



# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

**Posgrado en Ciencias Biológicas**

**ANÁLISIS DEL EFECTO QUE EL XT1 EJERCE EN LA  
HISTOPATOLOGÍA DE MÚSCULOS PÉLVICOS DE LA  
RATA PRIMÍPARA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Presenta:

Angélica Berenice Rugerio Zontecomani

Director

Dr. Francisco Castelán

Co-directora

Dra. Laura Guadalupe Hernández Aragón

Tlaxcala, Tlax.

Agosto, 2022





# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

## Posgrado en Ciencias Biológicas

ANÁLISIS DEL EFECTO QUE EL XT1 EJERCE EN LA  
HISTOPATOLOGÍA DE MÚSCULOS PÉLVICOS DE LA  
RATA PRIMÍPARA

### TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Presenta:

Angélica Berenice Rugerio Zontecomani

Director

Dr. Francisco Castelán

Co-directora

Dra. Laura Guadalupe Hernández Aragón

Comité tutorial

Dra. María de los Ángeles Carrasco Ruiz

Dra. Margarita Martínez Gómez

Tlaxcala, Tlax.

Agosto, 2022



Universidad  
Autónoma de  
Tlaxcala

CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA

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

Tlaxcala, Tlax., a 27 de julio de 2022

**COMITÉ ACADÉMICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Sirva este medio para describir el resultado del análisis de similitud del documento de la tesis titulada **“Análisis del efecto que el XT1 ejerce en la histopatología de músculos pélvicos de la rata primípara”**, realizada por la L.Q.C. **Angélica Berenice Rugerio Zontecomani** 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).

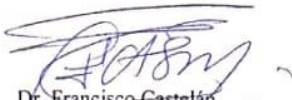
==RESULTADO==

Similitud general: 6%

Considerando que la mayoría de las similitudes encontradas en el documento de tesis corresponden a descripciones 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 Castañón  
Director de tesis



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





**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 **Angélica Berenice Rugerío Zontecomani** 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 **"Análisis del efecto que el XT1 ejerce en la histopatología del músculo pélvico de la rata primípara"**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**  
TLAXCALA, TLAX., AGOSTO 10 DE 2022

  
\_\_\_\_\_  
DRA. MARGARITA MARTÍNEZ GÓMEZ

  
\_\_\_\_\_  
DRA. LAURA GUADALUPE HERNÁNDEZ ARAGÓN

  
\_\_\_\_\_  
DRA. MARÍA DE LOS ANGELES CARRASCO RUIZ

  
\_\_\_\_\_  
DRA. DORA LUZ CORONA QUINTANILLA

  
\_\_\_\_\_  
DR. OCTAVIO SANCHEZ GARCÍA

## Agradecimientos

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Tisular del 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 en colaboración con el Instituto de Fisiología de Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los Dres. Francisco Castelán y Laura Guadalupe Hernández Aragón fungieron como co-directores. Se contó con apoyo técnico del Biol. Jesús Ramsés Chávez Ríos y la Q.F.B Laura García.

Para la realización de esta tesis se contó con financiamiento de un Proyecto de Infraestructura (322333) apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) en el año 2022. El CONACYT otorgó una beca a Angélica Berenice Rugerio Zontecomani (1081555) 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.

## **Resumen**

La incontinencia urinaria se define a como la queja de cualquier pérdida involuntaria de orina. La gestación y el parto son factores de riesgo asociados con la aparición de incontinencia urinaria de esfuerzo. El péptido XT1 funciona como una neurotrofina que desencadena vías de señalización de supervivencia y, posiblemente, la regeneración muscular. Dada la importancia de desarrollar terapias que puedan paliar con mayor eficiencia la incontinencia urinaria de esfuerzo, este proyecto tuvo como propósito evaluar el efecto de XT1 en músculos pélvicos de la rata primípara. Se evaluaron cualitativa y cuantitativamente los signos histopatológicos de daño en los músculos iliococcígeo y pubococcígeo de ratas primíparas administradas con XT1. Para ello se usaron 24 ratas vírgenes, divididas en tres grupos nulíparas, primíparas tratadas con solución salina y primíparas administradas con XT1. Se extrajeron los músculos pubococcígeo e iliococcígeo y se evaluó el área transversal de cada músculo y fibra, nivel de infiltración por grupo y los daños histológicos entre los grupos. Los resultados mostraron una cantidad significativa de infiltración, fibras redondeadas centrales y periféricas en ambos músculos del grupo primíparas tratados con solución salina en comparación con el grupo tratado con XT1, se observó al comparar los tres grupos un reordenamiento significativo de las fibras del músculo iliococcígeo, así como núcleos centrales y menor número de fibras redondeadas en la parte central de dicho músculo.

## **Glosario**

ATF: Área transversal de la fibra

CSA: Área transversal de la fibra muscular

EEU: Esfínter externo de la uretra

EPINCONT: Epidemiología de la incontinencia en el condado de Nord-Trøndelag

H-E: Hematoxilina y eosina

ICS: Sociedad Internacional de Continencia

Ip: Intraperitoneal

IU: Incontinencia urinaria

IUE: Incontinencia urinaria de esfuerzo

IUM: Incontinencia urinaria mixta

IUU: Incontinencia urinaria de urgencia

mIc: Músculo iliococcígeo

mPc: Músculo pubococcígeo

N: Nulíparas

PFM: Músculos del piso pélvico

PMN: Polimorfonucleares

POP: Prolapso de órganos pélvicos

PSS: Primíparas solución salina

PXT1: Primíparas XT1

TeNT: Neurotoxina tetánica

Trk: Receptor tirosina cina



## índice

1. Introducción.....	3
1.1 Incontinencia urinaria .....	3
1.2 Tipos de incontinencia urinaria .....	4
1.3 Principales factores de riesgo asociados con el desarrollo a la incontinencia urinaria de esfuerzo post-parto .....	5
1.4 El suelo pélvico .....	6
2. Antecedentes .....	8
2.1 Daño y regeneración muscular .....	9
2.2 Células satélite.....	9
2.3 El péptido XT1 y su rol como neuroprotector.....	9
2.5 La rata como modelo de estudio .....	11
2.6 Sensibilidad a estrógenos de los músculos pubococcígeo e iliococcígeo .....	12
3. Justificación.....	13
4. Hipótesis .....	15
5. Objetivo general .....	16
5.1 Objetivos específicos .....	16
6. Metodología.....	17
6.1 Animales .....	17
6.2 Grupos experimentales .....	17
6.3 Procesamiento de los músculos iliococcígeo y pubococcígeo .....	17
6.4 Tinción de hematoxilina – eosina .....	18
6.5 Análisis histológico.....	19
6.6 Análisis estadístico.....	20
7. Resultados.....	21
7.1 Análisis cualitativo.....	21
7.2 Análisis cuantitativo.....	25
7.3 Infiltración de células polimorfonucleares .....	29
7.4 Mionúcleos periféricos .....	31
8. Discusión .....	33

9. Conclusiones .....	36
10. Referencias bibliográficas .....	37

## **1. Introducción**

### **1.1 Incontinencia urinaria**

La incontinencia urinaria (IU) se define a como la queja de cualquier pérdida involuntaria de orina (Abrams y col., 2002) y es determinada según su tipo por la frecuencia, factores de riesgo, gravedad, impacto social y su calidad de vida.

La IU no implica riesgo vital, pero deteriora significativamente la calidad de vida de los pacientes, limita su autonomía y reduce su autoestima. La afectación de la calidad de vida relacionada con la salud por la IU puede incluso ser mayor que la provocada por algunas enfermedades crónicas como la diabetes o la hipertensión arterial (Robles- 2006).

En México se considera que la cifra de mujeres con síntomas de incontinencia urinaria puede oscilar entre EL 13.6 y un 48%, a nivel mundial se ha descrito que afecta cerca del 55%, principalmente impacta en mujeres mayores de 40 años (González y col., 2019). Sin embargo, existen pocos trabajos sistemáticos que muestren la prevalencia de IU, y los costos que esta enfermedad implica, pero se estima que sean superiores a los de costos derivados del cáncer de mama (Abufaraj y col., 2021). De lo anterior, se deriva que es necesario conocer los factores intrínsecos (problemas fisiológicos o anatómicos) y extrínsecos (ej. partos y/o envejecimiento) que se encuentran relacionados con el desarrollo de la incontinencia urinaria. (Quintana y col. 2009).

Existen dos teorías para explicar los orígenes de la IU: la extrauretral y la intrauretral. Entre la extrauretral se mencionan diferentes patologías como las fístulas genitourinarias, el uréter ectópico y el divertículo uretral. (Quintana y col. 2009) La intrauretral se ha relacionado con anomalías en el músculo detrusor debidas a la pérdida del soporte anatómico de la uretra y de la unión uretrovesical, también, a la inestabilidad sensorial relacionada con alteraciones de origen neurológico y al aumento de la presión intravesical sobre la presión uretral, debida a la sobre distensión de la vejiga urinaria (Quintana y col., 2009). Por ello, la musculatura pélvica tiene un papel fundamental en el apoyo y sujeción de los órganos pélvicos y en la facilitación de su funcionamiento normal.

Durante el embarazo los músculos del suelo pélvico sufren alteraciones no solo de estiramiento, también de sobrecarga debido al crecimiento progresivo del útero, lo que provoca una disminución en su función de soporte (Cuadros y col., 2017).

## **1.2 Tipos de incontinencia urinaria**

- **Incontinencia Urinaria de Urgencia**

La IU de urgencia (IUU) es la pérdida involuntaria de orina acompañada o inmediatamente precedida de urgencia (Abrams y col., 2002). Por urgencia se entiende cuando el paciente se queja de la aparición súbita de un deseo miccional claro e intenso, difícil de demorar. Esta sensación de urgencia es consecuencia de una contracción involuntaria del detrusor vesical. (Robles-2006). Hannestad en el 2000 demuestra durante un estudio realizado en mujeres que su prevalencia es del 11% en mujeres de 35 a 65 años de edad.

- **Incontinencia Urinaria de Esfuerzo**

La IU de esfuerzo (IUE) es definida por la Sociedad Internacional de Continencia (ICS) como la pérdida involuntaria de orina asociada a un esfuerzo físico que provoca un aumento de la presión abdominal (como por ejemplo toser, reír, correr, andar), si esta presión no se transmite de manera igual a la uretra, no se mantiene la continencia y ocurre la fuga de orina (Mazariegos-2013).

Se ha descrito que la IUE se produce cuando la presión intravesical supera la presión uretral como consecuencia de un fallo en los mecanismos de resistencia uretral. (Robles-2006). Es el tipo de incontinencia más común en las mujeres, según un estudio de Cuadros y col., 2017, en el cual indican que afecta al 54.3% de las mujeres, sugieren que la razón principal es el desarrollo del embarazo y el parto. Es el tipo de incontinencia urinaria es caracterizado por la pérdida de algunas gotas de orina o incluso un chollo pequeño de orina durante el desarrollo de actividades comunes que implican un menor esfuerzo como reír, toser, brincar, etc. (Robles-2006; Cuadros y col., -2017). La IUE es común en ancianas y supone también la forma más común de IU en las mujeres menores de 75 años, afectando a casi un 50% de ellas (Robles-

2006). Robles-2008 menciona dos mecanismos por los que se puede desarrollar la incontinencia urinaria por esfuerzo:

- Debilidad de las estructuras que conforman el suelo de la pelvis y que sostienen la uretra, lo que condiciona una hipermovilidad uretral.
- Disfunción intrínseca del esfínter, producida por la debilidad del músculo uretral, lo que determina una insuficiente coaptación de las paredes de la uretra.

La IUE es el tipo de incontinencia urinaria más frecuente en las mujeres, y su prevalencia se sitúa en el 40-50%, según los estudios. La incontinencia de esfuerzo no se asocia a deseo miccional, ni a una sensación previa al escape; la pérdida de orina puede oscilar entre unas gotas o incluso un chorro, dependiendo del grado de alteración y de la intensidad del esfuerzo.

- Incontinencia urinaria mixta

La incontinencia urinaria mixta (IUM) es la percepción de pérdida involuntaria de orina asociada tanto a urgencia como al esfuerzo. Se estiman en 30-40% las mujeres con IU que tienen síntomas de IUM. Estos datos confirman previos estudios en los que se concluía que la IUE es un problema frecuente en mujeres jóvenes y premenopáusicas, mientras que los síntomas de urgencia y la IUU se hacen más predominantes en el rango de edad postmenopáusica. (Robles 2006)

### **1.3 Principales factores de riesgo asociados con el desarrollo a la incontinencia urinaria de esfuerzo post-parto**

Algunos autores mencionan que la paridad es el principal factor que detona la incontinencia urinaria entre mujeres jóvenes y de mediana edad; además, existe una relación con mayor frecuencia en mujeres que cursaron un parto vaginal a las que tuvieron una cesárea ((Turner y col., 2009), Robles-2006). Asimismo, la edad materna superior a 35 años, un índice de masa corporal (IMC) elevado, la edad gestacional mayor, el estreñimiento y principalmente la multiparidad son factores sobresalientes para desarrollar incontinencia urinaria de esfuerzo. A los factores mencionados se le agrega un mayor riesgo según el tipo de parto, se ha descrito que el parto vaginal tiene 2,28 veces más frecuencia a desarrollar IUE que la cesárea (Turner y

col. 2009). Por consiguiente, los factores sociodemográficos de la población femenina, como la cultura, la multiparidad, el nivel de ingresos y formas de trabajo, así como, vivir en zonas rurales o marginadas, son variantes que influyen en el desarrollo de incontinencia urinaria de esfuerzo en la etapa de postparto (Cuadros y col., 2017 González y col., 2013). Se ha sugerido que el parto vaginal es el factor contribuyente con mayor impacto, posiblemente por las lesiones neurológicas o musculares asociadas al estiramiento del canal de parto durante la fase de alumbramiento, pero el embarazo puede causar cambios mecánicos por el estiramiento de músculos del piso pélvico durante la gestación, y también, por factores hormonales que predisponen a la aparición de IU (31-42% de las embarazadas tienen IUE y en 51% persiste algún grado de IU). Por otro lado, recientemente se ha comprobado que las mujeres con partos por cesárea (prevalencia 15.8%) tienen un riesgo mayor de IU que las mujeres nulíparas (prevalencia 10.1%), pero ambos menores al riesgo que se asocia al parto vaginal (prevalencia 24.2%) (Roble -2006).

Durante un estudio noruego EPINCONT se demostró que, en mujeres menores de 45 años, el 57% tenía incontinencia leve, el 31% incontinencia moderada y el 12% grave, mientras que las mujeres de 34 a 59 años eran del 46%, 33%, y 21%. La fracción de incontinencia severa fue del 17%, 28% y 35% en los grupos de IUE, IUU e IUM. La incontinencia de grado moderado se presentó en casi el 30% de los tres casos y la incontinencia leve con un 53% en el grupo de IUE, 39% en IUU y 31% en IUM (Hannestad y col., 2000).

#### **1.4 El suelo pélvico**

El suelo pélvico es un conjunto de órganos, músculos, huesos, fascias, y ligamentos que se encuentran en la cavidad abdominal en forma de “U” o “hamaca”; su estructura da soporte y mantiene a los órganos pélvicos para su funcionalidad correcta, esta forma descrita es gracias a la fascia y los músculos pélvicos que brindan un soporte y ayudan a comprimir la uretra durante el aumento de presión vesical (Herschorn-2004, Carrillo-Sanguineti-2023). Los músculos estriados del piso pélvico juegan un rol significativo en la fisiología del aparato urogenital inferior (AUI) en donde cumplen funciones reproductivas y excretoras. Las alteraciones morfométricas y funcionales en estos músculos se han relacionado con la aparición de disfunciones ginecológicas y urinarias en mujeres. El debilitamiento de estos músculos,

frecuentemente asociado con la distensión a la que se someten durante el parto, es un factor de riesgo importante para padecer incontinencia urinaria de esfuerzo (IUE) (Carrillo-Sanguinetti-2023).

El diafragma pélvico está constituido por el músculo coccígeo y el músculo elevador del ano compuesto a su vez por tres haces que son el pubococcígeo, iliococcígeo y puborrectal. En modelos animales, las funciones de la musculatura pélvica se relacionan directamente con la contracción de esfínteres para la continencia y micción, así como funciones reproductivas. En la rata hembra se ha descrito que el músculo pubococcígeo interviene durante el apareamiento, participando en el movimiento de la cola para la intromisión del macho y durante la postura de lordosis en la hembra (Martínez-Gómez y col., 1992; Lara-García y col., 2018).

Considerando que este trabajo se abocó en evaluar dos músculos, el pubococcígeo y iliococcígeo, a continuación, se describen sus principales características de en la rata hembra:

#### Músculo pubococcígeo

Este es el músculo más grande del suelo pélvico, la inserción de sus fibras comienza en la cara interna de la sínfisis del hueso pélvico, algunas de sus fibras se unen a la vagina y a la pared uretral por lo que logra rodear la vagina, uretra y el ano, hasta llegar a la tercera y cuarta vértebra a nivel del cóccix (Lara-García y col., 2018). Las fibras de dicho músculo son de tipo 2A y B, su inervación está dada por motoneuronas altamente arborizadas, provenientes de la lámina IX de la médula espinal, específicamente de la L6 hasta la S1 (Lara-García y col., 2018). aunque existen algunas diferencias entre autores sobre la inervación de la musculatura del suelo pélvico, algunos autores mencionan que es inervada por el nervio pélvico, específicamente, la rama somatomotora, al igual que cuenta con husos musculares que tienen la función de ser propioceptores (Lara-García y col., 2018). Sin embargo, otros autores describen la inervación del suelo pélvico como proviene de un solo nervio, del nervio pélvico que surge de la L6 hasta la S1, del cual emergen dos ramas, la visceral y la rama somatomotora también llamada nervio pudendo que inerva al iliococcígeo y pubococcígeo (Cruz y col., 2011).

#### Músculo Iliococcígeo

El músculo iliococcígeo, es el músculo más delgado del elevador del ano, algunas fibras emergen desde la región lateral de la sínfisis del hueso púbico y en su mayoría en el arco tendinoso, culminando en el ligamento anococcígeo de las dos últimas vértebras coccígeas (Carrillo-Sanguineti-2023). La fusión de las fibras terminales del músculo iliococcígeo y pubococcígeo forman una placa elevadora, cuya función es contribuir al sostén de los órganos pélvicos. (Herschorn-2004, Carrillo-Sanguineti-2023)

## **2. Antecedentes**

La IU es un problema de salud que aqueja a las mujeres en diversos aspectos de su vida diaria. Se ha descrito que los factores principales son el parto vaginal, el tiempo de parto y la gesta, entre otros; sin embargo, se sabe que el músculo elevador del ano sufre un gran estiramiento durante el parto vaginal, la tensión que sufren estos músculos es principalmente entre los puntos de uniones y para el pubococcígeo en la parte medial de este durante todo el parto, se menciona que la cabeza fetal provoca el pico de tensión y deformación máxima. (Xuan y col., 2021).

El parto es el factor principal para desarrollar incontinencia urinaria de esfuerzo, así como la multiparidad, entre otros factores que se han descrito en diversos estudios como la edad, peso, el oficio que desempeñan las mujeres y la falta de atención médica. (Xuan y col., 2021).

El parto vaginal no solo daña los músculos del piso pélvico; también se ha descrito un daño en tejido conectivo e inervación durante la segunda etapa del parto, este tiene un evidente daño funcional en la presión de la uretra, aunque se describe que en si el embarazo puede ser una condición natural que afecta la resistencia y soporte de la musculatura pélvica desde los primeros meses de embarazo, aumentando al final de este, principalmente en el deterioro de la contracción de los músculos y aumentando la movilidad de la uretra y vejiga, se menciona que la cesárea reduce el riesgo de incontinencia urinaria. (Bozkurt y col., 2014).

Estudios realizados en conejas se demostró que en el músculo bulboesponjoso existe un aumento en el área transversal de algunas miofibrillas de conejas al final de la gestación, para el pubococcígeo se describió un notable aumento de polimorfonucleares. Cabe mencionar que no se describen si en su mayoría son antiinflamatorios o proinflamatorios que evidencian un daño o regeneración.(Sánchez-García y col., 2019).



## **2.1 Daño y regeneración muscular**

El daño muscular se describe en 5 etapas: la degeneración y necrosis que puede dar la mecánica de expulsión fetal, descontrol en la homeostasis, flujo iónico y disfunción de los organelos de las células musculares y de la estructura del músculo. La inflamación desencadena como primera medida de respuesta al daño muscular, esto provoca una infiltración de granulocitos como neutrófilos, mastocitos, así como también linfocitos activados, mediados por el sistema del complemento. Estas células secretan citocinas proinflamatorias que provocarán la atracción de macrófagos para eliminar la necrosis del sitio de lesión, estos a su vez se diferenciarán en M1 (proinflamatorios) y M2 (antiinflamatorios). (Viña- 2015; Forcina y col., 2020).

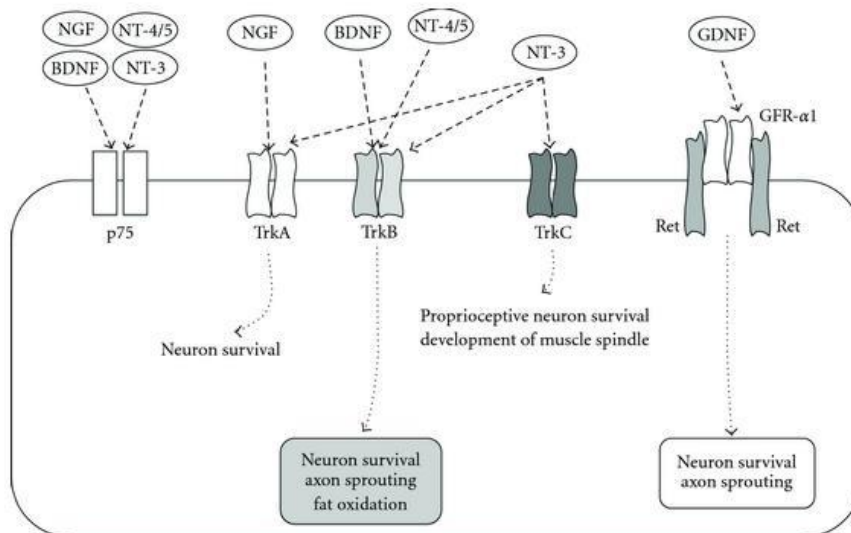
## **2.2 Células satélite**

El tejido muscular al igual que otros tiene células madre que se denominan células satélite localizadas debajo del sarcolema de las miofibrillas. Cuando el músculo sufre una agresión se activan generando mioblastos y a su vez miofibrillas que regeneran el músculo lesionado (De la Fuente y col., 2017). Cuando un músculo sufre una agresión emite señales que atraen a las células madre de sus nichos para su regeneración; estas señales son por medio de citocinas. Dichas células se caracterizan por su división simétrica y asimétrica, lo que les da un papel importante en la regeneración muscular y la dotación de nuevas células madre. la actividad de estas células comienza una semana después del mecanismo de lesión, gracias a que los fibroblastos responden a la actividad de mediadores como el TGF- $\beta$ 1.

## **2.3 Neurotrofinas y músculo esquelético**

Las neurotrofinas son un grupo de proteínas involucradas en la plasticidad, supervivencia, crecimiento y muerte neuronal. Entre ellos se encuentran el factor de crecimiento nervioso, (NGF por sus siglas en inglés), el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofinas 3 (NT-3) y la 4 (NT-4/5) (Reichardt 2006). Las acciones de estas neurotrofinas requieren de la interacción con receptores específicos denominados receptor de neurotrofinas de 75 KDa (p75NTR), receptor de tropomiosina quinasa tipo A (TrkA), TrkB y TrkC (Fig.1). El

primero de ellos pertenece a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, y el resto a la familia de receptores neurotróficos de tirosina quinasa (Reichardt 2006). El p75NTR puede interactuar con los cuatro tipos de neurotrofinas y, aun, con sus precursores proteicos, aunque exhibe una mayor afinidad por el NGF (Reichardt 2006). En contraste, TrkA, TrkB y TrkC muestran una mayor afinidad por BDNF, NT-3 y NT-4/5, respectivamente. Ciertamente, los receptores de neurotrofinas pueden interactuar con las diferentes neurotrofinas en virtud de las diferentes afinidades que exhiben entre sí (Sakuma y Yamaguchi, 2011). Las acciones de neurotrofinas, dependientes del tipo y vías de señalización involucradas, regulan las diferentes acciones descritas en el sistema nervioso.



**Figura 1.** Las acciones de las neurotrofinas están mediadas por la interacción con receptores p75NTR y TrkA-C. Tomado de Sakuma y Yamaguchi, 2011.

El músculo esquelético expresa neurotrofinas y los receptores TrkA-C (Sakuma y Yamaguchi, 2011). Así, la expresión de BDNF y NT-4/5 en miofibras y células satélite de músculos como el soleo y el EDL en roedores (Clow 2010; Funakoshi y col., 1995; Griesbeck y col., 1995; Mousavi y Jasmin 2006). La expresión de p75NTR, TrkA, TrkB y TrkC ha sido descrita para músculos de roedores (Lomen-Hoert and Shooter 1995; Ernfors y col., 1998). Algunos de estos hallazgos sugieren una expresión diferencial de TrkB, que sería mayor en un músculo de contracción rápida como el EDL, que en uno de contracción lenta como el gastrocnemio (Lomen-Hoert and Shooter 1995). Igualmente, importante resultan las

descripciones que ubican a los 4 receptores de neurotrofinas en la unión neuromuscular del levator auris longus del ratón (García y col., 2010). La remodelación de la unión neuromuscular inducida por el ejercicio, en la que aumenta el área de las ramificaciones de la terminal nerviosa, el aumento del área pre- y post-sináptica y la liberación de acetilcolina, involucra a BDNF y NT-4/5 y TrkB (Sakuma y Yamaguchi 2011). Dado que el BDNF liberado en la unión neuromuscular puede transportarse retroaxonalmente hacia la médula espinal, la modulación de la función neuromuscular debe considerar efectos en la motoneurona (Sakuma y Yamaguchi 2011).

## **2.5 La rata como modelo de estudio**

La rata es una especie utilizada frecuentemente para evaluar la organización del tejido conectivo, la inervación y la actividad refleja de músculos pertenecientes al piso pélvico (Jiang y col., 2011). Recientemente se han analizado los efectos sobre la morfometría muscular y se ha encontrado sexualmente dismórficos (Lara y col., 2011). En la rata hembra se conoce que músculos como el pubococcígeo, coccígeo e iliococcígeo participan en el movimiento de la cola y son activados de manera refleja durante la cópula (Martínez-Gómez y col., 1992; Wyndaeley-Poortmans-1998; Cruz-Gómez y col., 2011). Diversos estudios han utilizado el modelo de distensión vaginal en la rata para simular el daño mecánico debido al parto (Jiang y col., 2011). Sin embargo, en estos se obvia la adaptación tisular debido al estado hormonal durante la gestación. 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 los diversos músculos. (Barros y col., 2006).

Rocha y col. (2007), encontraron que en la rata el parto induce una desorganización histológica del esfínter externo de la uretra (EEU) y de la inervación asociada, lo que se ha explicado como una consecuencia del daño muscular ocasionado por la distensión durante gestación y por la mecánica de expulsión fetal. Sin embargo, tales estudios caracterizan cambios morfológicos que no necesariamente reflejan una lesión y/o regeneración. El embarazo y el parto son factores de riesgo importantes para el desarrollo de incontinencia urinaria de esfuerzo y prolapso de órganos pélvicos (POP) en las mujeres. En general, se asume que el trauma del

trabajo de parto es el núcleo de las deficiencias de los músculos del piso pélvico (PFM). Los estudios realizados han contribuido a comprender el efecto del embarazo en el PFM. (Sánchez-García y col., 2019).

## **2.6 Sensibilidad a estrógenos de los músculos pubococcígeo e iliococcígeo**

Nuestro grupo de investigación ha demostrado la expresión de los subtipos alfa y beta del receptor de estrógenos (RE) en los músculos pubococcígeo e iliococcígeo de la rata hembra (Carrasco y col., 2018). Por otra parte, se ha reportado que la expresión de Glut4 y el contenido de glucógeno están asociados con altos niveles de estradiol en el músculo pubococcígeo pero no en el iliococcígeo (Carrasco y col., 2018). En un estudio posterior, realizado en ratas ovariectomizadas y administradas con estradiol y bloqueadores selectivos de REs, se identificó que el RE $\alpha$  está involucrado en los hallazgos anteriores, pero sólo para el mPc (Hernández-Hernández, en proceso 2019).

El GLUT4 es responsable de hasta un 90% de la captura de glucosa en músculos esqueléticos adultos; su translocación a la membrana es regulado por los niveles de insulina y de estradiol y por la contracción muscular (Barros- Gustafsson-2011). Por otro lado, el daño muscular está relacionado con una reducción transitoria de la expresión de GLUT4 en músculos de las extremidades (Asp y col., 1995), resistencia a la insulina, y una disminución del glucógeno muscular (Tee y col., 2007). Este compromiso energético podría reducir la síntesis de proteínas fibrilares requerida para recuperar la atrofia muscular que se presenta después de una lesión nerviosa (Langer y col., 2018). En síntesis, el metabolismo de carbohidratos podría ofrecer información relevante para conocer el daño y/o regeneración de músculos del piso pélvico.

### **3. Justificación**

La incontinencia urinaria es un problema de salud significativo en el mundo con gran impacto social y económico en la sociedad. La incontinencia urinaria de esfuerzo (IUE) es una condición que las mujeres han llegado a catalogar como normal, debido a la falta de información, esta ha llegado a afectar del 25-57% de las mujeres (Mazariegos-2013). Entre los factores de riesgo causales más importantes en mujeres están: el embarazo, la labor de parto y el parto, la cirugía pélvica y el pujo crónico (Mazariegos-2013).

Los músculos de la cavidad pélvica se conocen como músculos pélvicos y constituyen junto con algunos huesos (el íleo, el isquion, el pubis y el sacro) y ligamentos del suelo pélvico. En la especie humana, el complejo músculo elevador del ano, formado por los músculos iliococcígeo, pubococcígeo y puborrectal, contribuye de manera importante en el sostén de las vísceras suprayacentes al suelo pélvico (Ashton-Miller y DeLancey-2007). Los músculos perineales se localizan fuera de la cavidad pélvica y algunos cumplen funciones esfinterianas.

En la mujer, la posición anatómica de ambos grupos de músculos los hace vulnerables a rupturas de miofibras y denervaciones debido a la fuerza de distensión a la que son sometidos durante el parto (Ashton-Miller y DeLancey-2007). La neuroprotección por factores neurotróficos se deriva de su potencial para inducir las vías de supervivencia neuronal a través de sus receptores de tirosina quinasa (Trk). En ratas, se ha observado que el péptido XT1 juega un papel agonista activando la señalización dependiente de receptores Trk, dando como resultado una protección contra la muerte neuronal inducida o apoptosis en músculos de las extremidades. En los animales tratados con XT1 hay un incremento en la fuerza muscular, la fuerza de contracción, la fuerza tetánica y en el área de los miofibras, así como una mejor orientación, ordenamiento y mayor número de núcleos por miofibras (Ortiz-Sagrasta y col., 2017). Por lo tanto, esta molécula ofrece una herramienta prometedora de neuroprotección sobre los músculos del piso pélvico después de someterse a los cambios debidos a la gestación y el parto. Esto es importante ya que durante el proceso de regeneración muscular una correcta alineación de los núcleos en los miofibras puede correlacionarse con un aumento en la funcionalidad de estos y, por lo tanto, en el posterior rendimiento del músculo regenerado (Ortiz-Sagrasta y col.,2017).

Considerando que las variaciones con respecto al tipo de fibras de las extremidades y los músculos pélvico y/o perineales, y afecciones musculares, son una de las condiciones debilitantes más severas, se requiere evaluar muchos compuestos y estrategias farmacológicas para reducir el daño o acelerar la regeneración muscular. Dadas las acciones neuroprotectoras que XT1 ejerce a nivel muscular, este proyecto pretende analizar si es posible que su administración en la rata primípara disminuya indicadores histopatológicos relacionados con daño a los músculos del piso pélvico.

#### **4. Hipótesis**

La administración de XT1 reduce los signos histológicos de daño en los músculos iliococcígeo y pubococcígeo de ratas primíparas.

## **5. Objetivo general**

Evaluar cualitativa y cuantitativamente los signos histopatológicos de daño en los músculos iliococcígeo y pubococcígeo de ratas primíparas administradas con XT1.

### **5.1 Objetivos específicos**

En ratas nulíparas y primíparas de 21 días posparto tratadas con XT1:

- Medir el área transversal de las fibras en los músculos iliococcígeo y pubococcígeo, mediante la tinción de hematoxilina-eosina
- Cuantificar número de mionúcleos en los músculos iliococcígeo y pubococcígeo, mediante la tinción de hematoxilina-eosina.
- Estimar el número de células PMN de los músculos iliococcígeo y pubococcígeo, mediante la tinción de hematoxilina-eosina.



## 6. Metodología

### 6.1 Animales

Se utilizaron 24 ratas hembra vírgenes de tres meses de edad, con un peso de  $230 \pm 20$  g, alojadas en jaulas de acrílico colectivas (2 animales por jaula), con un fotoperiodo de 12/12 h. con ciclo luz-oscuridad invertido y temperatura de  $20 \pm 2$  °C; con alimento y agua *ad libitum*. El Comité de Ética del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta aprobó todos los procedimientos experimentales, siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

### 6.2 Grupos experimentales

Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos, nulíparas (N, n=8), primíparas administradas con solución salina isotónica (PSS, n=8) y primíparas administradas con el péptido XT1 (PXT1, n=8). Las ratas copularon a los tres meses de edad (día 0 de gestación) con machos sexualmente expertos de la colonia. Dentro de las primeras 24 h postparto, las ratas primíparas fueron administradas con SS o XT1 (0.5mg/kg) (i.p.); 21 días después fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (120 mg/kg, i.p.). Las ratas nulíparas se sacrificaron cuando alcanzaban una edad similar a las primíparas (alrededor de 4 meses).

### 6.3 Procesamiento de los músculos iliococcígeo y pubococcígeo

*Disección y extracción de los músculos.* Se realizó una incisión longitudinal (2 cm de longitud) en la piel sobre la línea media a la altura de la cavidad pélvica y perineal. El tejido subcutáneo y adiposo fue removido. Posteriormente se removió la vagina, ovarios y oviducto, se identificaron y se disecaron los músculos iliococcígeo y pubococcígeo.

*Deshidratación e inclusión.* Los músculos extraídos fueron sumergidos en solución de Bouin-Duboscq durante 10 horas a temperatura ambiente con la finalidad de evitar la lisis de las fibras y algún cambio morfológico en las muestras. La inclusión es un proceso por el cual se infiltra la parafina en el tejido para obtener los cortes histológicos; la penetración de la parafina requiere la deshidratación de los tejidos con un solvente orgánico. Para este estudio fue

necesario estandarizar el protocolo. A continuación, se muestran las concentraciones y tiempos para cada solución empleada.

Alcohol etílico 70%	20 min
Alcohol etílico 80%	20 min
Alcohol etílico 96%	15 min
Alcohol etílico 100%	15 min
Alcohol / Xilol (1/1)	10 min
Xilol	10 min
Xilol	10 min
Paraplast Xtra 1	2 h
Paraplast Xtra 2	1 h

Se realizaron cortes de 7  $\mu$ m de espesor con un microtomo Leica (modelo). Se colectaron cortes de la parte media del músculo para realizar las evaluaciones histológicas. Los cortes obtenidos se colocarán en un baño maría y se colectaron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Sigma). Posteriormente, los tejidos fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina para estimar el número de núcleos, medir el área transversal y estimar el número de PMN.

#### **6.4 Tinción de hematoxilina – eosina**

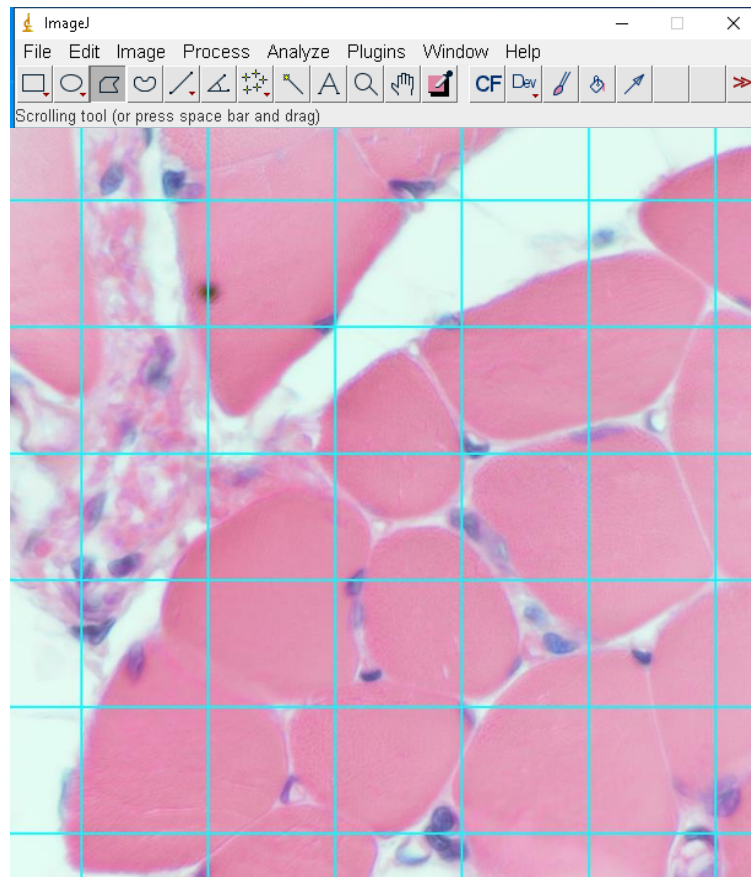
A continuación, se muestra el protocolo de tinción empleado para teñir los cortes histológicos. Al finalizar la tinción, los cortes se cubrieron con medio de montaje y un cubreobjetos.

Xilol 1	5 min
Xilol 2	5 min
Alcohol/Xilol	5 min
Alcohol etílico 100%	5 min
Alcohol etílico 100%	5 min
Alcohol etílico 96%	3 min
Alcohol etílico 80%	3 min
Alcohol etílico 60%	3 min

Agua destilada	3 min
Hematoxilina de Harris	7 min
Agua corriente	40 s
Etanol ácido	40 s
Agua destilada	40 s
Etanol amoniacal	3 min
Agua destilada	40 s
Eosina	3 min
Agua destilada	40 s
Alcohol etílico 96%	40 S
Alcohol etílico 96%	40 S
Alcohol etílico 100%	30 S
Alcohol etílico 100%	30 S
Alcohol/Xilol	10 s
Xilol	10 s
Xilol	10 s

### **6.5 Análisis histológico**

La medición del área transversal de la miofibra, el conteo de minúcleos y el de PMN se realizaron en cortes de los músculos ilio- y pubococcígeo teñidos con hematoxilina-eosina. Se observaron campos a una magnificación de 400X con un microscopio Nikon Eclipse Ni y se realizaron fotografías con una cámara Nikon de 16 megapíxeles. Se contabilizaron 50 fibras por músculo de cada animal (n=8), seleccionadas con la ayuda de una cuadrícula de 6 X 6 cuadrantes, las fibras contabilizadas fueron seleccionadas cada 5 cuadrantes, en las que se tomó la medida del área trasversal, se estimó el número de PMN y minúcleos, el análisis se realizó en el programa ImageJ (López-García y col., 2013).



**Figura 1.** Imagen representativa de la cuadrícula de 6x6 empleada para el conteo de mionucleos, PMN y área transversal mediante el programa ImageJ.

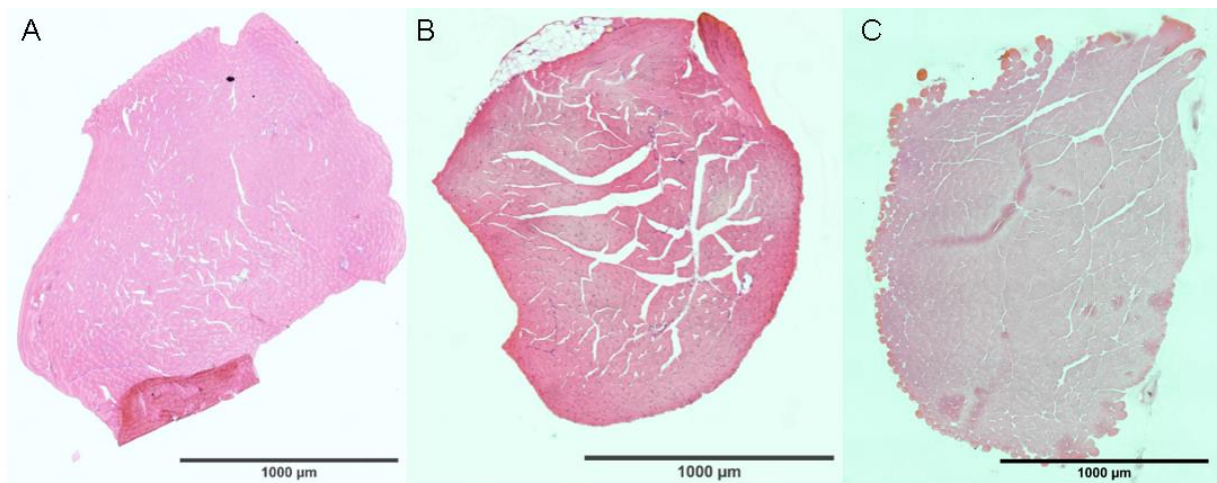
### **6.6 Análisis estadístico**

A menos que se indique lo contrario, los datos son la media  $\pm$  el error estándar de la media (E.E.M.). Los datos se analizaron con un análisis de varianza de una vía para inspeccionar en busca de diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los grupos. En los casos en que se detectaron, se identificaron diferencias entre pares de grupos pruebas de Tukey. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa Prism 9 para Windows (GraphPad).

## 7. Resultados

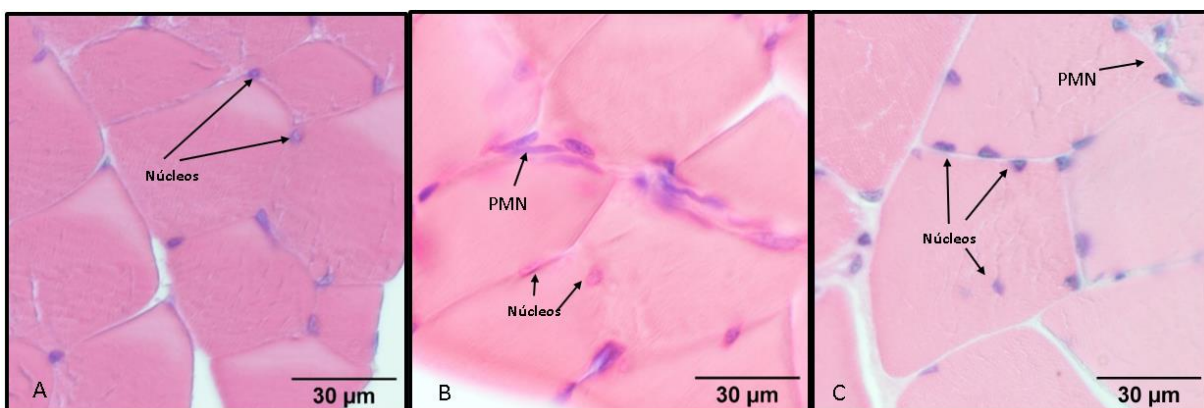
### 7.1 Análisis cualitativo

El análisis cualitativo consistió en la evaluación al microscópica y sistemática de algunos rasgos de daño y regeneración en cortes teñidos con Hematoxilina-Eosina, y sus reconstrucciones digitales (Fig. 2, 4), como la morfología y ruptura de miofibras, desorganización de fascículos, infiltración tejido conectivo y de células polimorfonucleares (PMN), presencia de núcleos centrales, entre otros.



**Figura 2.** Reconstrucción histológica del Músculo pubococcígeo A. grupo (N) nulípara, B grupo primíparas administrada son solución salina (SS), C grupo primíparas administrado con XT1 (XT1). Barra=1000 µm.

En el músculo pubococcígeo de ratas PSS se observaron fibras redondeadas, ruptura de estas, polimorfonucleares, así como algunas células satélites y núcleos centrales que pueden significar una reparación de fibras principalmente en el grupo primíparas con SS (Fig. 2, 3). Algunas de estas características fueron menos frecuentes en las ratas del grupo PXT1 (Tabla 1).



**Figura 3.** Morfología de las fibras del músculo pubococcígeo de ratas N (A), PSS (B) y PXT1 (C). A) Fibras poligonales y agrupadas, con núcleos periféricos. B) Fibras que superan en tamaño al grupo control, presencia de fibras redondeadas y PMN abundantes. C) Fibras poligonales definidas, presencia de un mayor número de PMN y núcleos. Barra=30 µm.

**Tabla 1.** Análisis cualitativo de la morfología del músculo pubococcígeo.

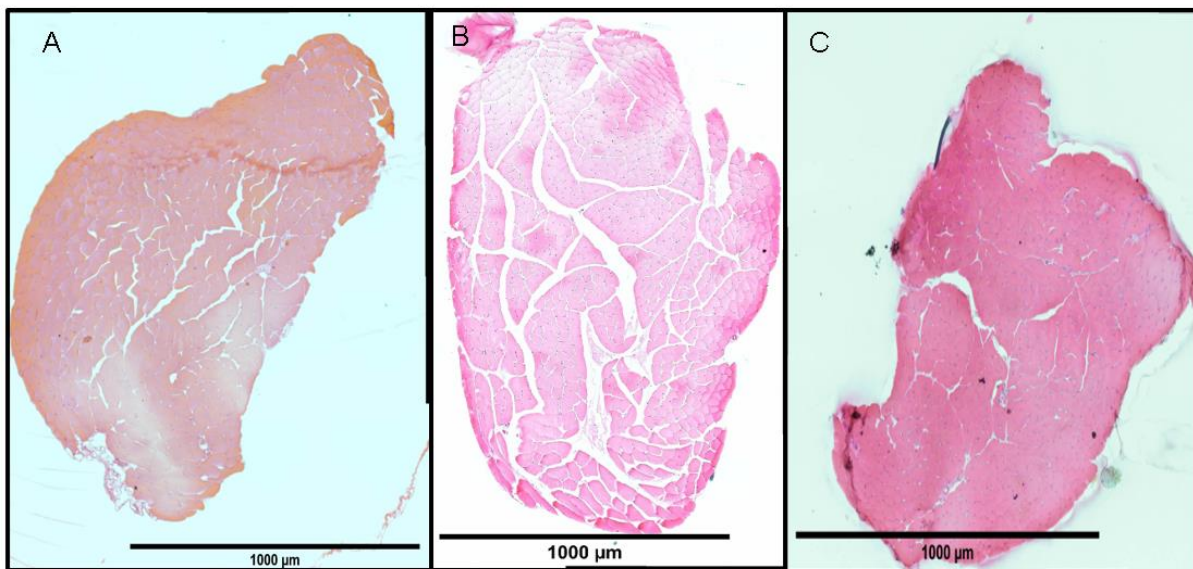
	<b>Nulíparas</b>	<b>PSS</b>	<b>PXT1</b>
Infiltración de PMN en tejido conectivo	<i>Escaso</i>	<i>Abundante</i>	<i>Moderado</i>
Desorganización de fascículos	<i>Escaso</i>	<i>Abundante</i>	<i>Escaso</i>
Células redondeadas centrales	<i>Escasas</i>	<i>Abundante</i>	<i>Escaso</i>
Células redondeadas periféricas	<i>Escasas</i>	<i>Abundantes</i>	<i>Moderado</i>
Ruptura de fibras	<i>Ausentes</i>	<i>Moderado</i>	<i>Escaso</i>
Núcleos	<i>Moderados</i>	<i>Moderados</i>	<i>Moderado</i>
PMN	<i>Escasos</i>	<i>Abundantes</i>	<i>Moderados</i>

Se indica la valoración cualitativa realizada en imágenes reconstruidas mediante fotografías del músculo pubococcígeo obtenidas a 400X. Las observaciones se realizaron en 20 campos por corte y 8 individuos

experimentales para cada grupo. *N*, nulíparas; *PSS*, primíparas tratadas con solución salina; *PXT1*, primíparas tratadas con el péptido XT1.

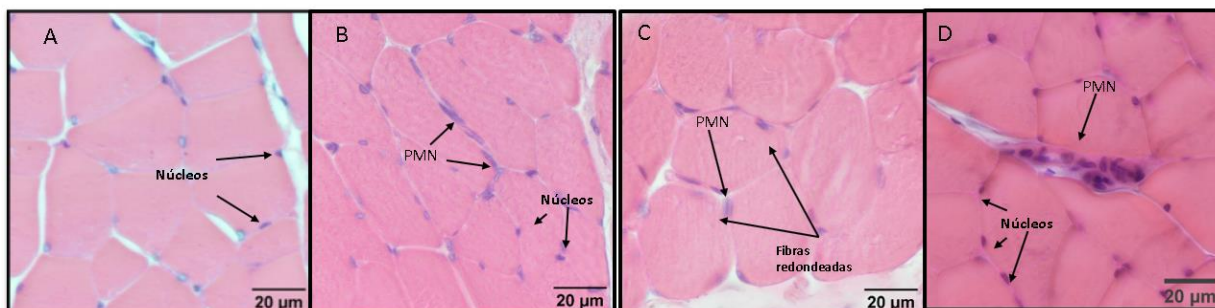
Los resultados evaluados en el músculo pubococcígeo indican un aumento de PMN, fibras rotas y redondeadas como signo de daño principalmente en grupo de ratas primíparas administradas con SS, respecto del grupo N y primíparas tratadas con XT1.

El músculo iliococcígeo de ratas PSS mostró un aumento de fibras redondeadas tanto en la periferia como en el área central del corte histológico, así como una mayor infiltración de células PMN en comparación con el grupo XT1; en este último grupo se observaron células redondeadas solo en la periferia del corte (Figura 4).



**Figura 4.** Reconstrucción histológica del músculo iliococcígeo. A grupo (N) nulípara, B grupo primíparas administrada con solución salina (SS), C grupo primíparas administrado con XT1. Barra=1000 µm.

La infiltración de células polimorfonucleares en el músculo iliococcígeo del grupo PXT1 es menor que en el grupo de primíparas a las que no se les administró SS. Además, se observaron proporciones de mionúcleos y aparentes células satélite (similares al grupo N). (Figura 5).



**Figura 5.** Morfología de las fibras del músculo iliococcígeo de ratas N (A), PSS (B, C) y PXT1 (D). A) Fibras poligonales y agrupadas, con núcleos periféricos. B, C) Fibras que superan en tamaño al grupo control, presencia de fibras redondeadas y PMN abundantes. C) Fibras poligonales definidas, presencia de un mayor número de núcleos, PMN abundantes. Barra=20 µm.

Según los resultados previos, se realizó un análisis cualitativo de las características histológicas mencionadas. Dentro de ellas, se evaluó la infiltración de PMN, desorganización de fascículos, la presencia de células redondas en la zona central del corte histológico, la ruptura de fibras, la presencia de núcleos y de PMN. Estas características se clasificaron como escasas, moderadas o abundantes. La Tabla 2 muestra los resultados encontrados.

**Tabla 1.** Análisis cualitativo de la morfología del músculo iliococcígeo.

	<b>Nulíparas</b>	<b>PSS</b>	<b>PXT1</b>
Infiltración	<i>Escaso</i>	<i>Abundante</i>	<i>Moderado</i>
Desorganización de fascículos	<i>Escaso</i>	<i>Abundante</i>	<i>Escaso</i>
Células redondeadas centrales	<i>Escasas</i>	<i>Abundante</i>	<i>Escaso</i>



	<b>Nulíparas</b>	<b>PSS</b>	<b>PXT1</b>
Células redondeadas periféricas	<i>Escasas</i>	<i>Abundantes</i>	<i>Moderado</i>
Ruptura de fibras	<i>Ausentes</i>	<i>Moderado</i>	<i>Escaso</i>
Núcleos	<i>Moderados</i>	<i>Abundantes</i>	<i>Abundantes</i>
PMN	<i>Escasos</i>	<i>Abundantes</i>	<i>Moderados</i>

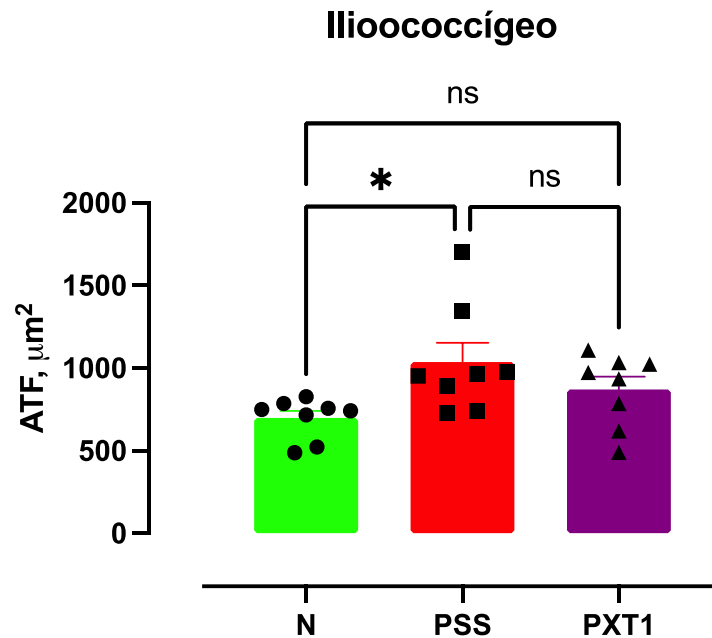
**Tabla 2.** Análisis cualitativo de la morfología del músculo iliococcígeo de los grupos N, PSS y PXT1. Estos datos provienen del análisis en imágenes reconstruidas mediante fotografías del músculo pubococcígeo con 400 aumentos. Las observaciones se realizaron en 20 campos por corte (n=50 fibras) y 8 individuos experimentales para cada grupo.

El análisis cualitativo de las características morfológicas del músculo iliococcígeo muestran un aumento de PMN, fibras rotas y redondeadas como signo de daño principalmente en las fibras de ratas PSS.

## **7.2 Análisis cuantitativo**

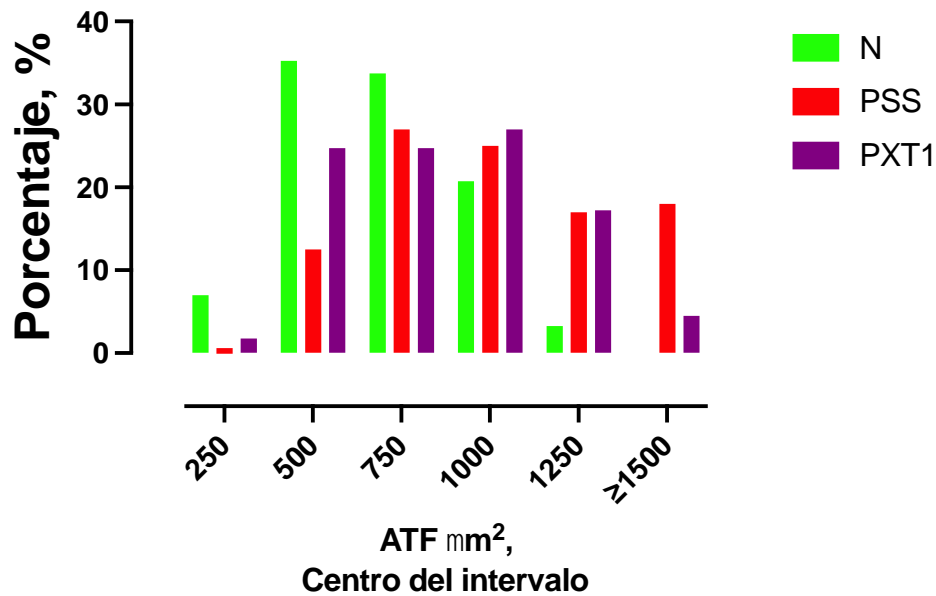
El análisis cuantitativo consistió en la medición del área transversal de la fibra, la estimación de la infiltración de células PMN y el conteo de mionúcleos periféricos y centrales. Para ello se utilizaron cortes teñidos con hematoxilina-eosina.

El área transversal de la fibra del músculo iliococcígeo difirió significativamente entre los grupos experimentales ( $F_{(2,21)}=4$ ,  $p=0.0326$ ). La comparación entre pares de grupos indicó un incremento significativo en el grupo PSS en comparación con el grupo de nulíparas ( $1038 \pm 116$  vs.  $698 \pm 44 \mu\text{m}^2$ ;  $p=0.0252$ ; Fig.6): no hubo diferencias significativas para las comparaciones N ( $698 \pm 44 \mu\text{m}^2$ ) vs. PXT1 ( $872 \pm 77 \mu\text{m}^2$ ;  $p=0.3$ ) y PSS vs. PXT1 ( $p=0.4$ ).



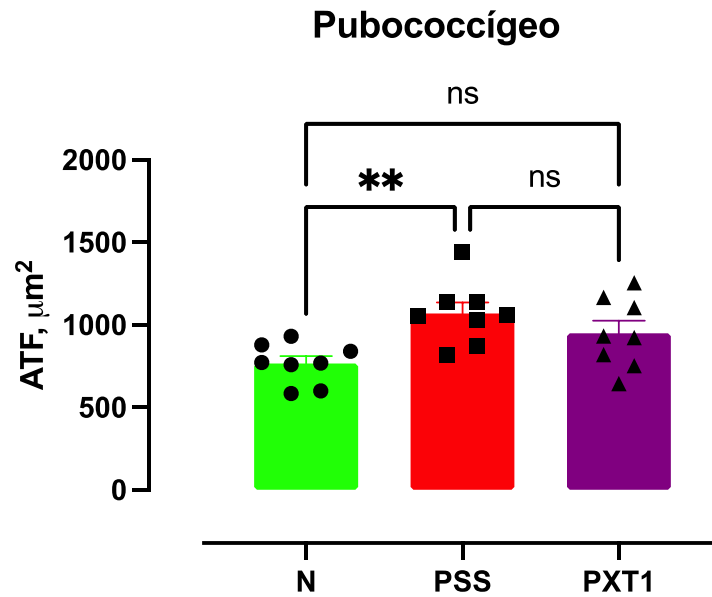
**Figura 6.** Área transversal de las fibras del músculo iliococcígeo. La gráfica representa la media  $\pm$  E.E.M. ( $n = 8$ ). Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre grupos se identificaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post hoc* de Tukey. \*,  $p < 0.05$ ; ns, no significativo. ATF, área transversal de la fibra.

El histograma de frecuencias del área transversal de la fibra mostró que alrededor del 75% de las fibras del iliococcígeo de ratas nulíparas miden menos de  $1000 \mu\text{m}^2$  (Fig.7). En contraste, los histogramas correspondientes a las ratas de los grupos PSS y PXT1 se observaron desplazados hacia intervalos mayores que  $1250 \mu\text{m}^2$ . Ciertamente, el incremento en el porcentaje de fibras con ATF mayor que  $1500 \mu\text{m}^2$  fue menor en las ratas primíparas tratadas con el péptido XT1.



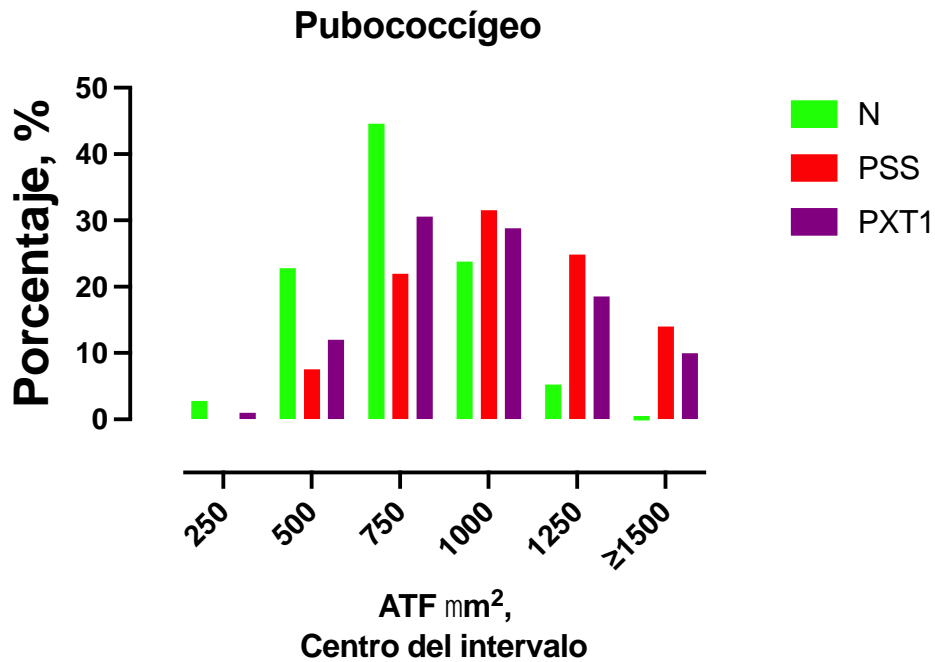
**Figura 7.** Histograma del área transversal de la fibra del músculo iliococcígeo. La gráfica representa la distribución del porcentaje (%) de fibras del músculo iliococcígeo por grupo referente a su área transversal en intervalos de 250  $\mu\text{m}^2$ . Se analizaron 50 fibras por individuo,  $n=8$  por grupo. Total, de fibras analizadas = 400.

El área transversal de las fibras (ATF) del músculo pubococcígeo cambió significativamente entre los grupos N, PSS y PXT1 ( $F_{(2,21)}=5.9$ ;  $p=0.0095$ ; Fig.8). En comparación con el grupo N ( $767 \pm 43 \mu\text{m}^2$ ), se observó un incremento significativo en el ATF del grupo PSS ( $1070 \pm 66 \mu\text{m}^2$ ;  $p=0.0073$ ). No hubo diferencias significativas entre los grupos PXT1 ( $951 \pm 75 \mu\text{m}^2$ ) y N ( $p=0.1$ ) ni entre los PSS y PXT1 ( $p=0.4$ ).



**Figura 8.** Área transversal de las fibras del músculo pubococcígeo. La gráfica representa la media  $\pm$  E.E.M. ( $n = 8$ ). Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre grupos se identificaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post hoc* de Tukey. \*\*,  $p < 0.01$ ; ns, no significativo. ATF, área transversal de la fibra.

El histograma de frecuencias del ATF del músculo pubococcígeo de ratas nulíparas mostró que la mayoría de las fibras tienen un ATF entre 500 y 1000  $\mu\text{m}^2$  (Fig.9). En contraste, las fibras del pubococcígeo de los grupos PSS y PXT1 mostraron un porcentaje mayor de fibras con ATF mayor que 1000  $\mu\text{m}^2$ .

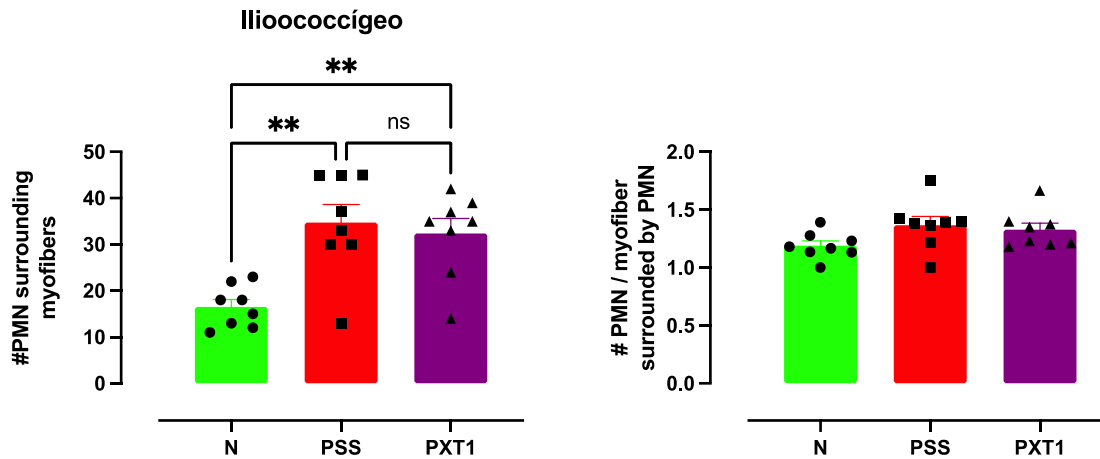


**Figura 9.** Histograma del área transversal de la fibra del músculo pubococcígeo. La gráfica representa la distribución del porcentaje (%) de fibras del músculo iliococcígeo por grupo referente a su área transversal en intervalos de 250  $\mu\text{m}^2$ . Se analizaron 50 fibras por individuo,  $n=8$  por grupo. Total, de fibras analizadas = 400.

### 7.3 Infiltración de células polimorfonucleares

Se contabilizó el número de PMN en las inmediaciones de las 50 miofibras muestreadas en cortes teñidos con hematoxilina-eosina por cada músculo y por rata. Los resultados obtenidos para el músculo iliococcígeo indicaron diferencias significativas entre los grupos N, PSS y PXT1 ( $F_{(2,21)}=10.6$ ,  $p=0.0007$ ; Fig.10<sup>a</sup>). El análisis posterior reveló que la infiltración de PMN en el músculo iliococcígeo fue significativamente mayor en los grupos PSS ( $34.8 \pm 3.9$ ;  $p=0.001$ ) y PXT1 ( $32.4 \pm 3.2$ ;  $p=0.0038$ ) que en el grupo N ( $16.5 \pm 1.6$ ), mientras que no se encontró diferencia significativa entre los grupos PSS y PXT1 ( $p=0.8$ ).

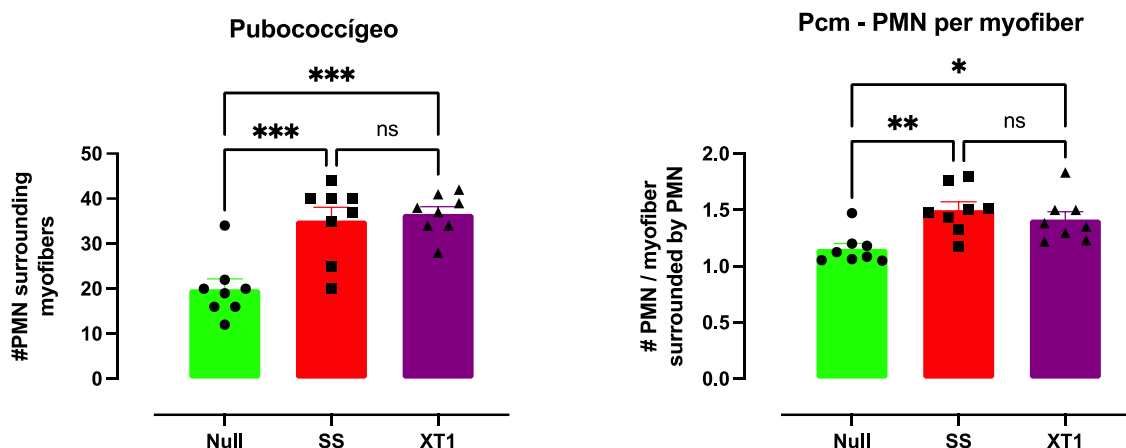
Por otro lado, se evaluó el número de células PMN ponderado por el número de fibras del músculo iliococcígeo con al menos 1 PMN alrededor (Fig.10b). Los resultados del análisis estadístico ( $F_{(2,21)}=2.5$ ,  $p=0.11$ ) indicaron la ausencia de diferencias significativas entre los grupos N ( $1.2 \pm 0.04$ ), PSS ( $1.4 \pm 0.07$ ) y PXT1 ( $1.3 \pm 0.06$ ).



**Figura 10.** Infiltración de células polimorfonucleares (PMN) en el músculo iliococcygeo. Se representa la media, el E.E.M. y los datos individuales de cada animal por grupo (n=8). Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre grupos se identificaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post hoc* de Tukey. \*\*,  $p < 0.01$ ; ns, no significativo.

En el músculo pubococcygeo se encontró que el número de PMN en las inmediaciones de las 50 miofibras muestreadas cambió significativamente entre grupos ( $F_{(2,21)} = 15.6$ ,  $p < 0.0001$ ; Fig.11<sup>a</sup>). A continuación, las pruebas de Tukey revelaron que el número de PMN de los grupos PSS ( $35.1 \pm 2.9$ ) y PXT1 ( $36.6 \pm 1.6$ ) fue significativamente mayor ( $p = 0.0004$ ,  $p = 0.0002$ ) que el del grupo N ( $19.9 \pm 2.3$ ); no hubo diferencia significativa entre los grupos PSS y PXT1 ( $p = 0.9$ ).

También se encontraron diferencias significativas en cuanto al el número de células PMN ponderado por el número de fibras del músculo pubococcygeo con al menos 1 PMN alrededor ( $F_{(2,21)} = 7.5$ ;  $p = 0.0034$ ; Fig.11<sup>b</sup>). El análisis posterior señaló que el número de PMN/fibra incrementó significativamente en los grupos PSS ( $1.5 \pm 0.07$ ;  $p = 0.0034$ ) y PXT1 ( $1.4 \pm 0.07$ ;  $p = 0.0267$ ) con respecto al grupo N ( $1.1 \pm 0.05$ ), pero entre los grupos PSS y PXT1 no hubo diferencia significativa ( $p = 0.6$ ).

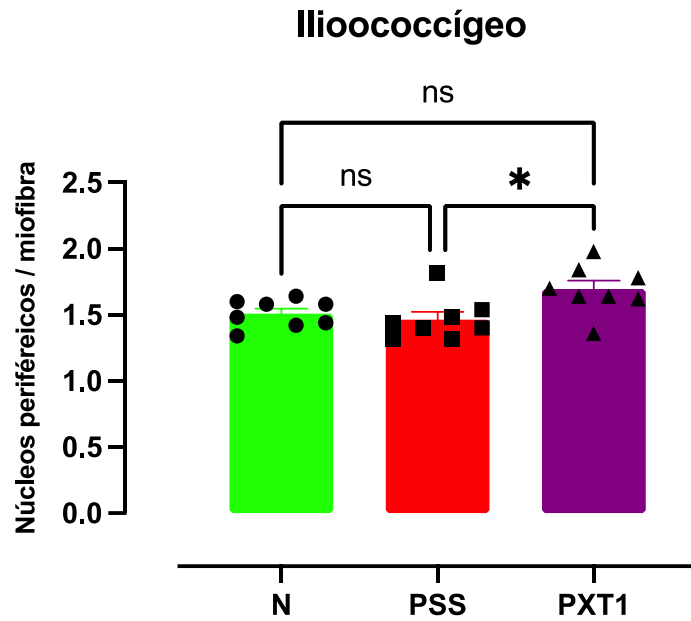


**Figura 11.** Infiltración de células polimorfonucleares (PMN) en el músculo pubococcígeo. Se representa la media, el E.E.M. y los datos individuales de cada animal por grupo (n=8). Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre grupos se identificaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post hoc* de Tukey. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; *ns*, no significativo.

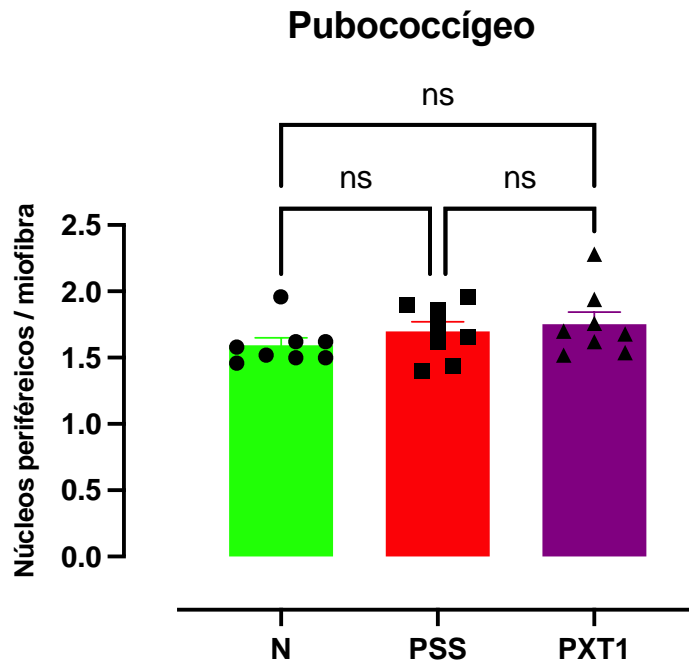
#### 7.4 Mionúcleos periféricos

La cuantificación de mionúcleos periféricos por fibra se realizó en las miofibras muestreadas para medir el ATF y la infiltración de PMN, en cortes teñidos con hematoxilina-eosina. En el músculo iliococcígeo se encontró que los grupos diferían significativamente entre ellos ( $F_{(2,21)} = 5$ ;  $p = 0.0162$ ; Fig.12). Al análisis estadístico posterior señaló que el número de mionúcleos periféricos del grupo XT1 ( $1.7 \pm 0.06$ ) fue significativamente mayor que el del grupo PSS ( $1.5 \pm 0.06$ ;  $p = 0.018$ ); no se detectaron diferencias significativas entre las comparaciones N ( $1.5 \pm 0.04$ ) vs. PXT1 ( $p = 0.0623$ ) y N vs. PSS ( $p = 0.8$ ).

En cuanto al músculo pubococcígeo, no se encontraron variaciones estadísticamente significativas en el número de mionúcleos periféricos por miofibra ( $F_{(2,21)} = 1.2$ ;  $p = 0.3$ ; Fig.13).



**Figura 12.** Número de mionúcleos periféricos por miofibra en el músculo iliococcígeo. Se representa la media, el E.E.M. y los datos individuales de cada animal por grupo (n=8). Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre grupos se identificaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post hoc* de Tukey. \*,  $p < 0.05$ ; ns, no significativo.



**Figura 17.** Número de mionúcleos periféricos por miofibra en el músculo iliococcígeo. Se representa la media, el E.E.M. y los datos individuales de cada animal por grupo (n=8). Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre grupos se identificaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post hoc* de Tukey. ns, no significativo.



## 8. Discusión

El embarazo y el trabajo de parto provocan un desorden en los órganos y músculos del suelo pélvico que implica una desorganización histológica (Rocha y col., 2007; Sánchez-García y col., 2019).

Se estima que la mayoría de las mujeres posteriores al parto, desencadenan incontinencia urinaria de esfuerzo (Turner y col., 2009, Cuadros y col., 2007,), que las limita en varios aspectos a lo largo de su vida adulta. Los hallazgos de esta tesis indican que los músculos iliococcígeo y pubococcígeo de ratas primíparas muestran signos histopatológicos de daño y que la administración del péptido XT1, en el día del parto, fue capaz de reducirlos. Específicamente, el tratamiento con XT1 atenuó los signos histopatológicos relacionados con edema y ruptura de fibras, evitó el incremento del área transversal de la fibra y afectó la presencia de células PMN en el iliococcígeo y el pubococcígeo.

La rata es un organismo utilizado para evaluar la organización funcional del piso pélvico en respuesta a contextos reproductivos o a la simulación del trauma de parto. En el presente estudio evaluamos el efecto de la primiparidad sobre la histología de los músculos iliococcígeo y pubococcígeo de la rata obtenidos en el día 21 posparto. Como parte del análisis cuantitativo se estimó el área transversal de la fibra (ATF), el número de núcleos y células polimorfonucleares de las fibras musculares en cortes de los músculos iliococcígeo y pubococcígeo teñidos con H-E. En comparación con las ratas nulíparas de la misma edad, se observó una desorganización de los fascículos, fibras redondeadas como signo de daño que se puede ocasionar por edema, aumento de infiltración, y fibras rotas. Tales signos histopatológicos se apreciaron moderados en el grupo de ratas tratadas con XT1. La intensidad de tales signos miopáticos fue moderada en el grupo de ratas primíparas que recibieron una inyección del péptido XT1 el día del parto. Estos hallazgos, y otros provenientes del análisis de parámetros bioquímicos (Rodríguez-Jaimes., 2023), confirman que la primiparidad daña músculos del piso pélvico de la rata. Por otro lado, sugiere un efector protector del péptico XT1.

En el ilio- como en el pubococcígeo se encontró que la primiparidad incrementa el ATF. Este efecto es congruente con los reportes para el músculo bulboesponjoso de la coneja al término de la gestación (Sánchez-García y col., 2019) y para el pubococcígeo de la coneja múltipara (López-García et al. 2013). Ciertamente, tales reportes del ATF coinciden con parámetros bioquímicos y/o celulares que validan el daño muscular. De manera interesante, el tratamiento con XT1 evitó parcialmente el incremento en el ATF en el ilio- y el pubococcígeo; la administración de XT1 también incrementó sutilmente el número de mionúcleos periféricos solo en el iliococcígeo. En general, estos hallazgos requieren que se aborde una mejor caracterización del incremento del ATF como signos de daño muscular y, por otro lado, caracterizar el mecanismo mediante el que XT1 interfiere sobre el ATF. Ciertamente, moléculas con actividad tipo neurotrofina incrementan la fuerza muscular, la fuerza de contracción, la fuerza tetánica y en el área de los miotubos, e influyen positivamente en la organización histológica muscular (Ortiz-Sagrística y col., 2017).

Durante un proceso inflamatorio, las células PMN son las primeras en viajar al sitio de la lesión, de lo que depende un adecuado proceso de regeneración muscular (Viña-2015). Los hallazgos de esta tesis indican que el parto incrementa el número de células PMN en los dos músculos pélvicos evaluados, y el tratamiento con el péptido XT1 no evitó esa respuesta. A pesar de que se evidencia el aumento significativo de la media de PMN en las fibras del músculo pubococcígeo en los grupos de ratas primíparas tratadas con SS (Figura 11a), también observamos que un aumento de células PMN en el número de fibras invadidas con PMN. Este hallazgo requiere de otras aproximaciones que permitan estimar su asociación con signos de necrosis focal. De manera relevante, la administración de XT1 no redujo la respuesta medida en el día 21 posparto. Por otro lado, los abordajes experimentales en el futuro deberían evaluar la proporción de macrófagos tipo M1 o M2 para estimar si el XT1 promueve los signos de regeneración.

La desorganización de la musculatura pélvica como consecuencia de la gestación, el proceso y mecánica del parto vaginal, al igual que en este proyecto evidencian marcadores morfofisiológicos que sugieren signos de daño muscular, sin embargo, en este proyecto debemos resaltar que las observaciones morfofisiológicas se realizaron después de una

monodosis de XT1. Los resultados sugieren una eficacia parcial a nivel de la organización histológica de los músculos ilio- y pubococcígeo de la rata primípara, que resultaría atractivo en la terapéutica para combatir el debilitamiento de músculos del piso pélvico femenino, y el desarrollo de trastornos tan debilitantes como la incontinencia urinaria de esfuerzo. Además, estos hallazgos abren la puerta para hacer hipótesis sobre efectos directos de las neurotrofinas en músculos del suelo pélvico. Los resultados encontrados durante este trabajo al evidenciar cambios morfológicos positivos después de una monodosis principalmente para el músculo iliococcígeo nos lleva a realizar nuevas hipótesis para poder evidenciar la razón por la que el efecto es menor en un músculo, lo que resalta que se deben seguir trabajando en proyectos futuros en los que aborden los mecanismos de acción del péptido XT1.

## **9. Conclusiones**

Las afecciones musculares constituyen una de las condiciones debilitantes más severas, se requiere de la evaluación de una amplia variedad de compuestos y estrategias farmacológicas para reducir el daño o acelerar la regeneración muscular. La administración de la unidosis de XT1 en las primeras 24 h postparto disminuye los signos histopatológicos observados en la etapa postparto en el músculo iliococcígeo y pubococcígeo.

En este estudio, se evidenciaron más signos de regeneración en el músculo iliococcígeo postparto con la administración de XT1, como el aumento significativo en el número de minúcleos y se observó una nula desviación a la derecha en el área transversal en comparación a las fibras del grupo de ratas primíparas tratadas con solución salina. Además, se observó el aumento del PMN en los grupos postparto, sin embargo, no se evidencio una diferencia significativa entre grupos post- parto tratados o no con XT1 en ambos músculos.

En contraste, se evidenció que el músculo pubococcígeo existe un mayor número de fibras rodeadas con un menor número de PMN en las tratadas con XT1. En este mismo músculo, se encontró un menor número de fibras invadidas por PMN, pero con un mayor número de PMN por fibra el grupo de primíparas tratadas con SS. Además, para el músculo iliococcígeo no se encontró diferencia significativa respecto al número de PMN entre fibras invadidas entre los grupos experimentales.

## 10. Referencias bibliográficas

1. Abrams, P., Cardozo, L., Fall, M., Griffiths, D., Rosier, P., Ulmsten, U., ... y Wein, A. (2003). La estandarización de la terminología en la función del tracto urinario inferior: informe del subcomité de estandarización de la Sociedad Internacional de Continencia. *Urología*, 61 (1), 37-49.
2. Abufaraj, M., Xu, T., Cao, C., Siyam, A., Isleem, U., Massad, A., ... & Yang, L. (2021). Prevalencia y tendencias de la incontinencia urinaria entre mujeres en los Estados Unidos, 2005-2018. *Revista americana de obstetricia y ginecología*, 225 (2), 166-e1.
3. Ashton-Miller JA, De Lancey JO. (2007) Functional anatomy of the female pelvic floor. *Ann N Y Acad Sci*; 1101:266-96.
4. Asp, S., Kristiansen, S. y Ritcher E. A. (1995) Eccentric muscle damage transiently decreases rat skeletal muscle GLUT-4 protein. *J. appl. Physiol* 79:4, 1338-45.
5. Ayala, A. E. G. (2008). Incontinencia urinaria femenina: diagnóstico, tratamiento y prevención. *Offarm: farmacia y sociedad*, 27(3), 60-71.
6. Barros R. P., U. F. (2006). Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *PNAS* (103), 1605–1608.
7. Barros, R. P., y Gustafsson, J. Å. (2011). Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell metabolism*, 14(3), 289-299.
8. Bozkurt, M., Yumru, AE y Şahin, L. (2014). Disfunción del suelo pélvico y efectos del embarazo y el modo de parto en el suelo pélvico. *Revista taiwanesa de obstetricia y ginecología*, 53 (4), 452-458.
9. Candalija, I.A., & Aguilera, J. 2015. Interacción de las neurotoxinas clostridiales con los receptores de neurotrofinas : Identificación de TrkB como receptor proteico de la toxina tetánica Universitat Autònoma de Barcelona. doi:<http://hdl.handle.net/10803/319462>
10. Carrasco-Ruiz, M.A., 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.

11. Carrillo, G. K., & Sanguineti, M. A. (2013). Anatomía del piso pélvico. *Revista médica clinica los condes*, 24(2), 185-189.
12. Clow C, Jasmin BJ. Brain-derived neurotrophic factor regulates satellite cell differentiation and skeletal muscle regeneration. *Mol Biol Cell*. 2010 Jul 1;21(13):2182-90. doi: 10.1091/mbc. e10-02-0154. Epub 2010 Apr 28. PMID: 20427568; PMCID: PMC2893983.
13. Cuadros, J. M. B., Vargas, I. H., Rodríguez-Blanco, R., & Sánchez-García, J. C. (2017). Incontinencia urinaria de esfuerzo en mujeres durante el posparto. Revisión bibliográfica. *Journal of Negative and No Positive Results*, 2(12), 695-707.
14. De la Fuente, P., de la Fuente, L., & Garrido, F. M. (2017). Papel de las células madre en el tratamiento de la incontinencia urinaria. *Progresos de obstetricia y ginecología: revista oficial de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia*, 60(1), 16-23.
15. Ernfors P, Hallböök F, Ebendal T, Shooter EM, Radeke MJ, Misko TP, Persson H. Developmental and regional expression of beta-nerve growth factor receptor mRNA in the chick and rat. *Neuron*. 1988 Dec. 10: 983-96. doi: 10.1016/0896-6273(88)90155-9. PMID: 2856091.
16. Forcina, L., Cosentino, M., & Musarò, A. (2020). Mecanismos que regulan la regeneración muscular: información sobre las fases interrelacionadas y dependientes del tiempo de la curación de tejidos. *Células*, 9 (5), 1297.
17. Funakoshi H, Belluardo N, Arenas E, Yamamoto Y, Casabona A, Persson H, Ibáñez CF. Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons. *Science*. 1995 Jun 9;268(5216):1495-9. doi: 10.1126/science.7770776. PMID: 7770776.
18. Garcia N, Tomàs M, Santafe MM, Lanuza MA, Besalduch N, Tomàs J. Localization of brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-4, tropomyosin-related kinase b receptor, and p75 NTR receptor by high-resolution immunohistochemistry on the adult mouse neuromuscular junction. *J Peripher Nerv Syst*. 2010 Mar;15(1):40-9. doi: 10.1111/j.1529-8027.2010.00250. x. PMID: 20433604.

19. Gómez, Y. C., Jiang, H. H., Zaszczurynski, P., Juárez, R., Pastelin, C., & Damaser, M. S. (2011). Electromyography of pelvic floor muscles in rats. *Advances in Applied Electromyography*.
20. González Carmona, E. G., Rodríguez Delgado, R., Ávalos Arboláez, J., Fernández López, S., & Bartumeu González, H. I. (2013). Incontinencia urinaria: un problema económico-social. *Acta Med Centro*.
21. González-Maldonado, L. A., Erosa-Villarreal, R. A., Janssen-Aguilar, R., Laviada-Molina, H. A., & Méndez-Domínguez, N. I. (2019). Incontinencia urinaria: factores de riesgo y frecuencia en mujeres mayores de 60 años, en el sureste de México. *Revista mexicana de urología*, 79(3).
22. Griesbeck O, Parsadonian AS, Sendtner M, Thoenen H. Expression of neurotrophins in skeletal muscle: quantitative comparison and significance for motoneuron survival and maintenance of function. *J Neurosci Res*. 1995 Sep 1;42(1):21-33. doi: 10.1002/jnr.490420104. PMID: 8531223.
23. Hannestad, YS, Rortveit, G., Sandvik, H. y Hunskaar, S. (2000). Una encuesta epidemiológica basada en la comunidad de la incontinencia urinaria femenina: El Estudio EPINCONT de Noruega. *Revista de epidemiología clínica*, 53 (11), 1150-1157.
24. Hernández-Hernández GC. Relevancia de la activación de receptores de estrógenos en el metabolismo de carbohidratos de músculos pélvicos de la rata hembra. Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. Dirección. 2019.
25. Herschorn S. Female pelvic floor anatomy: the pelvic floor, supporting structures, and pelvic organs. *Rev Urol*. 2004;6 Suppl 5(Suppl 5): S2-S10. PMID: 16985905; PMCID: PMC1472875.
26. Jiang, H. H. y Damaser, M. S. (2011). Modelos animales de incontinencia urinaria de esfuerzo. *Tracto urinario*, 45-67.
27. Langer, H. T., Senden, J. M. G., Gijssen, 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.
28. Lara-García M, Alvarado M, Cuevas E, Cortés-sol A, Domínguez A, Tovar A, Pacheco P. (2011) The effects of castration and hormone replacement on the cross-sectional area

- of pubococcygeus muscle fibers in the female rat. *Anat Rec (Hoboken)*;294(7):1242-8.
29. Lara-García, O., Lara-García, M., Pérez-Hernández, D., Cuevas, E., Martínez-Gómez, M., & Pacheco, P. (2018). Spinal cord neuronal components involved in the reflex activity of female rat pubococcygeus motoneurons. *Neuroscience Letters* (Vol. 670, pp. 105–109). <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.01.048>
  30. Lomen-Hoerth C, Shooter EM. Widespread neurotrophin receptor expression in the immune system and other nonneuronal rat tissues. *J Neurochem*. 1995 Apr; 64 (4): 1780-9. doi: 10.1046/j.1471-4159.1995.64041780.x. PMID: 7891106.
  31. López-García K, Cuevas E, Corona-Quintanilla DL, Jiménez-Estrada I, Martínez-Gómez M, Castelán F. (2013). Effect of multiparity on morphometry and estrogen receptor expression of pelvic and perineal striated muscles in rabbits: is serum estradiol relevant? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*; 169: 113–120.
  32. Martinez-Gomez M, Chirino R, Beyer C, Komisaruk BR, Pacheco P. (1992) Visceral and postural reflexes evoked by genital stimulation in urethane anesthetized female rats. *Brain Res*. 1992 Mar 20;575(2):279-84.
  33. Martínez-Gómez M, Corona-Quintanilla DL, Cruz-Gómez Y, Zempoalteca R, Rodríguez-Antolín J, Castelán F. (2012) The role of pelvic and perineal muscles in reproductive and excretory functions. En: *Applications of EMG in Clinical and Sports Medicine*, Steele C (ed). Rijeka. In tech. pp. 269-88.
  34. Mazariegos, ST (2013). Diagnóstico y abordaje de la incontinencia urinaria de esfuerzo en la atención primaria. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica* , 70 (606), 307-312.
  35. Mousavi K, Jasmin BJ. BDNF is expressed in skeletal muscle satellite cells and inhibits myogenic differentiation. *J Neurosci*. 2006 May 24;26(21):5739-49. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5398-05.2006. PMID: 16723531; PMCID: PMC6675269.
  36. Ortiz Sagrista J., Bosser Artal R., Moreno Martínez L., Calvo Royo C., Muñoz Gonzalvo MJ., Zaragoza Fernández P. and Osta Pinzolas R. (2017). United States. Patent No. US 2017/0151316 A1. The patent office of United States of America.



37. Poortmans, A. y Wyndaele, J. J. (1998). M. elevador ani en la rata: ¿realmente levanta el ano?. El registro anatómico: Una publicación oficial de la Asociación Americana de Anatomistas, 251(1), 20-27.
38. Quintana, E., Fajardo, V., Rodríguez-Antolín, J., Aguilera, U., & Martínez-Gómez, M. (2009). Fisiopatología de la incontinencia urinaria femenina. Salud en Tabasco, 15(1), 839-844.
39. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2006 Sep 29;361(1473):1545-64. doi: 10.1098/rstb.2006.1894. PMID: 16939974; PMCID: PMC1664664.
40. Robles, J. E. (2006, August). La incontinencia urinaria. In anales del sistema sanitario de navarra (Vol. 29, No. 2, pp. 219-231). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.
41. Rocha, M. A., Sartori, M. G., De Jesus Simões, M., Herrmann, V., Baracat, E. C., Rodrigues de Lima, G. y Girão, M. J. (2007). El impacto del embarazo y el parto en la uretra de ratas hembra. Revista internacional de uroginecología y disfunción del suelo pélvico, 18(6), 645–651. <https://doi.org/10.1007/s00192-006-0221->
42. Sakuma K, Yamaguchi A. The recent understanding of the neurotrophin's role in skeletal muscle adaptation. J Biomed Biotechnol. 2011;201696. doi: 10.1155/2011/201696. Epub 2011 Sep 25. PMID: 21960735; PMCID: PMC3179880.
43. Sánchez-García, O., Hernández-Aragón, LG, López-García, K., Juárez, M., Martínez-Gómez, M., & Castelán, F. (2019). Signos de daño en los músculos del suelo pélvico al final de la gestación en conejas. Revista Internacional de Uroginecología , 30, 977-984.
44. Tee, J. C., Bosch, A. N., Lambert, M. I. (2007). Metabolic Consequences of Exercise-Induced Muscle Damage. Sports Medicine, 37(10), 827–836.
45. Thor KB, de Groat WC. (2010) Neural control of the female urethral and anal rhabdo sphincters and pelvic floor muscles. Am J Physiol Regul Integr CompPhysiol;299(2): R416-38.
46. Toivonen, J.M., Oliván, S. and Osta, R (2010). Tetanus toxin C.fragment: theCourier and the cure? Toxin (Basel) Nov; 2(11): 2622-2644

47. Turner, CE, Young, JM, Solomon, MJ, Ludlow, J. y Benness, C. (2009). Incidencia y etiología de la disfunción del piso pélvico y modo de parto: una descripción general. *Enfermedades del colon y recto*, 52 (6), 1186-1195.
48. Viña, J. (2015). *Inflamacion muscular: etiologia, tratamientos, prevención y poblaciones susceptibles*. Tesis de licenciatura, Universidad de León. [uleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/5378/VI%D1A%20FERN%C1NDEZ\\_JAIME\\_JULIO\\_2015.pdf;jsessionid=4CD81D292A825759264F7255964D18B1?sequence=1](http://uleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/5378/VI%D1A%20FERN%C1NDEZ_JAIME_JULIO_2015.pdf;jsessionid=4CD81D292A825759264F7255964D18B1?sequence=1)
49. Xuan, R., Yang, M., Gao, Y., Ren, S., Li, J., Yang, Z., ... & Gu, Y. (2021). Un análisis de simulación del músculo del suelo pélvico materno. *Revista Internacional de Investigación Ambiental y Salud Pública*, 18 (20), 10821.
50. Rodríguez S. (2023). *Análisis del efecto que la administración del péptido XT1 ejerce sobre indicadores de daño y regeneración en músculos pélvicos de la rata primípara*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala.