



## EL GÉNERO AFECTA LAS PROPIEDADES CONTRÁCTILES DEL MÚSCULO SÓLEO EN DIABETES INDUCIDA EXPERIMENTALMENTE EN RATAS

ADOLFO VIRGEN ORTIZ, ALEJANDRO APOLINAR IRIBE

### RESUMEN

Ratas hembras y machos, de tres meses de edad, fueron separados en dos grupos: no diabéticas (ND, peso corporal,  $274 \pm 9$  g; nivel de glucosa en la sangre,  $4,94 \pm 0,22$  mmol/L;  $n = 16$ ) y diabéticas (D; peso corporal,  $207 \pm 8$  g; nivel de glucosa en sangre,  $28,39 \pm 0,94$  mmol/L;  $n = 16$ ). La diabetes fue inducida por una sola dosis de 60 mg/Kg de estreptozotocina administrada intraperitonealmente. Las ratas ND recibieron el mismo volumen de vehículo. Después de 4 semanas los animales fueron considerados diabéticos si su nivel de glucosa era  $\geq 20$  mmol/L. La masa y la contracción del músculo sóleo fueron mayores en machos ND que en las hembras ND. En las ratas macho D disminuyó su masa muscular en un 34% y la fuerza de contracción disminuyó en un 33%; mientras que en las hembras D disminuyeron 15% y 10% respectivamente.

**Palabras clave:** diferencia de género, músculo esquelético, diabetes, estreptozotocina.

### ABSTRACT

*Three-month-old female and male Sprague-Dawley rats were separated into two groups: Non-Diabetic (ND; Bodyweight,  $274 \pm 9$  g; blood glucose level,  $4.94 \pm 0.22$  mmol/L;  $n = 16$ ) and Diabetic rats (D; Bodyweight,  $207 \pm 8$  g; blood glucose level,  $28.39 \pm 0.94$  mmol/L;  $n = 16$ ). Diabetes was induced by a single dose of 60 mg/kg of streptozotocin administered intraperitoneally. The animals in non-diabetic group received the same volume of vehicle. At 4 weeks after the injection of streptozotocin animals were considered to be diabetic if they had glucose levels  $\geq 20$  mmol/L. Soleus muscle mass and twitch force were higher in non-diabetic male than in non-diabetic female; in male rats, the diabetes decreased the muscle mass in 34% and the twitch force decayed in 33%; while diabetic females decayed 15% and 10% the muscle mass and contraction force respectively.*

**Keywords:** Sex difference, skeletal muscle, diabetes, streptozotocin.

DR. ADOLFO VIRGEN ORTIZ  
Centro Universitario de Investigaciones  
Biomédicas, Universidad de Colima,  
Correo: avirgen@uclm.mx

DR. ALEJANDRO APOLINAR IRIBE  
Departamento de Física, Universidad de Sonora,  
Correo: apolinar@ciencias.uson.mx

\*Autor para correspondencia: Dr. Alejandro Apolinar Iribe  
Correo electrónico: apolinar@ciencias.uson.mx  
Recibido: 27 de Marzo del 2015  
Aceptado: 29 de mayo del 2015  
ISSN: 2007-4530



## INTRODUCCIÓN

La diabetes es un trastorno metabólico que ha crecido hasta convertirse en una pandemia. La prevalencia de la diabetes ha aumentado rápidamente desde 135 millones de casos en 1995 a un estimado de 380 millones de casos en 2025 [1]. Existen dos tipos de diabetes mellitus: Tipo 1 (DMT1) y Tipo 2 (DMT2). La DMT2 es la forma más común de diabetes, con más del 90% de los casos y su prevalencia varía entre diferentes grupos étnicos.

Por otra parte, la diabetes es considerada como una nueva epidemia en la población pediátrica de América y Europa: 3.9% de aumento anual durante los últimos años [2,3]. Es conocido que el hígado y el músculo esquelético son los principales órganos afectados por la DMT2 por sus complicaciones y la resistencia a la insulina, así como la neuropatía, enfermedades macrovasculares, retinopatía y nefropatía en la DMT1 [4]. La diabetes se caracteriza por síntomas clínicos que incluyen un déficit en la capacidad de desarrollar fuerza muscular, disminución tanto de la masa muscular como de la capacidad física, que se manifiestan como fatiga y por lo mismo afectando la calidad de vida. Estas alteraciones reducen progresivamente el rendimiento físico del paciente en sus actividades diarias [5, 6, 7]. En un estudio realizado con adultos mayores con DMT2, se observó que la fuerza muscular absoluta fue menor en los hombres diabéticos que los hombres no diabéticos, mientras que en las mujeres no se presentaron cambios. La calidad muscular (razón entre la fuerza y la masa muscular) fue significativamente menor en los hombres y mujeres con diabetes que aquellos sin diabetes [8]. Por otro lado, la pérdida de la actividad física de un paciente diabético a menudo conduce al aumento de la morbilidad y la mortalidad, así como a enfermedades cardiovasculares y respiratorias [9]. El músculo es el regulador más importante de la glucosa circulante mediado por un mecanismo dependiente de la insulina y, una señalización deficiente de esta hormona tiene un efecto perjudicial sobre la absorción de glucosa [10, 11].

De acuerdo con la clasificación propuesta por la Asociación Americana de la Diabetes, la diabetes puede ser inducida por drogas o productos químicos [12]. De todos los compuestos químicos, la estreptozotocina (STZ) y el aloxano son los más usados para inducir diabetes. El procedimiento de la destrucción selectiva de las células  $\beta$ , productoras de insulina del páncreas, con una sola dosis de STZ, para inducir DMT1 fue realizado por primera vez en 1963 y su mecanismo ha sido analizado en detalle en una revisión posterior [13]. El tipo de diabetes experimental que se puede inducir es dependiente de la dosis y el número de administraciones de STZ que se utilicen [14].

Aunque los efectos de la diabetes sobre el músculo esquelético se han investigado, existe una falta de conocimiento sobre los efectos de género y los cambios en el músculo esquelético en pacientes jóvenes producidos por la diabetes. Por consiguiente, el objetivo del presente estudio es realizar un análisis comparativo

de las propiedades contráctiles y de la masa muscular del músculo sóleo, entre ratas hembras y machos, a las cuales se les indujo experimentalmente diabetes con estreptozotocina.

## MÉTODOS

El cuidado de los animales y los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Colima. Se utilizaron 32 ratas de la cepa Sprague-Dawley (tres meses de edad), hembras (n = 16) y machos (n = 16), divididas en dos grupos experimentales: No diabéticos [ND, peso corporal ( $274 \pm 9$  g); nivel de glucosa en sangre ( $4.94 \pm 0.22$  mmol/L); n = 16] y diabéticas [D; peso corporal ( $207 \pm 8$  g); nivel de glucosa en la sangre ( $28.39 \pm 0.94$  mmol/L); n = 16]. La diabetes fue inducida por administración intraperitoneal de una sola dosis de 60 mg/kg de peso corporal de STZ preparada en un buffer de citrato pH 4.5 [15]. Los animales del grupo no diabético recibieron un volumen del vehículo equivalente al utilizado para inducir la diabetes. Una semana después se determinó la glucosa en sangre en las ratas D para confirmar la hiperglicemia y a las 4 semanas después de la inyección de STZ los animales fueron considerados diabéticos si mantenían niveles de glucosa  $\geq 20$  mmol/L [16]. La glucosa se determinó con un glucómetro de Roche por la técnica de la glucosa oxidasa en muestras de sangre completa obtenidas de la cola de la rata.

## Cirugía y condiciones experimentales

Después de 4 semanas con hiperglicemia se realizaron los estudios de contractilidad en el músculo sóleo de las ratas de todos los grupos experimentales (ND y D de ambos sexos). El procedimiento fue el siguiente: las ratas fueron anestesiadas mediante inyección intraperitoneal con pentobarbital sódico (50 mg / kg). Posteriormente, el músculo sóleo derecho se disecó de los tejidos adyacentes, dejando la inserción ósea y el suministro de sangre intacta y se procedió a cortar el tendón distal del músculo y se ató con un hilo seda a un gancho de acero inoxidable para su posterior montaje. Además, el nervio ciático fue separado usando disectores de cristal para su manipulación, se cortó lo más lejos posible de su entrada en el músculo, y se ató de su parte distal con hilo seda para su montaje. Finalmente, se realizó un orificio transversal en el fémur utilizando un micro-taladro (F.S.T.18000-17; Fine Science Tools, Foster City, CA, USA). Durante la cirugía se utilizó una solución salina para proteger a los músculos: NaCl 125 mM; KCl 5.4 mM; MgCl<sub>2</sub> 1.05 mM; CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM; y glucosa 11 mM, pH = 7.4.

A continuación, cada rata fue colocada en un sistema para registro mecánico que consiste en una placa montada sobre una base inclinada que permitió exponer el músculo perpendicularmente a un transductor de fuerza-desplazamiento (FT10; Hierba Co., Quincy, MA, EE.UU.). La placa consta de dos postes que sostienen la varilla de acero que pasa a través del agujero en el fémur.

El transductor de fuerza-desplazamiento se montó sobre un actuador impulsado por un motor de pasos controlado por una computadora y conectado a un convertidor A/D para permitir la visualización y el almacenamiento de las respuestas de la tensión isométrica. El gancho atado al tendón fue unido al transductor y el nervio ciático se colocó sobre un par de electrodos de estimulación (S88; Hierba Co.).

### Medición de las propiedades mecánicas

Variando la longitud del músculo, se registraron sacudidas musculares únicas utilizando estimulación eléctrica supramaximal (3 voltios) hasta obtener la longitud óptima ( $L_0$ ), definida como aquella donde se registra la amplitud máxima de la sacudida muscular. En  $L_0$ , se registraron sacudidas musculares únicas y tétanos a diferentes frecuencias de estimulación (10-60 Hz) con incrementos de 10 Hz. Entre cada registro se dejaron reposos de 100 s.

Al final de los experimentos, el músculo sóleo derecho de cada rata estudiada fue extirpado y pesado en una balanza analítica (Sartorius, Edgewood, NY, EE.UU), y los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestésico (150 mg/kg, por vía intraperitoneal).

**Parámetros contráctiles.** En los registros mecánicos obtenidos del músculo sóleo se evaluó el tiempo de contracción durante una sacudida muscular simple, definido como el tiempo que transcurre desde que inicia la contracción hasta que se alcanza el pico máximo de fuerza; también se determinó el tiempo medio de relajación, definido como el tiempo que transcurre desde que inicia la relajación hasta que disminuye un 50% la fuerza máxima alcanzada durante la contracción. Los tiempos de contracción y relajación fueron expresados en milisegundos (ms).

Las fuerzas máximas obtenidas a diferentes frecuencias de estimulación (tétanos) fueron expresadas en newtons (N) y como la función contráctil del músculo esquelético es dependiente de la cantidad de masa muscular y a continuación, para la comparación entre los grupos se utilizó el concepto de calidad de músculo, el cual se define como la razón de la fuerza y la masa muscular [8].

### Análisis estadístico

Un análisis comparativo entre pares fue realizado mediante una prueba t-student con un nivel de significancia del 95%. Las tensiones obtenidas a diferentes frecuencias se compararon con un análisis de varianza de un factor y una prueba post hoc de Tukey. Todas las diferencias entre grupos fueron consideradas significativas si  $p \leq 0,05$ . El análisis estadístico se realizó con el software de Minitab Release versión12.

## RESULTADOS

La masa del músculo sóleo fue mayor en machos ND en comparación con las hembras ND. En las ratas macho

la diabetes disminuyó la masa muscular en 34% (ND:  $0.24 \pm 0.02$  g; D:  $0.16 \pm 0.01$  g); mientras que en el caso de las hembras la masa muscular disminuyó en 15% (ND:  $0.14 \pm 0.01$  g, D:  $0.12 \pm 0.01$  g). Se estudiaron los tiempos de contracción y relajación durante la sacudida simple del músculo sóleo. La diabetes no afectó el tiempo de contracción muscular y los tiempos medios de relajación en las hembras. Sin embargo, en los machos la diabetes aumentó significativamente dichos parámetros ( $p < 0.05$ , figura 1). En relación con la fuerza tetánica máxima desarrollada por el músculo sóleo a diferentes frecuencias de estimulación, los machos desarrollaron significativamente más fuerza tetánica que las hembras ( $p < 0.05$ , figura 2) y la diabetes reduce el desarrollo de la fuerza tanto en hembras como machos, en tanto, el efecto de la diabetes sobre el desarrollo de la fuerza tetánica es mayor en machos que en las hembras. La calidad del músculo fue menor en las ratas diabéticas (Figura 3), y el efecto de la diabetes fue significativamente mayor en los machos en comparación con las hembras ( $p < 0,05$ ).

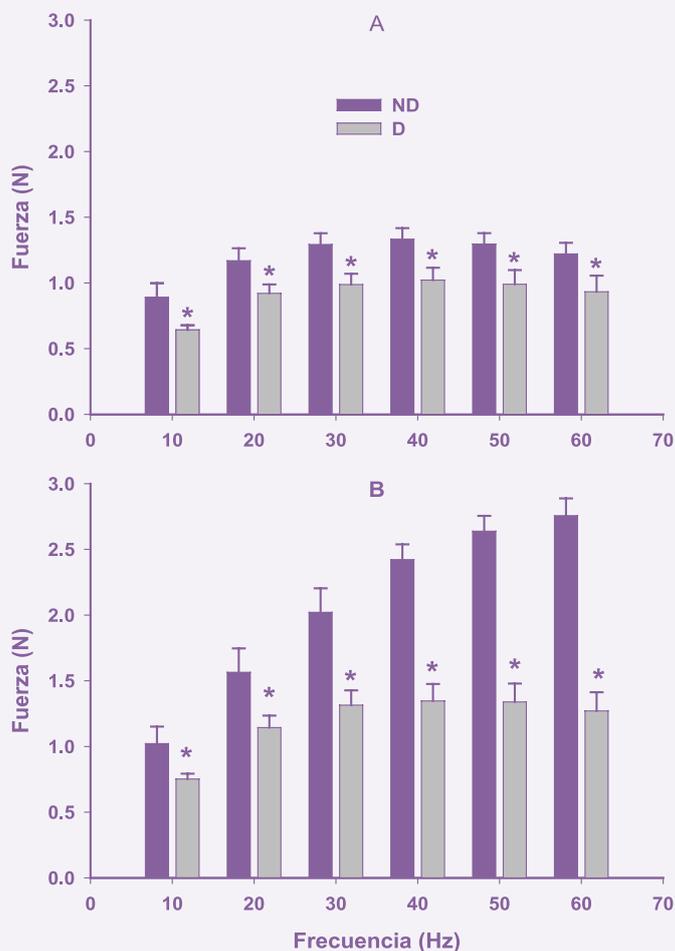


Figura 1. Contracción (A) y tiempo de relajación medio (B) en una sacudida simple del músculo sóleo. ND: ratas no diabéticas y D: ratas diabéticas. Los datos corresponden a medias  $\pm$  error standard. \*  $p < 0.05$ .

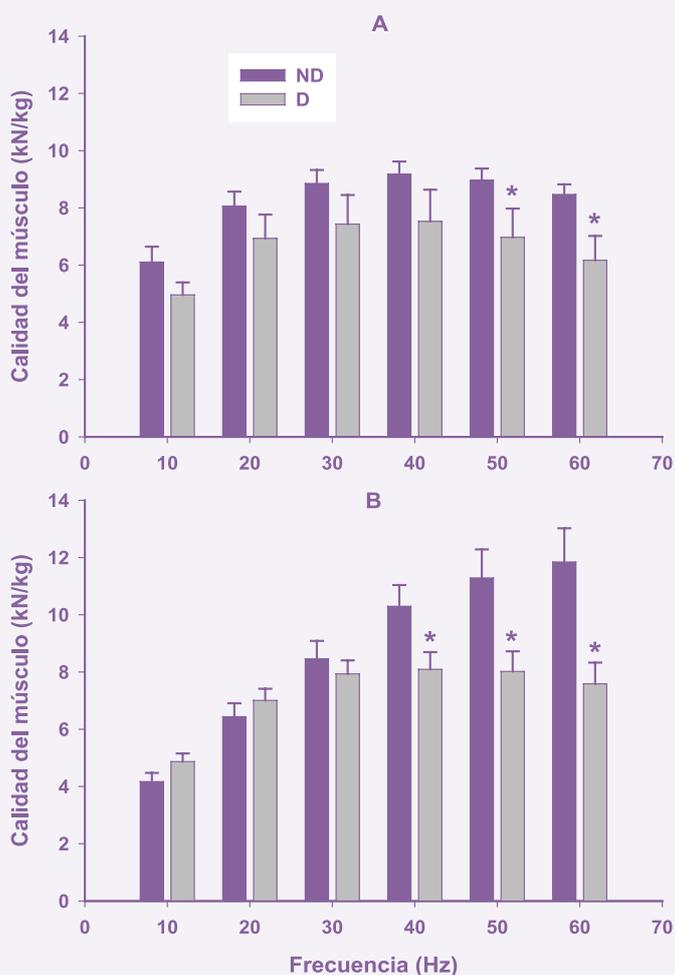


Figura 2. Fuerza tetánica máxima desarrollada por el músculo sóleo en ratas hembras (A) y (B) en ratas machos, a diferentes frecuencias. ND: ratas no diabéticas y D: ratas diabéticas. Los datos corresponden a medias  $\pm$  error standard. \*  $p < 0.05$ .

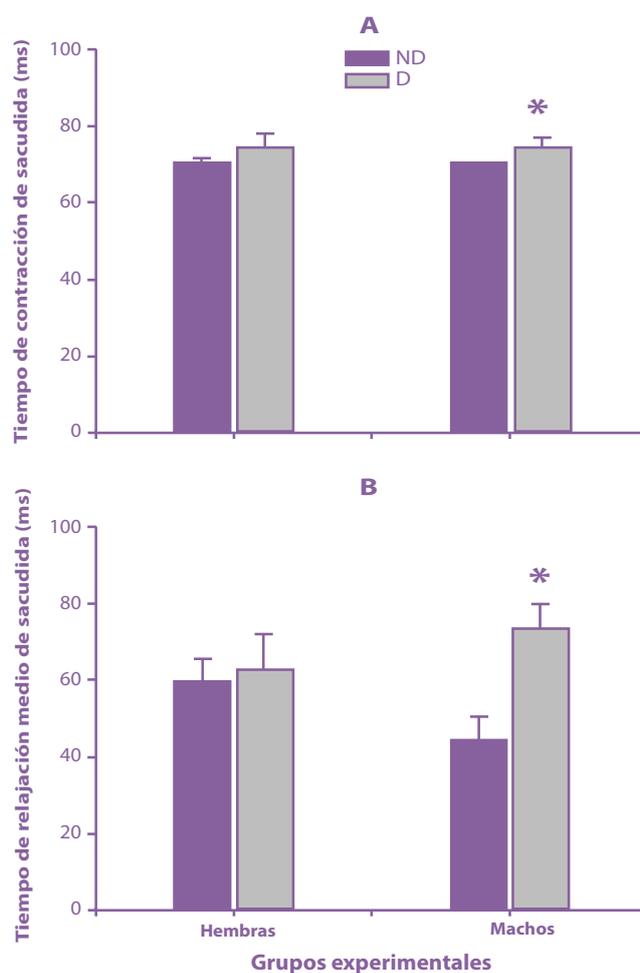


Figura 3. Calidad del músculo sóleo en ratas hembras (A) y en ratas machos (B). ND: ratas no diabéticas y D: ratas diabéticas. Los datos corresponden a medias  $\pm$  error standard. \*  $p < 0.05$ .

## DISCUSIÓN

Se estudió el efecto de la diabetes experimental sobre la masa y las propiedades contráctiles del músculo sóleo de ratas jóvenes desde el punto de vista de la diferencia de sexo. En la literatura existen pocos estudios realizados para entender las diferencias de género en el deterioro del músculo esquelético inducido por diabetes. Un estudio realizado en adultos mayores con diabetes tipo 2 mostró una disminución significativa en la fuerza muscular en los hombres, pero no en las mujeres. Además, la calidad muscular fue significativamente menor en las mujeres y hombres con diabetes que los no diabéticos [8].

En el presente estudio, un modelo de diabetes experimental en ratas jóvenes mostró que la fuerza de contracción absoluta disminuyó significativamente en machos pero en las hembras no cambió significativamente. Además, hemos encontrado que la fuerza tetánica absoluta y la calidad del músculo disminuyeron significativamente





tanto en las hembras como en machos diabéticos, con un mayor efecto en los machos, lo que demuestra que los machos son más susceptibles al daño muscular en diabetes inducida experimentalmente que las hembras.

En los machos diabéticos, los tiempos de relajación-media y de contracción del músculo sóleo aumentaron respecto a los machos no diabéticos, lo que es consistente con otros estudios [17, 18]. Otro resultado importante de nuestro estudio es que el tiempo de relajación-media y de contracción del músculo sóleo no fue alterado significativamente en las hembras diabéticas. Aun cuando nuestros resultados se encontraron en músculo sóleo, el cual es un músculo lento y mayormente oxidativo, tanto en roedores como en humanos; resultados similares se encontraron utilizando el músculo extensor largo de los dedos de ratas hembras no diabéticas y diabéticas [19], el cual es un músculo rápido y no oxidativo. Los cambios mostrados en el tiempo de contracción en los machos diabéticos podrían haber sido evocados por un aumento de la sensibilidad al  $Ca^{2+}$  [20] y una disminución de la liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por un aumento en la expresión de la calsequestrina [21,22], la principal proteína fijadora de calcio del retículo sarcoplásmico, mientras que el aumento en el tiempo de relajación-medio podría estar asociado a problemas con la recaptura de  $Ca^{2+}$  por el retículo sarcoplásmico [23]. En los machos diabéticos, el aumento en los tiempos de relajación y contracción-media, así como la reducción en la producción de la fuerza en el músculo sóleo también puede estar relacionado con un aumento en la proporción de fibras oxidativas lentas a expensas de una reducción en las fibras oxidativas glicolíticas rápidas [17].

Una posible explicación para las diferencias en la masa

muscular y las propiedades contráctiles del músculo sóleo en machos y hembras diabéticas podría ser la reducción en los niveles de la hormona testosterona, cuya disminución ha sido asociada a estos cambios [24]. Similarmente, un estudio encontró que la reducción de los niveles de testosterona induce una disminución de la fuerza específica, el área de corte transversal de las fibras tipo II y la isoforma de miosina de cadena pesada MHC tipo IIB [25].

Por otro lado, el estrógeno puede afectar el metabolismo, tamaño, generación de la fuerza, la función y los mecanismos de daño/reparación muscular [26]. Los estudios sugieren que el efecto del género y el estrógeno en el músculo esquelético dependen del tipo muscular. Recientemente, se encontró que en el músculo sóleo de ratas preñadas (niveles altos de estrógeno) aumenta la resistencia a la fatiga con respecto a las ratas no embarazadas [27], en ambos, no hay alteración de la resistencia a la fatiga en el músculo EDL [28]. Por lo tanto, nuestros resultados podrían explicarse por la capacidad de los estrógenos para reducir el estrés oxidativo y la promoción de la formación de puentes cruzados [29], sin embargo es necesario realizar investigaciones futuras.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran evidencia experimental que el sexo es un factor importante en los efectos que produce la diabetes sobre la masa muscular y las propiedades contráctiles del músculo sóleo de rata joven. Por lo tanto estudios sobre la influencia de sexo son necesarios para mejorar la comprensión de las alteraciones funcionales presentadas en los pacientes diabéticos y en el futuro puedan recibir atención médica más apropiada y tener una mejor calidad de vida.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) S. Golbidi, M. Badran and I. Laher, Antioxidant and anti-inflammatory effects of exercise in diabetic patients, *Exp. Diabetes. Res.* 1-16, doi: 10.1155/2012/941868. 2012.
- 2) F. R. Kaufman, Type 2 diabetes in children and young adults: A "New Epidemic", *Clinical Diabetes*, vol. 20, 217-218, 2012.
- 3) S. Williamson, The best model of care for children and young people with diabetes, *J. R. College of Physicians Edinb.*, vol. 40, 25-32, 2010.
- 4) M. Brownlee. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism, *Diabetes*, vol. 54, 1615-1625, 2005.
- 5) B. Ryerson, E. F. Tierney, T. J. Thompson, M. M. Engelgau, J. Wang, E. W. Gregg and L. S. Giss. Excess physical limitations among adults with diabetes in the U.S. population, 1997-1999, *Diabetes Care*, vol. 26, 206-210, 2003.
- 6) H. Andersen, O. Schmitz and S. Nielsen, Decreased isometric muscle strength after acute hyperglycaemia in type 1 diabetic patients, *Diabet Med*, vol. 22, 1401-1407, 2005.
- 7) H. Andersen, M. D. Gjerstad and J. Jakobsen, Atrophy of foot muscles: a measure of diabetic neuropathy, *Diabetes Care*, vol. 27, 2382-2385, 2004.
- 8) S. W. Park, B. H. Goodpaster, E. S. Strotmeyer, N. de Rekeneire, T. B. Harris, A. V. Schwartz, F. A. Tylavsky and A. B. Newman et al. Decreased muscle strength and quality in older adults with type 2 diabetes: the health, aging, and body composition study. *Diabetes*, vol. 55, 1813-1818, 2006.
- 9) I. Güller and A. P. Russell, MicroRNAs in skeletal muscle: their role and regulation in development, disease and function, *J. Physiol*, vol. 588, 4075-4087, 2010.
- 10) D. H. Wasserman, Four grams of glucose, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 296, E11-E21, 2009.
- 11) K. Ohlendieck, Pathobiochemical changes in diabetic skeletal muscle as revealed by mass-spectrometry-based proteomics, *J. Nutr. Metab.* 1-12, 2012.
- 12) American Diabetes Association, Diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes Care*, vol. 27, s5-s10, supplement 1. 2004.
- 13) T. Szkudelski, The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas, *Physiol. Res.*, vol. 50, 536-546, 2001.
- 14) J. Ventura-Sobrevilla, V. D. Boone-Villa, C. N. Aguilar, R. Ramón-Ramos, E. Vega-Ávila, E. Campos-Sepúlveda and F. Alarcón-Aguilar, Effect of varying dose and administration of streptozotocin on blood sugar in male CD1 Mice. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, vol. 54, 5-9, 2009.
- 15) A. Gajdosik, A. Gajdosíková, M. Stefek, J. Navarová and R. Hozová, Streptozotocin-induced experimental diabetes in male wistar rats, *Gen. Physiol. Biophys.*, vol. 18, 54-62, 2009.
- 16) J. T. Cheng, C. C. Huang, I. M. Liu, T. Thing-Fong and C. J. Chang, Novel mechanism for plasma glucose-lowering action of metformin in streptozotocin-induced diabetic rats, *Diabetes*, vol. 55, 819-825, 2006.
- 17) M. Cotter, N. E. Cameron, D. R. Lean and S. Robertson, Effects of long-term streptozotocin diabetes on the contractile and histochemical properties of rat muscles, *Q. J. Exp. Physiol.*, vol. 74, 65-74, 1989.
- 18) M. Mcguire and M. Macdermott, The influence of streptozotocin diabetes and metformin on erythrocyte volume and on the membrane potential and the contractile characteristics of the extensor digitorum longus and soleus muscles in rats, *Exp. Physiol.*, vol. 84, 1051-1058, 1999.
- 19) K. Asghar, F. Majeed and S. Arshad, Skeletal muscle contractile functions in streptozotocin induced type 1 diabetes mellitus, *Pak. J. Physiol.*, vol. 8, 27-31, 2012.
- 20) G. M. Stephenson, A. O'Callaghan and D. G. Stephenson, Single-fiber study of contractile and biochemical properties of skeletal muscles in streptozotocin-induced diabetic rats, *Diabetes*, vol. 43, 622-628, 1994.
- 21) P. Novák and T. Soukup, Calsequestrin distribution, structure and function, its role in normal and pathological situations and the effect of thyroid hormones, *Physiol. Res.*, vol. 60, 439-452, 2011.
- 22) F. C. Howarth, L. Glover, K. Culligan, M. A. Qureshi and K. Ohlendieck, Calsequestrin expression and calcium binding is increased in streptozotocin-induced diabetic rat skeletal muscle though not in cardiac muscle, *Pflugers Arch-Eur J. Physiol.*, vol. 444, 52-58, 2002.
- 23) M. Cotter M, N. E. Cameron, S. Robertson and I. Ewing, Polyol pathway-related skeletal muscle contractile and morphological abnormalities in diabetic rats, *Exp. Physiol.*, vol. 78, 139-155, 1993.
- 24) P. M. Choi, J. W. Choi, H. N. Chaudhari, K. R. Asser, R. Mukherjee and J. W. Yun, Gender-dimorphic regulation of skeletal muscle proteins in streptozotocin-induced diabetic rats, *Cell Physiol. Biochem.*, vol. 31, 408-420, 2013.
- 25) D. J. Prezant, M. L. Karwa, H. H. Kim, D. Maggiore, V. Chung and D. E. Valentine, Short- and long-term effects of testosterone on diaphragm in castrated and normal male rats, *J. Appl. Physiol.*, vol. 82, 134-143, 1997.
- 26) P. M. Tiidus, Influence of estrogen on muscle plasticity, *Brazilian Journal of Biomotricity*, vol. 5, 143-155, 2011.
- 27) A. Virgen-Ortiz, A. Apolinar-Iribe and J. Muñoz, Differential effects of pregnancy on contractile behavior of rat fast and slow skeletal muscles, *Bratislava Medical Journal*, vol. 115, 389-394, 2014.
- 28) P. M. Tiidus, N. M. Bestic and R. Tupling, Estrogen and gender do not affect fatigue resistance of extensor digitorum longus muscle in rats, *Physiol. Res.*, vol. 48, 209-213, 1999.
- 29) G. Perseghin, G. Lattuada and M. Danna, Insulin resistance, intramyocellular lipid content, and plasma adiponectin in patients with type 1 diabetes, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* vol. 285, 1174-81, 2002.

