administradas con solución salina (P3+SS) y XT1 (P3+XT1), evaluando la cuantificación de glucosa y glucógeno, la actividad de la beta-glucoronidasa. Nuestros resultados sugieren que en el postparto temprano no hay signos de daño muscular consolidado en los músculos del piso pélvico que puedan interferirse o mejorarse con el tratamiento de XT1.

ÍNDICE

	Pág.
GLOSARIO DE TÉRMINOS	1
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Transportador de glucosa 4 (GLUT4)	2
2.6 Músculos del piso pélvico (MPP)	5
2.7 Musculatura pélvica de la rata, GLUT4 y daño muscular.....	8
2.2 Toxinas clostridiales.....	10
2.3 Toxina tetánica	11
2.4 Mecanismo de acción	12
2.5 Propiedades neuroprotectoras del péptido XT1	13
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	15
5. HIPÓTESIS.....	15
6. OBJETIVOS	15
6.1 Objetivo general.....	15
6.2 Objetivos específicos.....	15
7. METODOLOGÍA	16
7.1 Animales.....	16

7.2 Grupos experimentales	16
7.3 Cuantificación de glucosa y glucógeno:.....	16
7.4 Actividad de la β -glucoronidasa:.....	17
7.5 Expresión de transportadores de glucosa 4 (GLUT4):	18
7.6 Análisis de resultados:	19
8. RESULTADOS	20
9. DISCUSIÓN	34
10. CONCLUSIONES	37
11. PERSPECTIVAS	37
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUCCIÓN

En la mujer, los MPP participan en procesos reproductivos (como el parto y el embarazo) y excretorios; factores fenotípicos (obesidad), el estilo de vida, la genética, la edad, el embarazo, el número de partos, la menopausia, etc, conducen el riesgo para el desarrollo de incontinencia urinaria de esfuerzo (IUE) y el prolapso de órganos pélvicos (POP), donde las mujeres son más propensas a la aparición de estas disfunciones pélvicas (Aoki y col. 2017; Olsen y col. 2003).

La glucosa es un combustible necesario para la contracción del músculo esquelético. Ingresa a la fibra muscular a través de difusión facilitada, mediante transportadores de glucosa, principalmente a través del transportador de glucosa 4 (GLUT4). El GLUT4 está expresado diferencialmente entre fibras tipo ST y fibras de tipo FT (Kern y col. 1990; Gómez-Zorita y col. 2012). En músculos de las extremidades, el daño muscular está relacionado con una reducción transitoria de la expresión de GLUT4. Ciertamente la recuperación de su expresión podría resultar de interés para comprender la regeneración de los músculos del piso pélvico (MPP) después del parto (Asp y col. 1995).

La IUE es una afección común con una morbilidad significativa y las opciones de tratamiento incluyen ejercicios del piso pélvico, tratamiento farmacológico y cirugía. Es por ello, que en este proyecto se pretende evaluar el efecto del péptido XT1 sobre el daño que precede a la regeneración muscular.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Transportador de glucosa 4 (GLUT4)*

El transporte de glucosa muscular está mediado por proteínas transmembranales responsables del transporte específico de glucosa estimulada por la contracción del músculo esquelético y/o la acción de la insulina (Richter y col. 2013). El principal transportador de glucosa expresado en el músculo esquelético y tejido adiposo es el transportador de glucosa 4 (GLUT4) (Stöckli y col. 2011). El GLUT4 se localiza en el citoplasma almacenado en forma de vesículas que son sensibles a la insulina, al ejercicio físico y a situaciones de hipoxia (Machado y col. 2019). Este transportador reside en un compartimiento cerca de los túbulos (T) transversos y regula aproximadamente el 90% de la captación de glucosa en músculos esqueléticos adultos (Richter y col. 2013).

La absorción de glucosa está mediado por la estimulación de insulina, hormona que se une al receptor de insulina (RI). El RI es una proteína heterotrimérica con actividad de tirosina cinasa, conformada por dos subunidades alfa (α) y beta (β), unidas mediante enlaces disulfuro. Después de esta unión, el RI sufre una alteración conformacional, desencadenando su autofosforilación en residuos de tirosina. Una vez activado, el RI promueve la fosforilación de tirosina en diferentes sustratos, incluido el sustrato de receptor de insulina 1 (SRI-1). La fosforilación activa a la enzima fosfatidilinositol cinasa 3 (PI3K). Sucesivamente, PDK-1 fosforila la proteína cinasa B (PKB, también llamada Akt), el cual tiene un papel clave en la vía de señalización de la insulina (Carbo y col. 2004; Castrejón y col. 2007; Machado y col. 2019; Pereira y col. 2017).

Cuando está activo, Akt es responsable de la activación del AS160 (sustrato Akt de 160 kDa). El AS160 puede actuar en la translocación de GLUT4 a la periferia, aumentando la actividad de las proteínas Rab que estimularán la translocación de estas vesículas que contienen GLUT4 a la periferia. Por lo tanto, estos mecanismos de activación y la liberación de vesículas que contienen GLUT4 son esenciales para la homeostasis de la glucosa (Pereira y col. 2017). (Fig. 1)

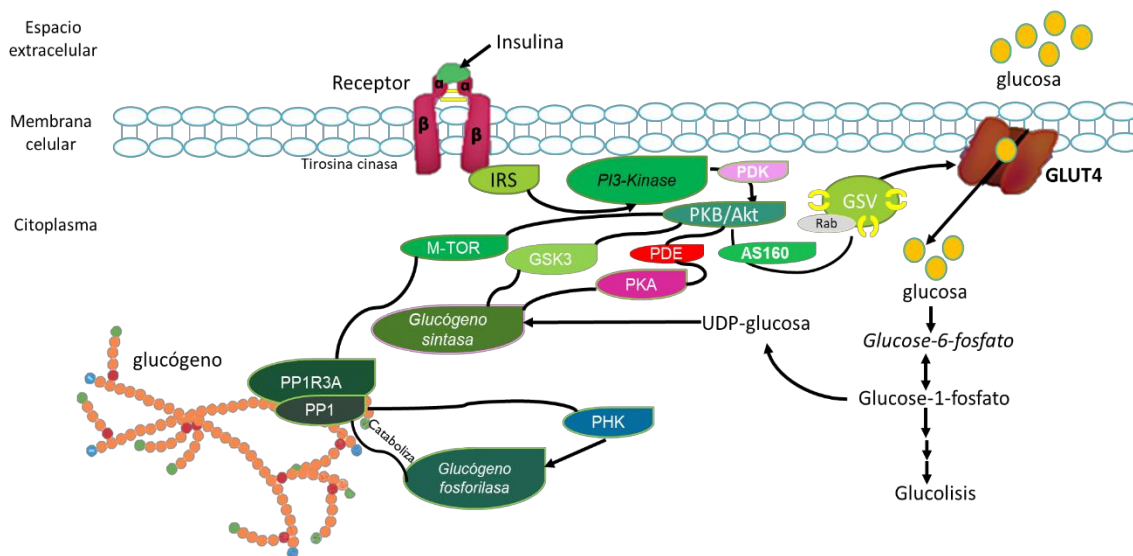


Fig.1 Esquema del mecanismo de transporte de glucosa a través de GLUT4 a la membrana celular
(Tomado y modificado de Sandoval-Muñoz y col. 2016)

El mecanismo molecular que conduce a la absorción de glucosa inducida por la contracción en el músculo esquelético implica la translocación de transportadores de glucosa GLUT4 desde los sitios de almacenamiento intracelular a la membrana superficial (Derave y col. 1999). La contracción muscular aumenta de manera aguda los niveles de transportador de GLUT4 en el sarcolema y en los túbulos T (Richter y col. 2013). Un aumento transitorio en la concentración de Ca^{2+} intracelular y un aumento en la relación AMP/ATP, contribuyen a mejorar la translocación de GLUT4 a la superficie celular. Debido a que la concentración de Ca^{2+} extracelular está mediada por activaciones de la proteína Ca^{2+} calmodulina quinasa II y quizás de la proteína quinasa C convencional. Además, Ca^{2+}/CaM parece activar la vía de señalización de AMPK (Jessen y col. 2005; Rose y col. 2005).

La insulina y el ejercicio (por contracción) estimulan de manera aguda el reclutamiento de GLUT4 a las superficies celular de las células musculares y adiposas independientemente de la transcripción o traducción; sin embargo, estos dos estímulos fisiológicos inician mecanismos de señalización distintos que conducen a una mejor translocación de GLUT4 y absorción de glucosa (Kuo y col. 1999).

La ingesta de alimentos y el ejercicio, al estimular de manera individual la translocación de los GLUT4 en la membrana celular, incrementan de manera sumatoria el glucógeno en la fibra muscular (Kuo y col. 1999). Este glucógeno almacenado en el músculo esquelético proporciona glucosa a las fibras musculares durante la contracción muscular, en consecuencia, el contenido de glucógeno muscular disminuye después del ejercicio en los músculos que trabajan (Adeva-Andany y col. 2016).

Diferentes estudios han sugerido que el glucógeno juega un papel fundamental en la regulación de la entrada de glucosa en las células musculares no estimuladas y en las células musculares estimuladas por la insulina o el ejercicio (Derave y col. 1999). El papel regulador del glucógeno en el transporte de glucosa está relacionado con el tipo de fibra, se ha reportado que la concentración de glucógeno es mayor en fibras blancas que en fibras rojas, tanto en el músculo en reposo como posterior al ejercicio (Derave y col. 1999; Kuo y col. 1999).

De igual manera, la expresión de GLUT4 en el músculo se relaciona con la naturaleza metabólica del tipo de fibra, donde los músculos con fibras tipo ST (oxidativas, rojas o lentas) músculos que se entrenan en deportes aeróbicos de larga duración expresan más cantidad de GLUT4 que las fibras tipo FT (glucolíticas, blancas o rápidas) (Derave y col. 1999; Gómez-Zorita y col. 2012). A través del estímulo de contracción por estimulación eléctrica, se puede mostrar como las fibras lentas captan más glucosa que las fibras rápidas (Gómez-Zorita y col. 2012).

Una vez que la glucosa ha ingresado a la célula, puede metabolizarse para producir energía o síntesis de lípidos o almacenarse como glucógeno. Este aumento en el número de moléculas de GLUT4 disponibles en la superficie celular aumenta la velocidad máxima de la velocidad de transporte de glucosa a las células. Una vez que se elimina la estimulación con insulina, GLUT4 es endocitosado de regreso a la célula mediante la gemación de vesículas en la membrana plasmática que contiene clatrina. Tras la internalización, GLUT4 se convierte en parte de los endosomas tempranos y se vuelve a clasificar en vesículas intracelulares (Hou y col. 2007).

Se ha evidenciado que la expresión de GLUT4 se ve disminuida en la atrofia muscular y la denervación, consistente con la disminución de los requerimientos de energía en estas condiciones (Huang y col. 2007). Datos obtenidos de músculos de las extremidades y en el

contexto de medicina del deporte, han propuesto que el daño muscular resulta de insultos mecánicos y/o metabólicos, aunque ciertamente la desregulación de la homeostasis de calcio intracelular subyace a ambos (Tee y col. 2007).

A nivel muscular existe una afectación en el metabolismo de la glucosa como lo indica un estado de resistencia a la insulina, una reducida expresión de GLUT4 y una disminución en el contenido de glucógeno muscular, entre otros (Tee y col. 2007). Este compromiso energético podría reducir la síntesis de proteínas fibrilares requerida para recuperar la atrofia muscular que se presente después de una lesión nerviosa (Langer y col. 2018).

2.6 Músculos del piso pélvico (MPP)

En la mujer, el piso pélvico es una estructura anatómica de músculos estriados y tejido conectivo dependientes del control voluntario, que cumple funciones dentro de la cavidad pélvica. Los MPP forman una estructura de soporte y mantenimiento de posición para los órganos pélvicos (elevadores del ano, el cóccigeo, el esfínter anal externo, el esfínter uretral estriado y los músculos perineales superficiales y profundos) (Carrillo y col. 2013; Gómez y col. 2015).

Estos músculos, en particular, el músculo elevador del ano (MEA), cubre la mayor parte de la pelvis, está formado por tres fascículos o haces y su forma de “U” o “V” abierta hacia anterior, permite el paso de los extremos distales de los sistemas urinario (micción), genital (copula y el parto) y digestivo (defecación) (Carrillo y col. 2013). Juntos, los músculos elevadores del ano (3 fascículos o haces, pubococcígeo, puborrectal e iliococcígeo) y cóccigeo forman los músculos del piso pélvico (Hartmann y col. 2014). El haz pubococcígeo se origina lateral al haz puborrectal, en la sínfisis del pubis, sobrepasando el recto e insertándose a nivel del cóccix. El haz puborrectal se origina en la cara posterior de ambos lados de la sínfisis del pubis, siendo un músculo grueso que avanza con dirección posterior e inferior hasta detrás del recto a nivel de la unión anorrectal donde sus fibras se cruzan dando la característica forma de «U». El haz iliococcígeo se inserta en las regiones laterales a la sínfisis de pubis y en el arco tendinoso del músculo elevador del ano (un

engrosamiento ancho curvo y cóncavo de la fascia del obturador) y hacia la parte posterior se inserta en el ligamento ano coccígeo (Gómez y col. 2015) (Fig. 3).

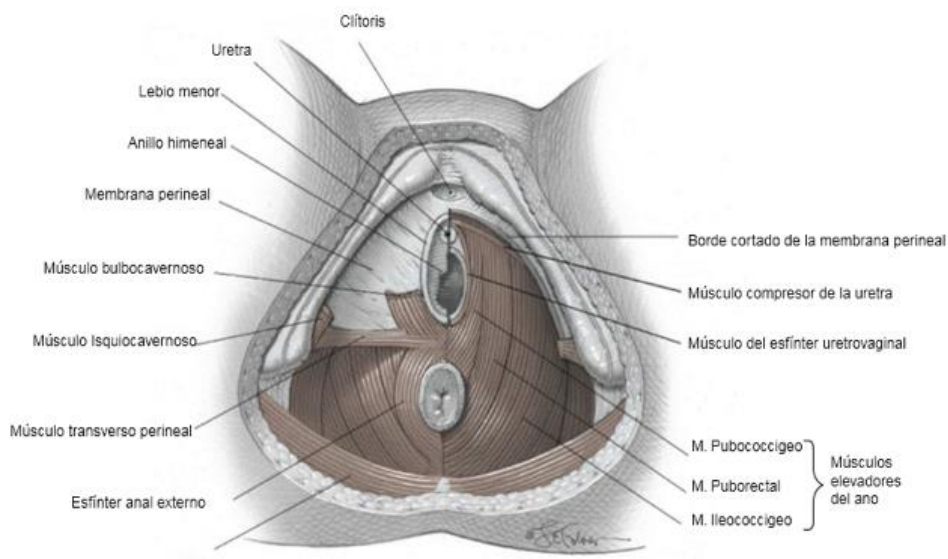


Figura 4. Esquema de la musculatura del piso pélvico. Tomada de Gómez y col. 2015.

Durante el embarazo, el aumento progresivo del volumen del útero somete a las estructuras perineales a una sobrecarga importante, así también, el aumento de la presión intraabdominal sobre la vejiga por parte del feto durante el embarazo puede conducir al debilitamiento de las estructuras del suelo pélvico (Arruda y col. 2019; Carrillo y col. 2013).

La distensión vaginal y el daño a las estructuras del piso pélvico durante el parto, se debe a demandas mecánicas impuestas a los MPP que superan los límites fisiológicos (Catanzarite y col. 2018) y con ello a la aparición de lesiones del piso pélvico, específicamente los defectos en la porción pubovisceral del elevador del ano, según se determina mediante el análisis de la expresión de moléculas relacionadas con el daño muscular, técnicas de imagen (resonancia magnética tridimensional), histomorfológicas (ATPasa, ACE) y electrofisiología (Carrillo y col. 2013; Cortes y col. 2005). De igual manera, existe la posibilidad de trauma en el músculo elevador del ano en la mujer (que conforman al músculo coccígeo, músculo puborectal y músculo iliococcígeo), determinando una prevalencia entre un 15 a un 35% de alteraciones anatómicas, además, pueden producirse lesiones a nivel de la inervación,

especialmente en los nervios pudendos lo cual provocaría una denervación y atrofia de este músculo, determinando una pérdida de la estructura y secundariamente un descenso del piso pélvico (Arruda y col. 2019; Carrillo y col. 2015).

El parto por intervención quirúrgica (cesárea) tiene un efecto protector sobre el prolapso temprano de los órganos pélvicos posparto, pero el modo de parto no difiere significativamente con respecto a la incidencia de incontinencia urinaria posparto o la fuerza de los MPP de la pelvis (Junqueira Vasconcellos de Oliveira y col. 2018).

La disfunción de los MPP se ha asociado con un riesgo significativamente mayor de los trastornos del suelo pélvico, como el prolapso de órganos pélvicos (POP) e incontinencia urinaria de esfuerzo (IUE); diferentes estudios han proyectado que la prevalencia de estas patologías aumentará a medida que la población mundial envejezca, con el embarazo y el número de partos, su incidencia máxima es en mujeres multíparas y posmenopáusicas (Alperin y col. 2016; Aoki y col. 2017; Arruda y col. 2019).

La International Urogynecological Association (IUGA) y la International Continence Society (ICS) han definido a la IUE como cualquier pérdida de orina involuntaria en asociación con tos, estornudos o algún esfuerzo físico (Aoki y col. 2017; Mironska y col. 2019).

El mecanismo de IUE tiene dos componentes, el primero es estructural, el soporte físico del tracto urinario y está compuesto por la musculatura del piso pélvico y el tejido conectivo; el segundo es neuromuscular y consiste en el mecanismo del nervio pudendo (NP) y el esfínter uretral externo (EUE). Las relaciones anatómicas y funcionales entre los músculos pélvicos y perineales contribuyen de manera importante al cierre de la uretra durante la continencia urinaria en las mujeres. En los partos, la IUE es probable que sea el resultado de una lesión estructural y neuromuscular (Carrillo y col. 2013).

Histológicamente, el músculo elevador del ano en humanos consiste en una combinación heterogénea de tipo I o fibras oxidativas (70%), responsables del mantenimiento del tono del piso pélvico, proporcionando así soporte a las vísceras pélvicas, y de tipo II o glucolítico (30%), activada durante el aumento de la presión intraabdominal (Do Carmo y col. 2011).

Estudios preclínicos para tratar la incontinencia con células progenitoras o células madre arrojaron resultados prometedores. En el adulto, la activación de las células satélite da como resultado la regeneración del tejido muscular estriado (Amend y col. 2015).

Otro modelo animal empleado en diversos estudios de estructura y función de los MPP aparte de la rata es la coneja doméstica, debido a que sus músculos pélvicos están bien desarrollados y son accesibles para análisis morfométricos y funcionales. Estudios evaluados en este modelo evidenciaron los efectos de la experiencia reproductiva sobre la estructura de los músculos pélvicos (mPc) y perineales (mBs) para procesos fisiológicos como la micción, demostrando que la multiparidad daña estos músculos, los cuales ayudan en las fases de almacenamiento y evacuación de la micción, lo cual modifica sus patrones de activación durante las diferentes etapas de micción (Martínez-Gómez 2011; López-García y col. 2016). De igual manera, estudios previos han evidenciado que el mBs y el mPc de conejos múltiparos muestran procesos asimétricos de daño, apoyados por la actividad de la β -glucuronidasa (López-García y col. 2016).

2.7 Musculatura pélvica de la rata, GLUT4 y daño muscular

Las ratas son el modelo animal más utilizado para estudiar los mecanismos de incontinencia y para las pruebas preclínicas de los tratamientos, a pesar de su estado cuadrúpedo, su anatomía e inervación de los músculos del piso pélvico muestran una clara similitud con los humanos. La musculatura pélvica de la rata tiene participación activa durante la cópula. En la rata, esta musculatura incluye el músculo pubococcígeo (mPc), coccígeo (mCc) e iliococcígeo (mIc) (Poortmans y Wyndaele.1998). El mPc en la rata es el músculo más grande del piso pélvico, se origina en la cara interna del hueso pélvico a nivel del acetábulo y se inserta en la tercera y cuarta vertebra caudal (Brink y Pfaff. 1980). Sus fibras ventromediales tienen tejido conectivo que se adhiere a la superficie peritoneal de la pared vaginal ventral y corre caudalmente, lateralmente al recto (Pacheco et al. 1989; Poortmans y Wyndaele 1998). Las fibras del mIc tienen su origen en el borde ventromedial del eje posterior a la muesca glútea a nivel del acetábulo; viajan caudalmente y se desarrollan dos tendones que recorren en sentido caudal corriendo a lo largo del borde lateral de la cola ventral, (Poortmans & Wyndaele 1998). El mPc

y el mIc 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 y col, 2011; Martínez-Gomez y col. 1992). Los músculos pubococcígeo e iliococcígeo en la rata son músculos constituidos por fibras rápidas principalmente (Poortmans y Wyndaele 1998) (Fig. 4). Mientras que, en el ser humano, son principalmente fibras de contracción lenta, siendo un ejemplo, de cómo las demandas mecánicas impuestas en los MPP, ya sea por la postura corporal vertical producen un cambio en las propiedades contráctiles y metabólicas del suelo pélvico (Poortmans & Wyndaele 1998).

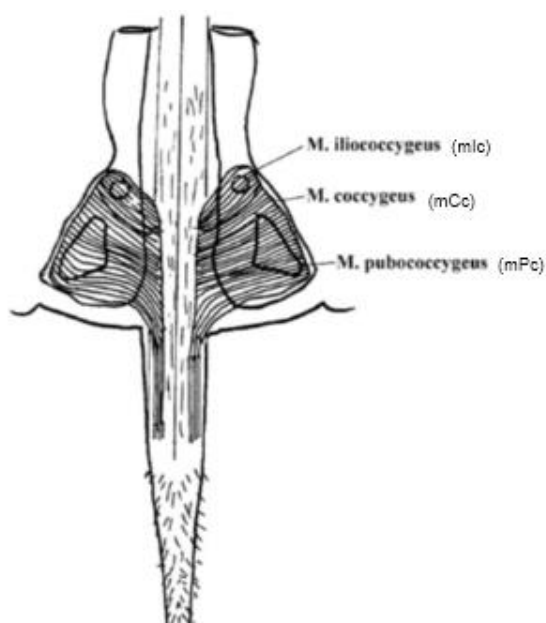


Figura 5 Esquema de la musculatura pélvica de la rata. Tomada de *Anat Rec 251:20-7*

El grupo de trabajo del Dr. Francisco Castelán ha evaluado la expresión del GLUT4 y su relación con acciones hormonales en el mIc y en el mPc de la rata. Recientemente han reportado que la expresión de GLUT4 parece estar regulada por estrógenos en el pubococcígeo, pero no en el iliococcígeo, hallazgo que coincide con una regulación similar del contenido de glucógeno (Carrasco-Ruiz y col. 2018). Debido a que la concentración sérica de estradiol incrementa hacia el final de la gestación en la rata y la factibilidad de localizar focos de daño muscular en músculos pélvicos de la rata, es posible predecir una regulación diferencial de la expresión de GLUT4 en ratas primíparas. Considerando los retos metabólicos a los que se enfrentan dichos músculos, las

alteraciones en la expresión de GLUT4 serían de relevancia para comprender el daño que sufre la musculatura pélvica.

Dado que las afecciones musculares constituyen una de las condiciones debilitantes más severas, es posible suponer la evaluación de una amplia variedad de compuestos y estrategias farmacológicas para reducir el daño o acelerar la regeneración muscular. Uno de estos compuestos es el péptido XT1, cuya actividad en regeneración muscular ha resultado suficientemente atractiva con fines de patente. Al respecto se ha especulado que podría actuar mediante vías de señalización relevantes para la activación y diferenciación de precursores celulares involucrados en regeneración. Datos preliminares del grupo de investigación del Dr. Castelán sugieren la existencia de un vínculo entre la administración de XT1, la expresión de GLUT4 y la reducción del daño en músculos pélvicos de ratas primíparas en el postparto tardío ya que la expresión de GLUT4 y su translocación hacia sitios de membrana es un eslabón crítico en la cadena de procesos fisiológicos que conducen a la regeneración muscular. En este contexto hemos considerado pertinente evaluar el efecto de XT1 aplicado el día del parto y determinar su influencia sobre la expresión de GLUT4 en ratas primíparas en el postparto temprano.

En músculos de las extremidades, el daño muscular está relacionado con una reducción transitoria de la expresión de GLUT4 (Asp y col. 1995). Ciertamente la recuperación de su expresión podría resultar de interés para comprender la regeneración de músculos del piso pélvico después del parto.

2.2 Toxinas clostridiales

Las toxinas clostridiales son un grupo de proteínas simples u holoproteínas sintetizadas por bacterias del género *Clostridium sp.*, pertenecientes a la familia de bacilos gram-positivos, anaerobios y formadores de esporas. En este grupo de toxinas se incluyen a la toxina tetánica, la cual es una neurotoxina de naturaleza proteica sintetizada por la bacteria *Clostridium tetani*, y por otro lado la toxina botulínica, sintetizada por algunas cepas de *C. botulinum*, *C. barati* y *C. butiryicum*. Las toxinas tetánica y botulínica afectan al sistema nervioso y son los agentes causantes de las enfermedades del tétanos y el botulismo (Popoff y col. 2001), las cuales se caracterizan por contracción muscular y espasmos recurrentes (Patricio Martínez 2017).

2.3 Toxina tetánica

La toxina tetánica, actúa sobre el sistema nervioso al inhibir la liberación de neurotransmisores como glicina y GABA (Popoff y col. 2001; Poulain 1994). Esta toxina está conformada por una proteína clasificada como metaloproteasa de zinc (Zn^{2+}), la cual se sintetiza como un polipéptido de cadena sencilla de 150 kDa de peso molecular (Calvo y col. 2012; Surana y col. 2017) y es modificado de manera post-traduccional por proteasas propias de la bacteria para producir dos cadenas unidas por puentes disulfuro; la cadena pesada (CH) de 100 kDa y la cadena ligera (CL) de 50 kDa, las dos cadenas se pueden subdividir en tres dominios diferentes tanto estructural como funcional, cada uno con aproximadamente 50 kDa, el dominio de unión neuroespecífica, dominio de traslocación de membrana y el dominio catalítico (Calvo y col. 2012; Toivonen y col. 2010; Turton y col. 2002).

La CL situada en el extremo N-terminal, contiene el dominio catalítico de la toxina, actúa en el citosol y tiene una actividad neurotóxica, ejerciendo una actividad de metaloproteasa de zinc contra la proteína integral VAMP/sinaptobrevina o proteína de membrana asociada a vesículas sinápticas o sinaptobrevina (requerida para la liberación de neurotransmisores) (Poulain 1994; Toivonen y col. 2010). La escisión proteolítica de VAMP/sinaptobrevina en las sinapsis de las interneuronas inhibitorias evita la liberación de GABA y glicina en la hendidura sináptica y produce excitación sostenida de la neurona motora causando espasmos tetánicos (Pellizari y col. 1999; Toivonen y col. 2010).

La CP situada en el extremo C-terminal, está formado por dos fragmentos funcionales no tóxicos de 50 kDa cada uno, H_N y H_C , el dominio de translocación de la membrana (extremo amino-terminal o N-terminal (H_N)), que forma canales iónicos en la membrana celular y permite el paso de la CL hacia el lumen celular y el extremo carboxilo-terminal o C-terminal (H_C) (denominado XT1) es el dominio no tóxico y es el responsable de la unión específica a las membranas neuronales (unió a gangliósido C) y su posterior internalización de la toxina en la célula diana. Este fragmento carece de la toxicidad de toda la toxina y posee la capacidad de unirse a las neuronas terminales, así como de atacar específicamente las neuronas motoras.

(Figura 1 y 2) (Calvo y col. 2012; Candalija 2015; Poulain 1994; Pellizan y col. 1999; Toivonen y col. 2010).

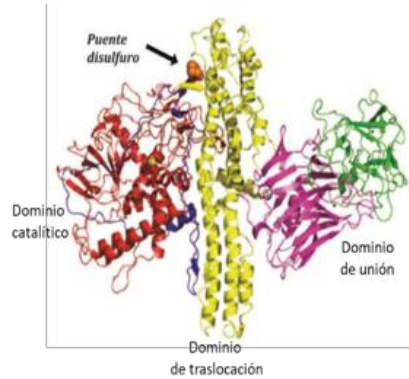


Fig. 2) Esquema de la estructura tridimensional de la toxina tetánica, esquematizado en colores los dominios proteicos. (Tomado y modificado de Calvo y col. 2012).

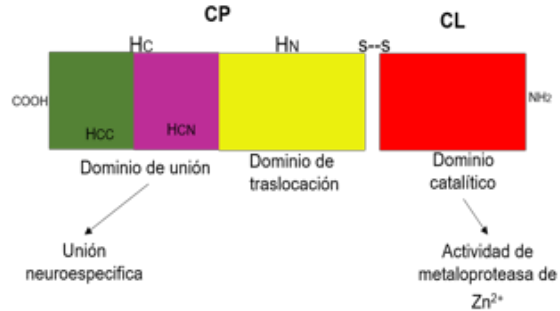


Fig. 3) Esquema de la estructura proteica de la toxina tetánica (Tomado y modificado de Calvo y col. 2012).

2.4 Mecanismo de acción

El XT1 se une a la membrana presináptica de la unión neuromuscular (gangliósidos de la superficie celular), dependiente de clatrina y tráfico intracelular dentro de vesículas endocíticas e interrumpe la liberación de neurotransmisores como GABA y glicina, al escindir las proteínas involucradas en la fusión específica de la membrana vesicular, se internaliza y se transporta retroaxonalmente a la médula espinal (Pellizzari y col. 199; Popoff y col. 2001). Hallazgos recientes mostraron que tanto la unión como la internalización están mediadas por la CP, mientras que el bloqueo intracelular de la liberación de neurotransmisores involucra solo la CL (Poulain 1994; Surana y col. 2017).

La supervivencia neuronal depende de la exposición constante a neurotrofinas (NT) o factores de crecimiento, los cuales son polipéptidos que controlan la generación, supervivencia, diferenciación, regeneración y apoptosis de las neuronas en el sistema nervioso central y periférico (Pan y col. 2009; Toivonen y col. 2010) mediante la unión a dos tipos de receptores de superficie celular: tirosinas cinasas (Trk) y el receptor de neurotrofina p75^{NTR} (Toivonen y col. 2010).

Se ha demostrado que el XT1 y algunos factores de crecimiento, por ejemplo, el factor de crecimiento neuronal (NGF) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF),

desencadenan las mismas vías de transducción de señales. La vía del BDNF requiere la activación de MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos), que conducen a un incremento del CREB y, finalmente, de la transcripción de Bcl-2. Una segunda vía envuelve la activación de la adenilciclase y la PKA (proteína quinasa A), por mediación de receptores ligados con proteínas G, que conduce a la activación de CREB, y el subsecuente aumento en la expresión del BDNF (Moreno-Galarza y col. 2018).

El XT1 y el NGF comparten los mismos orgánulos de transporte retrógrados dentro de las neuronas motoras, en compartimentos que incluyen neurotrofinas y sus receptores, lo que sugiere que el receptor de neurotrofina p75^{NTR} es el primer marcador de membrana de la vía endocítica retrógrada utilizada por XT1, sirviendo como una señal "natural" para potenciar la focalización de los factores que se espera mejoren la viabilidad neuronal al inducir señales de supervivencia y contrarrestar la muerte celular (Toivonen y col. 2010). Se ha evidenciado que el XT1 ingresa a las neuronas motoras junto con los receptores de neurotrofina TrkB y p75^{NTR} (Calvo y col. 2012; Toivonen y col. 2010). Recientemente se ha demostrado que XT1 puede albergar propiedades terapéuticas (Moreno-Galarza y col. 2018; Toivonen y col. 2010).

2.5 Propiedades neuroprotectoras del péptido XT1

Las propiedades neuroprotectoras del fragmento XT1 parecen depender de la señalización a través de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y la proteína quinasa B (también llamada Akt). Induce la fosforilación del receptor de tirosina cinasa, el factor neuronal derivado del cerebro (BDNF), la activación de la vía Akt. El XT1 recombinante de la toxina tetánica, carece de la toxicidad de toda la toxina, posee la capacidad de unirse a las neuronas terminales y de ser transportado retroaxonalmente, así como también, la neuroprotección por factores neurotróficos deriva de su potencial para inducir estas vías a través de sus receptores Trk (Moreno-Galarza y col. 2018; Toivonen y col. 2010).

De igual manera, se ha demostrado que el XT1, refuerza las células neuronales y las protege de agresiones externas, así como de promover la supervivencia de las neuronas motoras en cultivos e in vivo después de la sección del nervio (Pan y col. 2009; Toivonen y col. 2010).

Es decir, tiene un efecto neuroprotector que evita la muerte de las neuronas cuando se les somete a situaciones agresivas.

El BDNF y la neurotrofina 4 (NT-4) se regulan positivamente en el músculo diana después de una lesión nerviosa. Por el contrario, los mismos factores neurotróficos se regulan a la baja después de una lesión muscular para permitir la regeneración de la unión neuromuscular (Pan y col. 2009).

Por este motivo, se ha evidenciado que el XT1 puede ser más eficaz que las neurotrofinas. Aunque el mecanismo detallado sobre cómo el XT1 activa al receptor Trk aún no se ha dilucidado, es probable que tenga similitudes con los factores de crecimiento y es concebible que la activación de Akt y MAPK/ERK por XT1 mejore su endocitosis por las neuronas (Toivonen y col. 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

El parto representa uno de los principales factores de riesgos para el desarrollo de incontinencia urinaria de esfuerzo debido a la distensión de fibras musculares representando un problema a nivel mundial que afecta la calidad de vida de un gran número de mujeres, siendo una piedra angular de estos trastornos pélvicos, conocerlo ayudaría a la calidad de vida de este suelo pélvico. Es por ello, que en este trabajo pretendemos evaluar el efecto del XT1, usando como sujeto experimental a la rata hembra.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto del péptido XT1 sobre el daño bioquímico en el músculo iliococcígeo y pubococcígeo de ratas primíparas dentro de los primeros 3 días posparto?

5. HIPÓTESIS

El efecto del péptido XT1 reduce el daño en el músculo iliococcígeo, pero no en el pubococcígeo dentro de los primeros 3 días postparto.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar el efecto del péptido XT1 sobre el daño de los músculo iliococcígeo y pubococcígeo obtenidos el día 3 postparto en la rata primípara

6.2 Objetivos específicos

En ratas primíparas, administradas o no con XT1, y sacrificadas el día 3 postparto:

1. Cuantificar los niveles de glucosa sérica
2. Evaluar la expresión relativa y distribución del transportador de glucosa 4 (GLUT4) en los músculos iliococcígeo y pubococcígeo.
3. Analizar el contenido de glucógeno en los músculos iliococcígeo y pubococcígeo.
4. Evaluar la actividad de la beta-glucoronidasa.

7. METODOLOGÍA

7.1 Animales

Se utilizaron 18 ratas de la cepa Wistar de 3 meses de edad alojadas 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. El uso y manejo de estos animales para experimentación descritos en este protocolo fueron aprobados por el Comité de Bioética del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (UATx), en apego a los lineamientos para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM).

7.2 Grupos experimentales

Las ratas primíparas (P) tuvieron su primera cópula (día 0 de gestación) a los 3 meses de edad con machos sexualmente expertos de la colonia. Las ratas nulíparas (Null, n=6) fueron sacrificadas (en el ciclo estral de proestro) aproximadamente a los 4 meses de edad para que coincida con la de las primíparas. Las ratas primíparas fueron sacrificadas el día 3 postparto (grupo P3, n=12). Las ratas del grupo P3 (n=6, c/u) recibieron una única dosis (i.p.) de XT1 (P3+XT1) diluido en solución salina (0.9% NaCl, SS) y la otra mitad (n=6, c/u) solo el vehículo de administración (P3+SS). Las ratas de los grupos experimentales fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (120 mg/kg de peso, i.p.) y las crías mediante decapitación. El día del sacrificio registramos el peso corporal y el peso húmedo del útero. Se realizó la disección de los músculos pubococcígeo e iliococcígeo. Posterior a su extracción, cada músculo izquierdo se congeló inmediatamente y fue almacenado a -80° C hasta su procesamiento.

7.3 Cuantificación de glucosa y glucógeno:

Se obtuvo sangre por punción cardíaca, se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos, se obtuvo el plasma y se congeló y almacenó a -80°C hasta su cuantificación. 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 ácido clorhídrico (HCl) 2N y como control hidróxido de sodio (NaOH) 2N, se agregó el tejido y se homogenizó, se calentó en baño maría hirviendo durante una hora y se

agitó cada 10 minutos, se centrifugo a 10000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante que contenía el producto de la hidrólisis se midió usando un método enzimático colorimétrico para medir la glucosa usando un kit comercial (Stanbio Laboratory). Para ambos protocolos el peso de la porción de músculo fue registrado. El contenido de glucógeno muscular se calculó como la diferencia entre las cadenas de glucógeno y la glucosa libre y se expresó como milimoles de unidades de glucosilo por gramo de peso muscular húmedo. Para el cálculo de la cantidad de glucógeno se utilizó la fórmula citada por Zhang 2012.

$$\frac{\text{Absorbancia (muestra)} / \text{Absorbancia (estándar)} \times \text{Concentración del estándar} \times \text{Volumen (estándar)}}{\text{Volumen total} / \text{Volumen (muestra)} / \text{Peso de la muestra} \times 1000}$$

La cuantificación de glucosa se realizó usando un kit comercial (Licon) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió usando un espectrofotómetro a una absorbancia de 492nm.

7.4 Actividad de la β -glucuronidasa:

Aproximadamente ~100 mg de cada músculo se rompieron usando un homogeneizador electrónico (TissueTearor, BioSpec Products, Inc.) en tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, glicina 100 mM, NaCl 100 mM, Triton X-100 al 0.1%, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, DL-ditiotreitol 1 mM) añadido a un cóctel inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich, México). Los homogeneizados se centrifugaron a 19900 xg durante 30 min a 4°C en una centrífuga refrigerada (Legend Micro 21 R, Thermo Scientific). Se recogió el sobrenadante y se midió la concentración de proteína utilizando el método de Bradford. Brevemente, a cada sobrenadante se mezcló con tampón de acetato 100 mM, pH 4.2 y se incubó durante 5 min a 37 ° C. Posteriormente, se agregó p-nitrofenil- β -D-glucurónido (Sigma - Aldrich, México) 5 mM como sustrato enzimático y se incubó durante 18 horas a 37 ° C. La reacción enzimática se detuvo con tampón de glicina 100 mM frío, pH 10. Los tubos se centrifugaron a 5200 xg durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se utilizaron para medir la actividad de la β -glucuronidasa mediante espectrofotometría con un dispositivo digital (Novaspec II, espectrofotómetro visible). El p-nitrofenol (4-nitrofenol, Sigma–Aldrich) se consideró como el producto final de

la reacción enzimática y se usó para construir una curva estándar. Las muestras y los estándares se midieron a 420 nm por duplicado. Las mediciones se expresaron como mmol de p-nitrofenol · h · kg de proteína total.

7.5 Expresión de transportadores de glucosa 4 (GLUT4):

El tejido fue homogenizado con un homogenizador electrónico en buffer de lisis (0.02M tris HCl pH 7.4, 0.1M NaCl, 0.1M glicina y Tx 0.1%) adicionado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma), 1mM PMSF y 1 mM ditioneitol. 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 con el método de Laemmli (1970). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa usando el sistema Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). Las membranas se incubaron con una solución de 5% 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 (GLUT4 antibody cat. Santa Cruz Biotechnology) diluidos 1:250 en leche descremada al 1% y 0.1% tween-20 en TBS. Después fueron incubadas con el anticuerpo secundario (anti-mouse 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 la exposición de placas radiográficas a las membranas. Se midió mediante densitometría con el programa ImageJ. Los resultados obtenidos fueron expresados en unidades arbitrarias.

7.6 Análisis de resultados:

Los datos representan el promedio \pm error estándar del promedio (EE), a menos que se indique otra cosa. Para el análisis de los resultados obtenidos se utilizó un análisis de varianza de una vía para muestras independientes. Para identificar las diferencias entre grupos se aplicó una prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples. En cualquier caso, se consideró una $P < 0.05$ como estadísticamente significativa. En todos los casos se usó el programa de análisis estadístico Prism 6 para Windows (GraphPad).

8. RESULTADOS

El análisis de la masa corporal al día del sacrificio mostró un incremento significativo en el grupo P3+SS (283.0 ± 7.50 g) y P3+XT1 (282.2 ± 2.328 g) con respecto al grupo Null (236.0 ± 5.88 g) ($F_{(2,15)}=22.51$, $P<0.0001$).

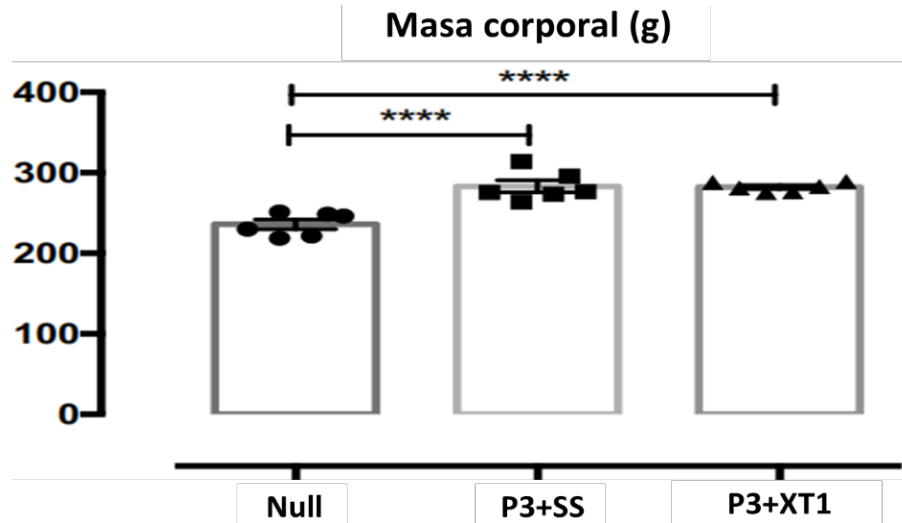


Figura 6. Masa corporal de los grupos de ratas Nullíparas (Null) y de ratas primíparas sacrificadas el día 3 posparto administradas con solución salina (P3+SS) y XT1 (P3+XT1). Los datos muestran la media \pm E.E. Los datos fueron analizados mediante una ANOVA (una vía) para identificar las diferencias entre grupos se utilizó una prueba post-hoc de Tukey.

Los niveles séricos de glucosa no difirieron significativamente entre el grupo Null (144.5 ± 6.27 mg/dL), P3+SS (142.7 ± 6.30 mg/dL) y P3+XT1 (161.3 ± 13.58 mg/dL) ($F_{(2,15)}=1.196$, $P < 0.3297$).

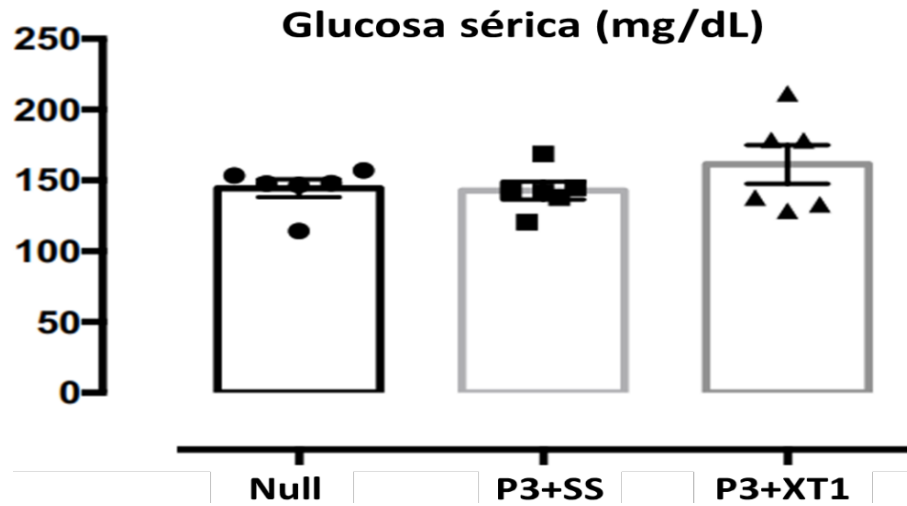


Figura 7. Glucosa sérica de los grupos de ratas Nulíparas (Null) y de ratas primiparas sacrificadas el día 3 posparto administradas con solución salina (P3+SS) y XT1 (P3+XT1). Los datos muestran la media \pm E.E. Los datos fueron analizados mediante una ANOVA (una vía), para identificar las diferencias entre grupos se utilizó una prueba post-hoc de Tukey.

El peso húmedo del mIc indica un incremento al comparar el grupo P3+SS (0.0616±0.011 g) y una disminución en el grupo P3+XT1 (0.0366±0.004 g) con respecto al grupo Null (0.029±0.004 g) ($F_{(2, 15)}=4.749$, $P<0.05$). Mientras que en el mPc no se encontraron diferencias significativas entre el grupo Null (0.01158±0.004 g), P3+SS (0.1275±0.011 g) y P3+XT1 (0.1208±.009 g) ($F=0.4178$, $P<0.6659$).

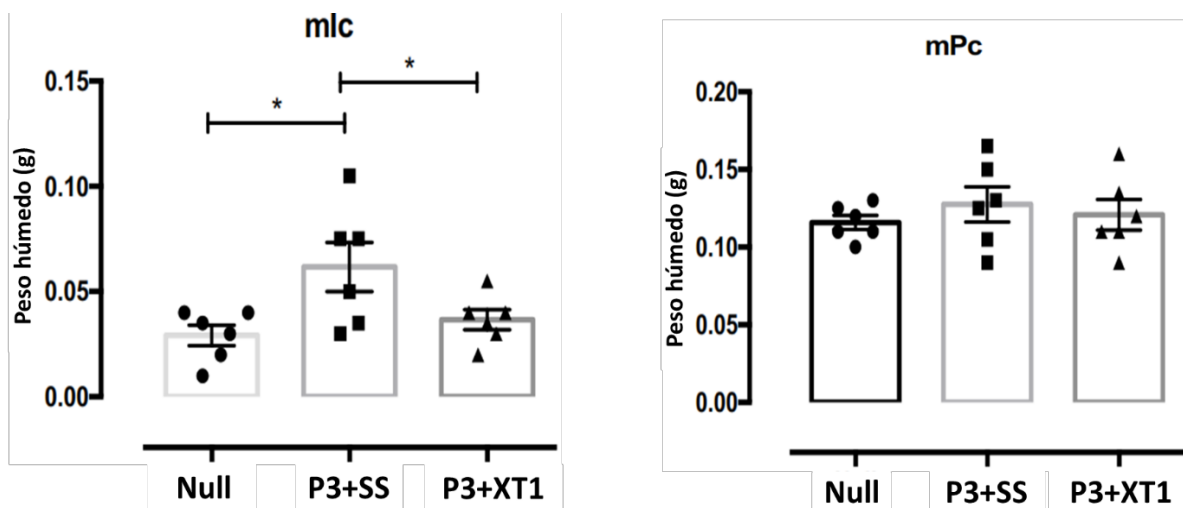


Figura 8. Peso húmedo del mIc y mPc de los grupos de ratas Nulíparas (Null) y de ratas primíparas sacrificadas el día 3 posparto administradas con solución salina (P3+SS) y XT1 (P3+XT1). Los datos muestran la media ± E.E. Los datos fueron analizados mediante una ANOVA (una vía) para identificar las diferencias entre grupos se utilizó una prueba post-hoc de Tukey.

En el peso muscular normalizado del mIc no se encontraron diferencias significativas entre el grupo Null (12.38 ± 2.150 mg/100g), P3+SS (21.99 ± 4.386 mg/100g) y P3+XT1 (13.03 ± 1.722 mg/100g) ($F=1.150$, $P=0.3431$), así como en el mPc del grupo Null (49.20 ± 2.211 mg/100g), P3+SS (44.91 ± 3.612 mg/100g) y P3+XT1 (42.73 ± 3.22 mg/100g), ($F=3.229$, $P=0.0682$).

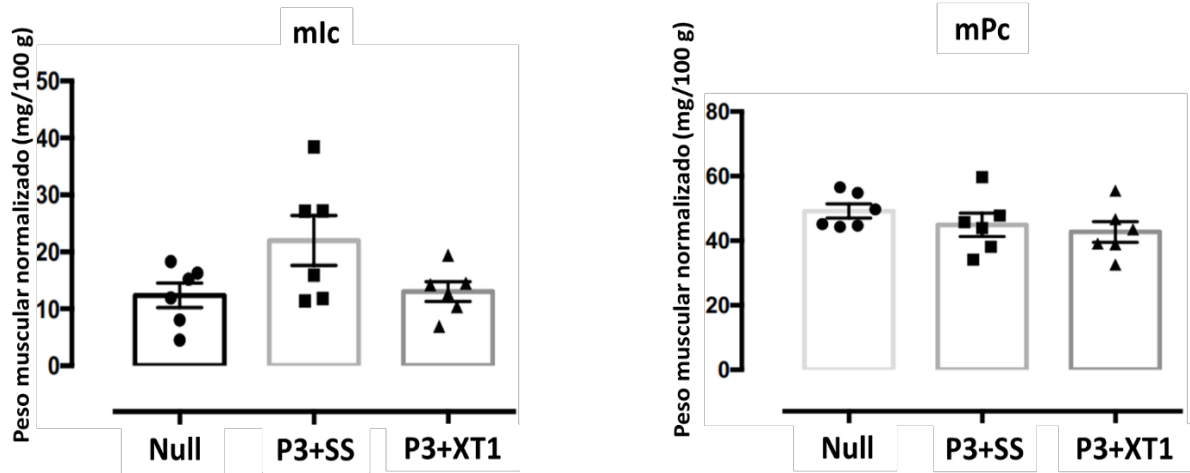


Figura 9. Peso muscular normalizado del mIc y mPc de los grupos de ratas Nulíparas (Null) y de ratas primíparas sacrificadas el día 3 posparto administradas con solución salina (P3+SS) y XT1 (P3+XT1). Los datos muestran la media \pm E.E. Los datos fueron analizados mediante una ANOVA (una vía) para identificar las diferencias entre grupos se utilizó una prueba post-hoc de Tukey.

El ancho del mIc del grupo Null (3.120 ± 0.145 mm), P3+SS (3.133 ± 0.155 mm) y P3+XT1 (3.057 ± 0.186 mm) ($F=0.06268$, $P=0.9395$) y largo del grupo Null (13.02 ± 0.348 mm), P3+SS (12.80 ± 0.297 mm) y P3+XT1 (12.91 ± 0.204 mm) no se encontraron diferencias significativas ($F=0.1378$, $P=0.8724$).

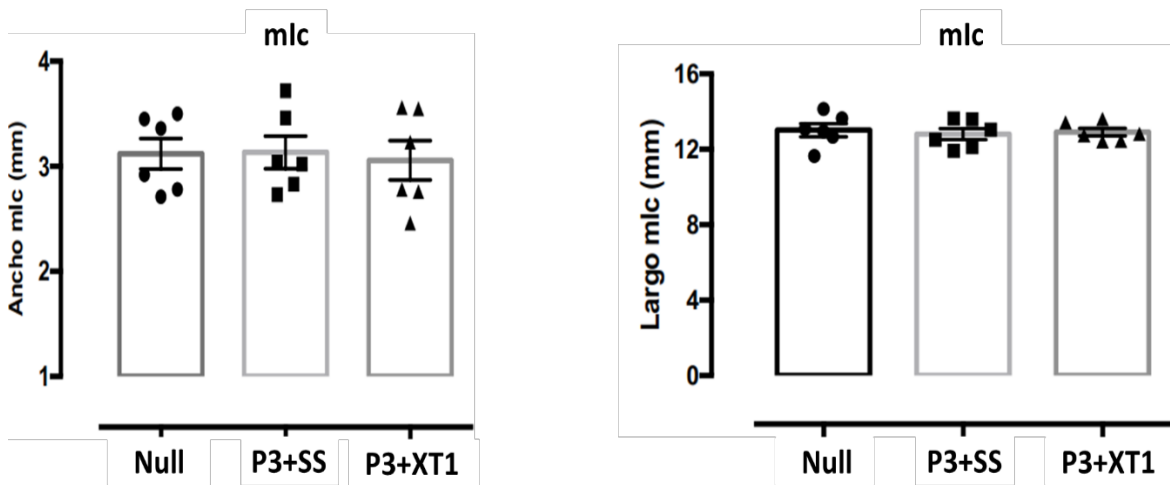


Figura 10. Ancho y largo del mIc de los grupos de ratas Nullíparas (Null) y de ratas primíparas sacrificadas el día 3 posparto administradas con solución salina (P3+SS) y XT1 (P3+XT1). Los datos muestran la media \pm E.E. Los datos fueron analizados mediante una ANOVA (una vía), para identificar las diferencias entre grupos se utilizó una prueba post-hoc de Tukey.

Respecto a la medición del ancho del grupo Null (4.144 ± 0.1980 mm), P3+SS (4.389 ± 0.1246 mm) y P3+XT1 (4.374 ± 0.090 mm) ($F=0.8978$, $P=0.4283$) y el largo del grupo Null (17.73 ± 0.589 mm), P3+SS (17.99 ± 0.3315 mm) y P3+XT1 (17.77 ± 0.517 mm) en el mPc no se observaron diferencias significativas ($F=0.08377$, $P=0.9201$).

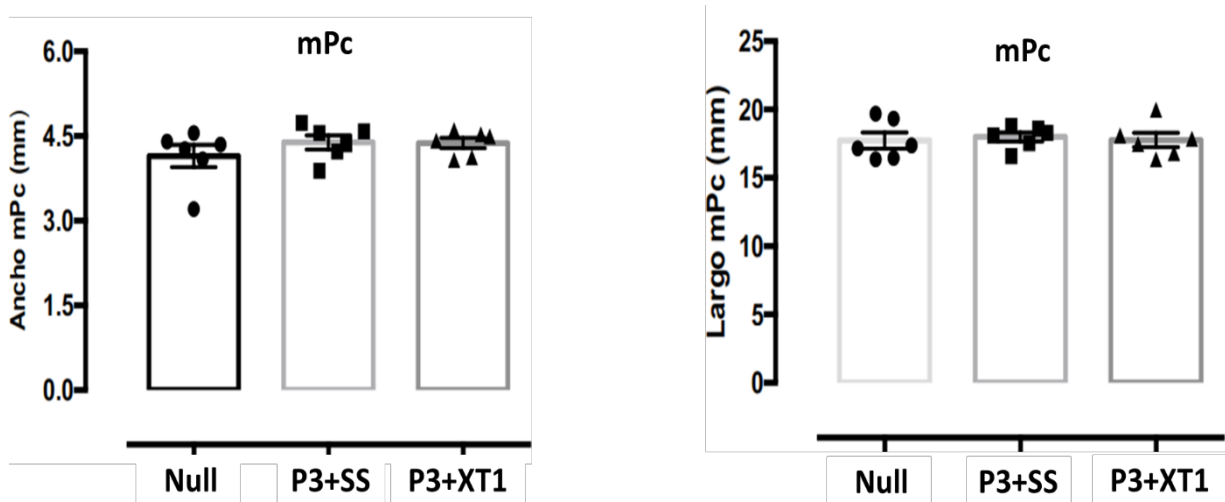


Figura 11. Ancho y largo del mPc de los grupos de ratas Nullíparas (Null) y de ratas primíparas sacrificadas el día 3 posparto administradas con solución salina (P3+SS) y XT1 (P3+XT1). Los datos muestran la media \pm E.E. Los datos fueron analizados mediante una ANOVA (una vía) para identificar las diferencias entre grupos se utilizó una prueba post-hoc de Tukey.

La concentración de glucógeno en el mIc del grupo Null (2.743 ± 0.86 mmoles), P3+SS (2.422 ± 0.66 mmoles) y P3+XT1 (2.615 ± 0.78 mmoles) ($F=0.04087$, $P=0.9601$) y del mPc del grupo Null (0.9367 ± 0.14 mmoles), P3+SS (1.101 ± 0.085 mmoles) y P3+XT1 (0.6010 ± 0.23 mmoles) no se observaron diferencias significativas. ($F=2.242$, $P=0.1453$)

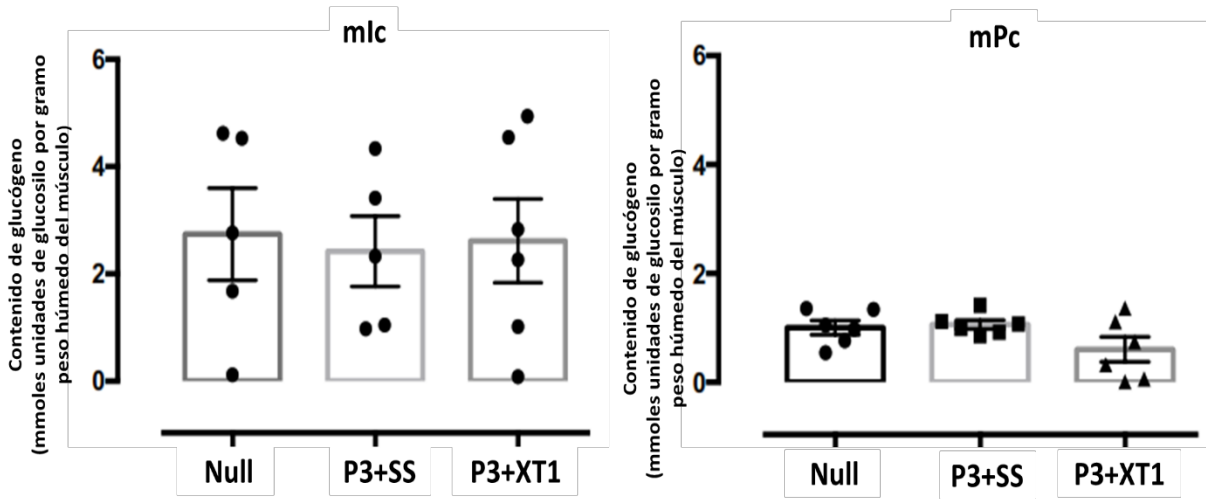


Figura 12. Concentración de glucógeno en el mIc y el mPc de los grupos de ratas Nullíparas (Null) y de ratas primíparas sacrificadas el día 3 posparto administradas con solución salina (P3+SS) y XT1 (P3+XT1). Los datos fueron analizados mediante una ANOVA (una vía), para identificar las diferencias entre grupos se utilizó una prueba post-hoc de Tukey.

El peso húmedo del músculo sóleo indicó un incremento significativo al comparar el grupo P3+XT1(0.1183±0.0047g) con el grupo Null (0.100±0.0044g), no observando diferencias en el grupo P3+SS (0.1117±0.0040g) ($F_{(2,15)}=4.387$, $P=0.05$). En cuanto al peso normalizado no se encontraron diferencias significativas entre los grupos Null (41.27±0.52 mg/100g), P3+SS (38.96±1.40 mg/100g) y P3+XT1 (41.32±1.69 mg/100g), ($F=1.062$, $P=0.3705$).

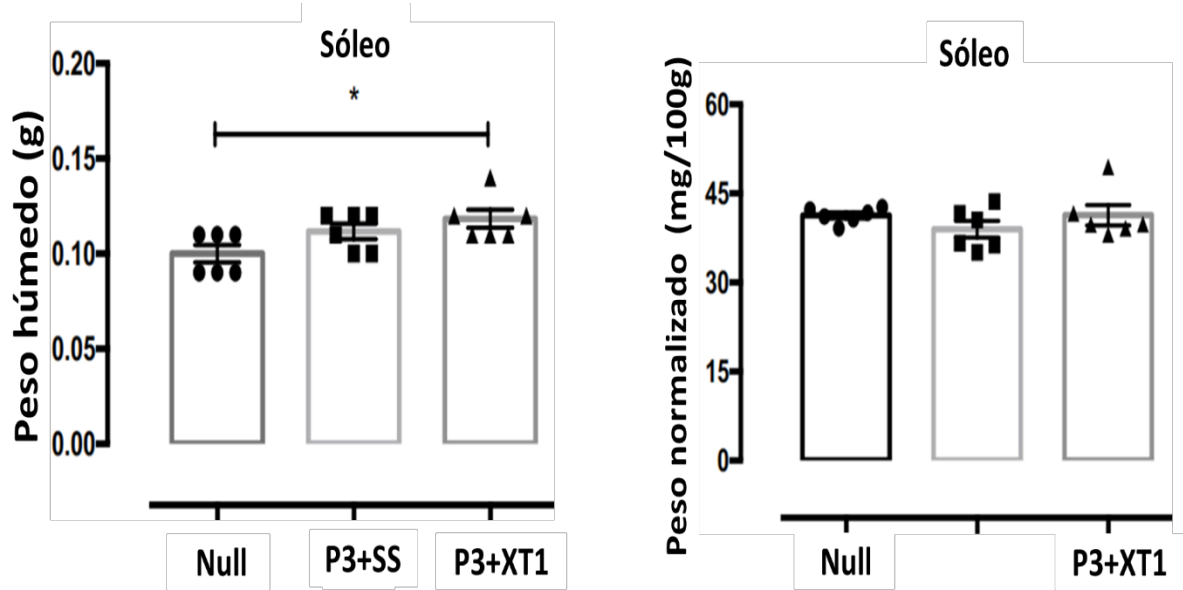


Figura 13. Peso húmedo y peso normalizado de los grupos de ratas Nulíparas (Null), y de ratas primíparas sacrificadas el día 3 posparto administradas con solución salina (P3+SS) y XT1 (P3+XT1). Los datos muestran la media ± E.E. Los datos fueron analizados mediante una ANOVA (una vía) para identificar las diferencias entre grupos se utilizó una prueba post-hoc de Tukey.

El ancho del músculo sóleo entre los grupos Null (5.240 ± 0.085 mm), P3+SS (5.377 ± 0.201 mm) y P3+XT1 (5.635 ± 0.065 mm) ($F=2.314$, $P=0.1331$) y el largo de los grupos Null (23.42 ± 0.599 mm), P3+SS (22.88 ± 0.878 mm) y P3+XT1 (22.00 ± 0.131 mm) no mostraron diferencias significativas ($F=1.347$, $P=0.2898$).

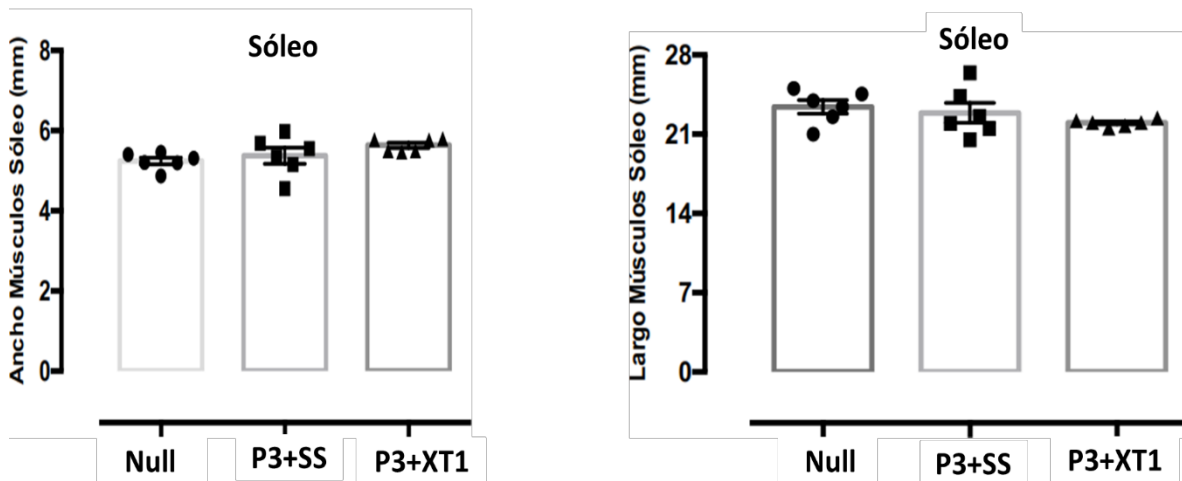


Figura 14. Ancho y largo del músculo sóleo entre los grupos de ratas nulíparas (Null) y de ratas primíparas sacrificadas el día 3 posparto administradas con solución salina (P3+SS) y XT1 (P3+XT1). Los datos muestran la media \pm E.E. Los datos fueron analizados mediante una ANOVA (una vía) para identificar las diferencias entre grupos se utilizó una prueba post-hoc de Tukey.

En el peso húmedo del músculo EDL se encontró un incremento de peso en el grupo P3+XT1 (0.1217 ± 0.0047 g) comparado con el grupo Null (0.1017 ± 0.0047 g) mientras que en el grupo P3+SS no existieron diferencias (0.1067 ± 0.0055 g) ($F_{(2,15)}=4.239$, $P<0.05$). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en el peso normalizado de los grupos Null (41.85 ± 2.258 g) P3+SS (36.51 ± 1.308 g) y P3+XT1 (41.71 ± 2.073 g) ($F=2.505$, $P=0.1152$).

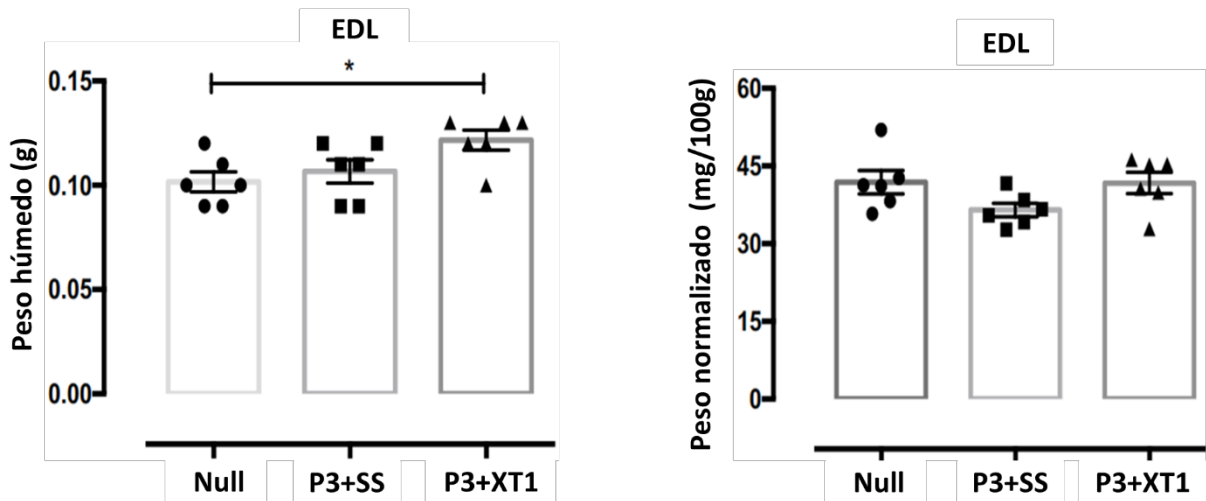


Figura 15. Peso húmedo y peso normalizado del músculo EDL entre los grupos de ratas Nulíparas (Null) y de ratas primíparas sacrificadas el día 3 posparto administradas con solución salina (P3+SS) y XT1 (P3+XT1). Los datos muestran la media \pm E.E. Los datos fueron analizados mediante una ANOVA (una vía) para identificar las diferencias entre grupos se utilizó una prueba post-hoc de Tukey.

El ancho de los grupos Null (4.003 ± 0.243 mm) P3+SS (4.116 ± 0.2615 mm) y P3+XT1 (3.974 ± 0.1405 mm) ($F=0.1063$, $P=0.8999$) y el largo de los grupos Null (27.01 ± 0.477 mm) y P3+SS (28.25 ± 0.785 mm) y P3+XT1 (29.05 ± 0.605 mm) de los músculos EDL no se encontraron diferencias ($F=2.530$, $P=0.1153$).

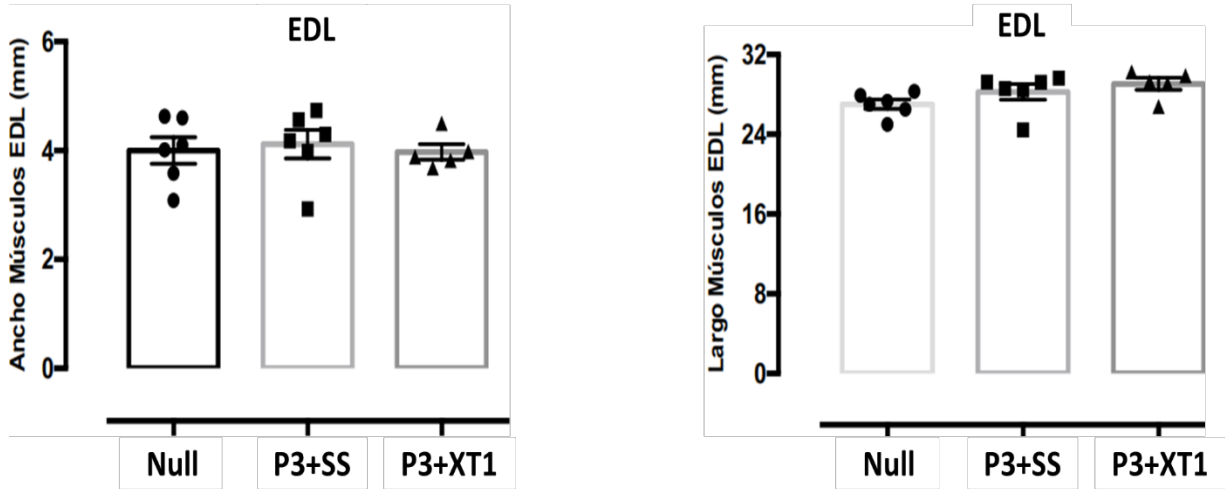


Figura 16. Ancho y largo del músculo EDL entre los grupos de ratas Nulíparas (Null) y de ratas primíparas sacrificadas el día 3 posparto administradas con solución salina (P3+SS) y XT1 (P3+XT1). Los datos muestran la media \pm E.E. Los datos fueron analizados mediante una ANOVA (una vía) para identificar las diferencias entre grupos se utilizó una prueba post-hoc de Tukey.

El peso normalizado de los ovarios de los grupos Null (29.24 ± 2.537 mg/100g), P3+SS (35.59 ± 2.53 mg/100g) y P3+XT1 (28.19 ± 3.937 mg/100g) no se encontraron diferencias ($F=1.694$, $P=0.2171$).

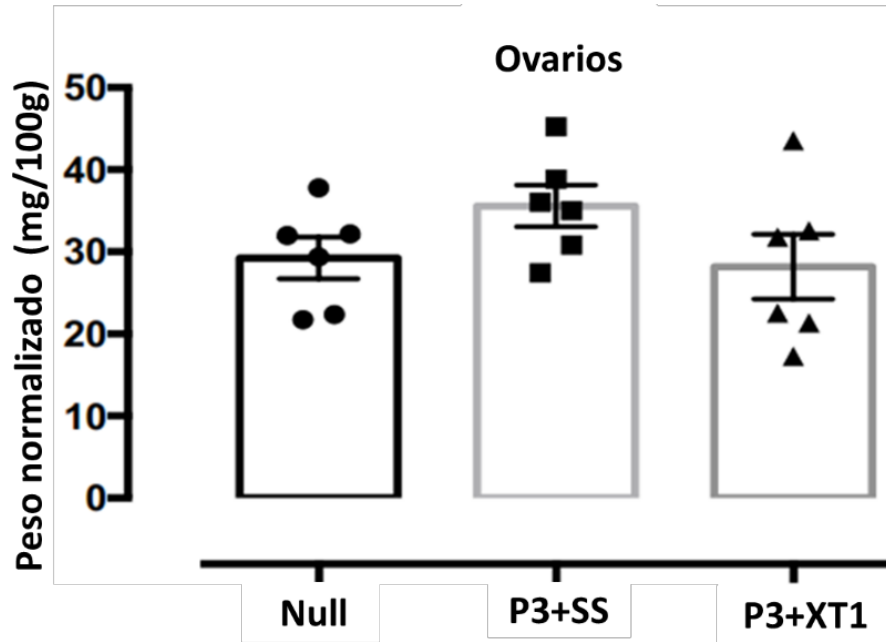


Figura 17. Peso normalizado de los ovarios entre los grupos de ratas Nulíparas (Null) y de ratas primíparas sacrificadas el día 3 posparto administradas con solución salina (P3+SS) y XT1 (P3+XT1). Los datos muestran la media \pm E.E. Los datos fueron analizados mediante una ANOVA (una vía) para identificar las diferencias entre grupos se utilizó una prueba post-hoc de Tukey.

En la figura 18 se observa un incremento de peso húmedo del útero en el grupo P3+SS (1.018±0.105 g) y P3+XT1 (1.080±0.060) con respecto al grupo Null (0.570±0.052 g) ($F_{(2,15)}=13.25$, $P<0.001$). De igual manera, se observa un incremento en el peso normalizado del grupo P3+SS (0.3622±0.041 mg/100g) y P3+XT1 (0.3825±0.020 mg/100g) con respecto al grupo Null (0.2408±0.20 mg/100g) ($F_{(2,15)}=6.6984$, $P<0.001$).

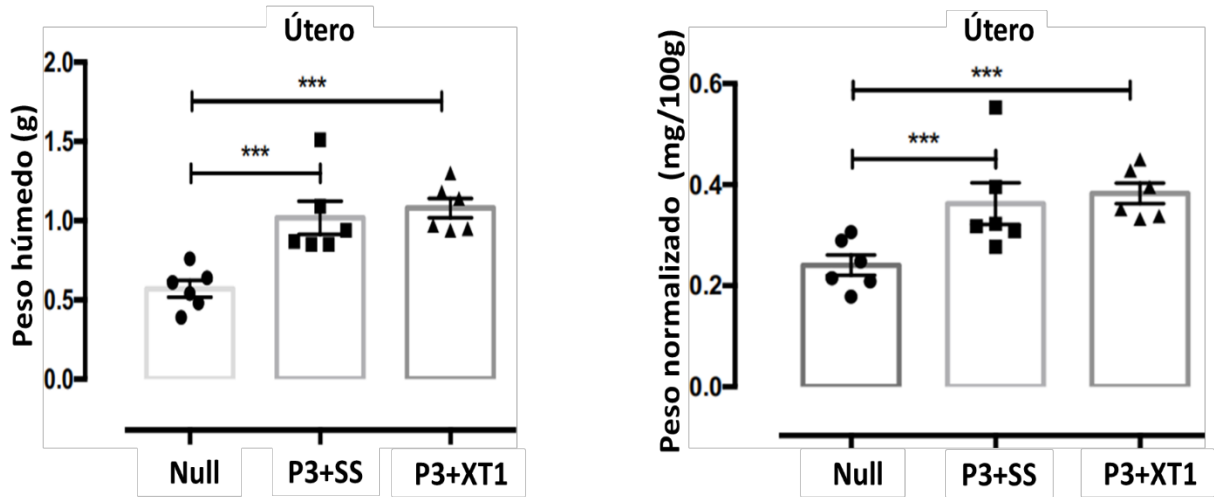


Figura 18. Peso húmedo y peso normalizado del útero entre los grupos de ratas Nulíparas (Null) y de ratas primíparas sacrificadas el día 3 posparto administradas con solución salina (P3+SS) y XT1 (P3+XT1). Los datos muestran la media ± E.E. Los datos fueron analizados mediante una ANOVA (una vía) para identificar las diferencias entre grupos se utilizó una prueba post-hoc de Tukey.

La actividad de la β -glucuronidasa del mIc de los grupos Null ($2.840 \pm 0.49.36$ m/M) P3+SS (4.430 ± 0.78 mm) y P3+XT1 (4.090 ± 0.652 mm) ($F=1.64$, $P=0.2271$) y del mPc de los grupos Null (12.30 ± 1.69 m/M) y P3+SS (6.176 ± 1.108 m/M) y P3+XT1 (11.13 ± 2.63 m/M) no se encontraron diferencias significativas. ($F=2.88$, $P=0.0869$)

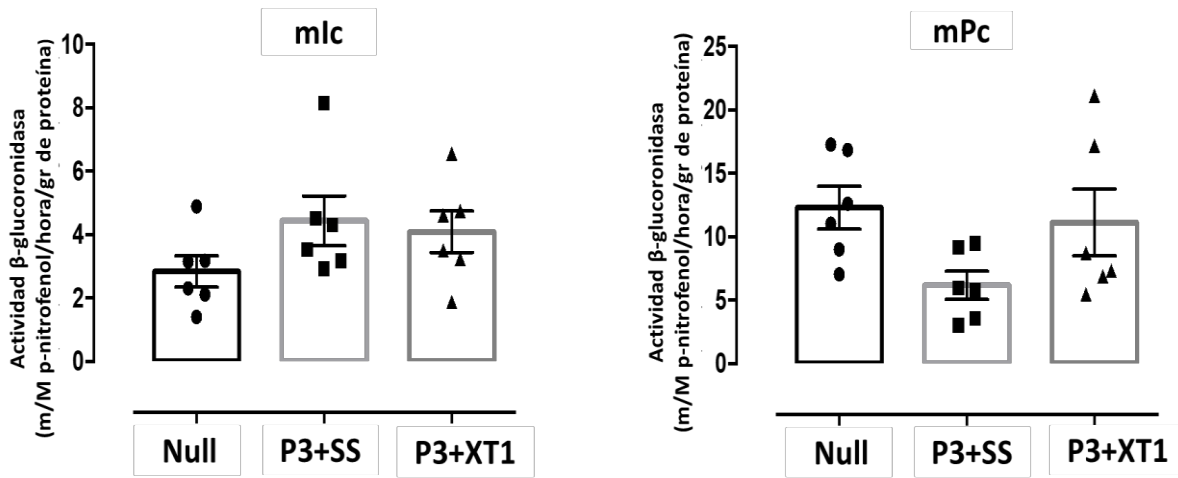


Figura 19. Actividad de la beta-glucuronidasa en el mIc y el mPc entre los grupos de ratas Nulíparas (Null) y de ratas primíparas sacrificadas el día 3 posparto administradas con solución salina (P3+SS) y XT1 (P3+XT1). Los datos muestran la media \pm E.E. Los datos fueron analizados mediante una ANOVA (una vía) para identificar las diferencias entre grupos se utilizó una prueba post-hoc de Tukey Kram.

9. DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran un incremento en el peso corporal de los grupos primíparas (P3+SS y P3+XT1), posiblemente debido a una alta ingesta de alimentos durante la gestación y al número de crías, así como diferencias significativas en el peso húmedo del mIc, de igual manera, existieron diferencias significativas en músculos de las extremidades (sóleo y EDL) de las ratas primíparas tratadas con XT1 y sacrificadas en el día 3 postparto. Además, existieron diferencias en el peso húmedo y el peso normalizado del útero, esto nos podría dar una idea sobre el estado hormonal en el que se encontraban dichas ratas. La baja especificidad y eficacia de los anticuerpos para evaluar la expresión de GLUT4 dificultaron la conclusión de estos experimentos. En conjunto estos hallazgos sugieren que en el postparto temprano no hay signos de daño muscular consolidado que puedan interferirse o mejorarse con el tratamiento de XT1.

En contraste, no se encontraron diferencias significativas en el peso normalizado del mIc y del mPc, de los grupos experimentales (Null, P3+SS y P3+XT1), lo cual nos puede decir que no existe alguna variabilidad en el peso de cada rata experimental (Hurt y col. 2011), lo mismo ocurrió en el peso normalizado de los músculos de las extremidades (Sóleo y EDL) donde no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

De igual manera, no existieron diferencias significativas en el ancho y largo de los MPP esto nos podría decir que en el postparto temprano a un no se evidencia la consolidación de daño en estos MPP. Se ha informado en experimentos con animales que durante el parto se evidencia una distensión vaginal que simula el coronamiento, exhibiendo una elongación o estiramiento de los sarcómeros y una alteración miofibrilar en los MPP, debido a la lesión mecánica y disfunción muscular durante el parto, mientras que no se informaron cambios en los músculos periféricos o de las extremidades (Catanzarite y col. 2018), nuestros resultados tampoco mostraron diferencias en los músculos de las extremidades.

Los datos con respecto a la actividad de la β -glucoronidasa, un marcador indirecto de daño muscular de manera general (López-García y col. 2014), no evidenciaron diferencias significativas en los MPP de las ratas primíparas sacrificadas en el día 3 día postparto, lo cual nos podría indicar que en el postparto temprano aún no existe una consolidación de daño. Otros indicadores de daño muscular que pudieran condicionar el curso de la lesión sería el empleo de un marcador de estrés oxidativo, indicadores histopatológicos, incluyendo la tasa de macrófagos, o la cuantificación de malondialdehído (Panci y col. 2021), por el contrario, experimentos previos del grupo de trabajo, evidencian que a los 21 días postparto, la actividad de la β -glucoronidasa muestra daño en el mIc, mientras que en el mPc no se observaron diferencias significativas (Rodríguez-Jaimes en proceso).

El control del metabolismo del glucógeno se produce mediante la fosforilación y desfosforilación tanto de la glucógeno fosforilasa como de la glucógeno sintasa catalizada por diversas proteína quinasas y proteína fosfatasa. El efecto de la glucosa es activar el sistema de proteína fosfatasa; esto ocurre por la unión directa de la glucosa a la glucógeno fosforilasa. (Derave y cols 1999; Hers 1990). Respecto a la concentración de glucógeno muscular no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales, de igual manera, los niveles séricos de glucosa no variaron significativamente entre los grupos. Algunos estudios han demostrado que una mayor expresión de GLUT4 se asocia con un mayor contenido de glucógeno en los músculos y un equilibrio de la glucosa sérica (Carrasco-Ruiz y col 2018; Kahn y col. 1998).

Sería relevante evaluar el estado hormonal de las ratas primíparas sacrificadas en el día 3 posparto, debido a que el peso húmedo del útero evidencio diferencias significativas. El útero responde a la influencia hormonal ovárica diferenciándose en un estado de receptividad uterina de aceptación e implantación de blastocistos. Algunos experimentos han evidenciado que en ratas ovariectomizadas existe una disminución de estradiol y un incremento del peso normalizado del útero (Carrasco-Ruiz y col. 2018; Groothuis y col. 2007; Ma y col. 2003). De igual manera, durante el embarazo, existe una distensión uterina progresiva debido al crecimiento fetal, el útero se adapta a esta distensión con un incremento de la hipertrofia celular que contribuye a un aumento del peso uterino. Por ejemplo, antes del embarazo el

útero humano pesa aproximadamente de 40 a 70 gr con un volumen de 10 ml mientras que en el parto el útero pesa alrededor de 1100 a 1200 gr y puede tener un volumen promedio de 5 litros (MacPhee y col. 2017) sin en cambio, el peso normalizado del ovario no se evidenciaron diferencias.

De igual manera, el presente estudio puede aportar conocimiento sobre el curso de daño en el posparto temprano en los MPP y la protección que confiere la aplicación de una dosis de XT1 en el día del parto, sugiriendo como una estrategia clínica de prevención farmacológica en la IUE.

Las limitaciones de nuestro estudio incluyen que las ratas experimentales no se encontraban en ayunas antes de que se extirparan los MPP y los músculos de las extremidades y que no hubo una medición de los niveles séricos de insulina, así como la conclusión de los experimentos para la evaluación de la expresión del transportador de glucosa 4, debido a limitaciones por el COVID-19. Estas circunstancias, ayudarían a comprender el metabolismo de la glucosa, glucógeno y la expresión del transportador de glucosa 4. Sin embargo, nuestros datos apoyan la propuesta que en el postparto temprano en ratas primíparas administradas con XT1 el daño muscular no se consolida de manera temprana en los MPP.

10. CONCLUSIONES

- La masa corporal de ratas nulíparas en el día tercer día postparto es menor que la de ratas primíparas.
- El peso húmedo del mIc incrementó en ratas primíparas en el día 3 postparto, efecto que fue revertido por la administración de XT1. No se observaron diferencias significativas para el mPc.
- La actividad beta-glucuronidasa del mIc y del mPc no cambió significativamente entre los grupos experimentales.
- El análisis de la expresión de GLUT4 requiere de más experimentos para identificar la respuesta en cada músculo.
- La administración de una dosis única de XT1, el día del parto, podría ser efectiva para mitigar el daño en el musculo iliococcígeo en el postparto temprano.

11. PERSPECTIVAS

Sería interesante indagar sobre otros indicadores de daño muscular, como la evaluación del estrés oxidativo y algunos indicadores histopatológicos, incluyendo la tasa de macrófagos, o la cuantificación de malondialdehído, así como indicadores relacionados con alteraciones en el metabolismo de glucosa, cuya modulación en el postparto temprano pudieran condicionar el curso de la lesión y donde el compuesto XT1 podría estar influyendo en el proceso de regeneración en los MPP.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adeva-Andany, M. M., González-Lucán, M., Donapetry-García, C., Fernández-Fernández, C., & Ameneiros-Rodríguez, E. (2016). *Glycogen metabolism in humans. BBA Clinical*, 5, 85–100. doi: 10.1016/j.bbacli.2016.02.001
2. Alperin, M., Kaddis, T., Pichika, R., Esparza, M. C., Lieber, R. L. (2016). Pregnancy-induced adaptations in intramuscular extracellular matrix of rat pelvic floor muscles. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 215(2), 210.e1–210.e7.
3. Amend, B., Vaegler, M., Fuchs, K., Mannheim, J. G., Will, S., Kramer, U., Aicher, W. K. (2015). Regeneration of Degenerated Urinary Sphincter Muscles: Improved Stem Cell-Based Therapies and Novel Imaging Technologies. *Cell Transplantation*, 24(11), 2171–2183.
4. Aoki, Y., Brown, H. W., Brubaker, L., Cornu, J. N., Daly, J. O., & Cartwright, R. (2017). Urinary incontinence in women. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17042. doi:10.1038/nrdp.2017.
5. Asp S., Kristiansen, S., y Richter, E. A. (1995). Eccentric muscle damage transiently decreases rat skeletal muscle GLUT-4 protein. *Journal of Applied Physiology*. 79, 1338–1345.
6. Barros, R.P., Machado, U.F., Warner, M., and Gustafsson, J.A. (2006). Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ER beta and ER alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 1605–1608.
7. Brink EE, Pfaff DW. (1980). Vertebral muscles of the back and tail of the albino rat (*Rattus norvegicus albinus*) *Brain. Behav. Evol*; 17, 1–47.
8. Calvo, A. C., Oliván, S., Manzano, R., Zaragoza, P., Aguilera, J., and Osta, R. (2012). Fragment C of Tetanus Toxin: New Insights into Its Neuronal Signaling Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(6), 6883–6901.
9. Candalija Iserte A. (2015). Interacción de las neurotoxinas clostridiales con los receptores de neurotrofinas: identificación de TrkB como receptor proteico de la toxina tetánica. Tesis doctoral. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona, Instituto de Neurociencias.

10. Carbo R., Guarner, V. (2004). Cambios en el metabolismo cardíaco y su posible aprovechamiento en la terapéutica. *Archivos de cardiología de México*. 74, 1, 68–79.
11. Carrasco-Ruiz, M. de los 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, 161–168.
12. Carrillo K y Sanguinetti A. (2013) Anatomía del piso pélvico. *Revista médica clínica condesa*. 2,185-189.
13. Castrejón V., Carbó R., Martínez M. (2007). Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *Instituto Nacional de Cardiología*. 26(2): 49-57.
14. Catanzarite T., Bremner S., Barlow CL., Bou-Malham L, O'Connor S., Alperin. (2018) Pelvic muscles' mechanical response to strains in the absence and presence of pregnancy-induced adaptations in a rat model. *J Obstet Gynecol*: 512.e1–9.
15. Cortes E, te Fong LF, Hameed M, Harridge S, FRCOG AM, Yang SY, Reid WM, Goldspink G. (2005). Insulin-like growth factor–1 gene splice variants as markers of muscle damage in levator ani muscle after the first vaginal delivery. *Am J Obstet Gynecol*; 193: 64–70.
16. 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>
17. Derave W, Lund S, Holman GD, Wojtaszewski J, Pedersen O, Richter EA (1999). Contraction stimulated muscle glucose transport and GLUT-4 surface content are dependent on glycogen content. *Am J Physiol*. 277, E1103-E1110.
18. Do Carmo, E. M., Miyaoka, T. M., da Silva, N. D., de Camargo, M. R., Rocha, A. P. R., Pelai, E. Souza, W. M. (2011). Histochemical and Morphological Characteristics of the Levator Ani Muscle in Rats. *International Journal of Morphology*, 29(4), 1195–1201.
19. Gómez LM, Castaño BJ y Saldarriaga EC. (2015) Trastornos de la contracción de los músculos del piso pélvico femenino. *Revista Urología Colombiana*. 1, 35-45.

20. Gómez-Zorita, S., & Urdampilleta, A. (2012). El GLUT4: efectos de la actividad física y aspectos nutricionales en los mecanismos de captación de glucosa y sus aplicaciones en la diabetes tipo 2. *Avances En Diabetología*, 28(1), 19–26.
21. Groothuis, P. G., Dassen, H. H. N. M., Romano, A., Punyadeera, C. (2007). Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Human reproduction update*, 13(4), 405-417.
22. Hartmann, D., Sarton, J. (2014) Disfunción crónica del suelo pélvico. *Mejores Prácticas e Investigación Clínica Obstetricia y Ginecología*. ELSEVIER. 28. 7, 977-990.
23. Hou, J. C., and Pessin, J. E. (2007). Ins (endocytosis) and outs (exocytosis) of GLUT4 trafficking. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(4), 466–473.
24. Huang, S., y Czech, M. P. (2007). The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metabolism*, 5(4), 237–252.
25. Hurd, W. J., Morrey, B. F., & Kaufman, K. R. (2011). The effects of anthropometric scaling parameters on normalized muscle strength in uninjured baseball pitchers. *Journal of sport rehabilitation*. 20(3), 311–320. <https://doi.org/10.1123/jsr.20.3.311>
26. Jessen, N., and Goodyear, L. J. (2005). Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 99(1), 330–337.
27. Junqueira Vasconcellos de Oliveira, S. M., De Souza Caroci, A., De Paula Batista Mendes, E., Guimarães de Oliveira, S., y Penha Silva, F. (2018). Disfunções do assoalho pélvico em primíparas após o parto. *Enfermería Global*, 17(3), 26.
28. Kahn, B. B. (1998). *Type 2 Diabetes: When Insulin Secretion Fails to Compensate for Insulin Resistance*. *Cell*, 92(5), 593–596. doi:10.1016/s0092-8674(00)81125-3
29. Kern M, Wells JA, Stephens JM, Elton CW, Friedman JE, Tapscott EB, Pekala PH, Dohm GL. (1990). Insulin responsiveness in skeletal muscle is determined by glucose transporter (Glut4) protein level. *Biochem J*. 270, 397-400.
30. Kuo CH, Hunt DG, Ding Z, Ivy JL (1999) Effect of carbohydrate supplementation on postexercise GLUT-4 protein expression in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 87, 2290-2295.
31. Langer, H. T., Senden, J. M. G., Gijzen, A. P., Kempa, S., van Loon, L. J. C., & Spuler, S. (2018). Muscle Atrophy Due to Nerve Damage Is Accompanied by Elevated Myofibrillar Protein Synthesis Rates. *Frontiers in Physiology*. 9, 1220.

32. Lin, A. S., Carrier, S., Morgan, D. M., & Lue, T. F. (1998). Effect of simulated birth trauma on the urinary continence mechanism in the rat. *Urology*. 52(1), 143–151. doi:10.1016/s0090-4295(98)00136-8.
33. López-García, K., Cuevas, E., Sánchez-García, O., Pacheco, P., Martínez-Gómez, M., & Castelán, F. (2014). Differential damage and repair responses of pubococcygeus and bulbospongiosus muscles in multiparous rabbits. *Neurourology and Urodynamics*, 35(2), 180–185. doi:10.1002/nau.22702
34. 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):180-185.
35. Ma, W. G, Song, H., Das, SK, Paria, B. C., Dey, S. K. (2003). Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), 2963-2968.
36. Machado, O, K, T., Cárdenas, R, A, E., Navarro, L, E. (2019). Transportadores de glucosa: características genéticas, moleculares y fisiopatológicas. *Acta medica del centro*. 13, 4.
37. MacPhee, D. J., Miskiewicz, E. I. (2017). The potential functions of small heat shock proteins in the uterine musculature during pregnancy. *The Role of Heat Shock Proteins in Reproductive System Development and Function*, 95-116
38. 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.
39. Martínez-Gómez M, Mendoza-Martínez G, Corona-Quintanilla DL, Fajardo V, Rodríguez-Antolín J, Castelán F. (2011). Multiparity causes uncoordinated activity of pelvic- and perineal striated muscles and urodynamic changes in rabbits. *Reprod Sci*. 18(12).
40. Mironska, E., Chapple, C., and MacNeil, S. (2019). Recent advances in pelvic floor repair. *F1000Research*. 8, 778.
41. Moreno-Galarza, N., Mendieta L., Palafox-Sánchez, V., Herrando-Grabulosa, M., Gil, C., Limón, D., Aguilera, J. (2018). Peripheral Administration of Tetanus Toxin Hc Fragment Prevents MPP+ Toxicity In Vivo. *Neurotoxicity Research*. 34, 47-61.

42. Olsen, A. L., Ross, M., Stansfield, R. B., & Kreiter, C. (2003). Pelvic floor nerve conduction studies: establishing clinically relevant normative data. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 189(4), 1114–1119.
43. Pacheco, P., Martinez-Gomez, M., Whipple, B., Beyer, C. and Komisaruk, B.R, (1989) Somato-motor components of the pelvic and pudendal nerves of the female rat, *Brain Research*. 490, 85
44. Pan, H. Q., Kerns, J. M., Lin, D. L., Sybert, D., Steward, J., Hoover, C. R. V., Zaszczurynski, P., Butler, R. S., Damaser, M. S. (2009). Dual simulated childbirth injury delays anatomic recovery. *American Journal of Renal Physiology-Physiology*. 296 (2), F277-F283. doi:10.1152/ajprenal.90602.2008.
45. Panci, G., Chazaud, B. (2021). Inflammation during post-injury skeletal muscle regeneration. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. doi: 10.1016/j.semcdb.2021.05.031.
46. Pereira R M., Moura L. P. de, Muñoz, V. R., Silva, A. S. R. da, Gaspar, R. S., Ropelle, E. R., & Pauli, J. R. (2017). Molecular mechanisms of glucose uptake in skeletal muscle at rest and in response to exercise. *Motriz: Revista de Educação Física*, 23.
47. Pellizzari, R., Rossetto, O., Schiavo, G., and Montecucco, C. (1999). Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 354(1381), 259–268.
48. Poortmans A and Wyndaele JJ (1998). M. Levator ani in the rat: Does it really lift the anus? *The Anatomical Record*. 251(1), 20–27. doi:10.1002/(sici)1097-0185(199805)251:1<20::aid-ar5>3.0.co;2-i
49. Popoff M, R., Marvaud J, C., Raffestin S. (2001). Mechanism of action and therapeutic uses of botulinum and tetanus neurotoxins. *Annales Pharmaceutiques Francaises*. 59(3):176-190.
50. Poulain B., (1994) Molecular mechanism of action of tetanus toxin and botulinum neurotoxins. *Pathologie Biologie (Paris)*. 42(2):173-182.
51. Richter EA y Hargreaves M. (2013) Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiological Reviews*. 3:993-1017.

52. Rose, A. J., and Richter, E. A. (2005). Skeletal Muscle Glucose Uptake During Exercise: How is it Regulated? *Physiology*, 20(4), 260–270.
53. Sánchez-García, O., Hernández-Aragón, L. G., López-García, K., Juárez, M., Martínez-Gómez, M., and Castelán, F. (2019). Signs of damage in pelvic floor muscles at the end of pregnancy in rabbits. *International. Urogynecology Journal*.
54. Stöckli, J., Fazakerley, D. J., & James, D. E. (2011). GLUT4 exocytosis. *Journal of Cell Science*, 124(24), 4147–4159. doi:10.1242/jcs.097063.
55. Surana, S., Tosolini, A. P., Meyer, I. F. G., Fellows, A. D., Novoselov, S. S., and Schiavo, G. (2018). The travel diaries of tetanus and botulinum neurotoxins. *Toxicon*, 147, 58–67.
56. Tee, J. C., Bosch, A. N., & Lambert, M. I. (2007). Metabolic Consequences of Exercise-Induced Muscle Damage. *Sports Medicine*, 37(10), 827–836.
57. Toivonen, J. M., Oliván, S., & Osta, R. (2010). Tetanus Toxin C-Fragment: The Courier and the Cure? *Toxins*, 2(11), 2622–2644. doi:10.3390/toxins2112622
58. Turton K., Chaddock J A., Acharya R. K. (2002). Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function, and therapeutic utility. *Trends in biochemical sciences*. (11), 552-558.