



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
ÁREA DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**INDUCCIÓN DIFERENCIAL DE ATROFIA DE MÚSCULO MASETERO
POR INYECCIÓN UNILATERAL DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO A EN
RATONES MACHOS Y HEMBRAS**

Camila Bravo Concha

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. Sonja Buvinic Radic, PhD**

**ASESOR
Noelia Blanco Inostroza, MSc**

Adscrito a Proyecto Fondecyt Regular N° 1201385 y 1241661

Santiago – Chile



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
ÁREA DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**INDUCCIÓN DIFERENCIAL DE ATROFIA DE MÚSCULO MASETERO
POR INYECCIÓN UNILATERAL DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO A EN
RATONES MACHOS Y HEMBRAS**

Camila Bravo Concha

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. Sonja Buvinic Radic, PhD**

**ASESOR
Noelia Blanco Inostroza, MSc**

Adscrito a Proyecto Fondecyt Regular N° 1201385 y 1241661

Santiago – Chile

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi tutora de tesis Dra Sonja Buvinic, que me recibió y enseñó a lo largo de este camino con mucha paciencia y dedicación, con su infinito apoyo y confianza en mi formación como investigadora, permitiendo que entrara en el mundo de la ciencia, un área que antes desconocía. También quiero dar gracias a Noelia Blanco, mi guía en el laboratorio desde que llegué, le agradezco su gran dedicación para enseñarme desde cero el trabajo en el laboratorio y sus implicancias, por acompañarme en cada paso siempre con palabras de ánimo, en ella no solo encontré una tutora sino también una muy querida amiga, que me escuchó y aconsejó en los buenos y malos momentos durante todo este tiempo.

Agradezco profundamente a mis padres, Loreto y Daniel, que son el pilar fundamental en mi vida y que me han acompañado en todos los momentos de mi vida, con un apoyo incondicional durante todo el proceso universitario, me alentaron a perseguir mis sueños y sin ellos no habría llegado donde estoy ahora. A mis hermanas que siempre me suben el ánimo y han ayudado a aliviar los momentos de estrés. A toda mi familia y en especial a mis abuelas Hirma y Carmen que me han entregado un amor incondicional.

Por último quiero agradecer a mis amigos que me han acompañado durante muchas etapas de la vida; amigos de Talca de la infancia que a pesar de la distancia siempre han estado presentes, amigos del colegio que me han dado siempre su apoyo y amigos de la universidad con los que vivimos este proceso lleno de risas, estrés, rabias y alegrías.

Finalmente a todos los que han sido partícipes de este proceso, muchas gracias.

INDICE

1.	MARCO TEÓRICO	1
1.1	Generalidades del músculo esquelético.....	1
1.2	Músculos Masticatorios	4
1.3	Trastornos temporomandibulares	5
1.4	Toxina botulínica	6
1.4.1	Usos clínicos y estéticos de BoNTA en músculo masetero	7
1.5	Atrofia muscular.....	8
1.6	Atrofia de músculo masticatorio inducida por toxina botulínica	9
1.7	Dimorfismo sexual en músculo esquelético	11
1.8	Dimorfismo sexual y atrofia muscular	12
2.	HIPÓTESIS	13
3.	OBJETIVO GENERAL	13
4.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
5.	METODOLOGÍA	14
5.1	Tipo de estudio.....	14
5.2	Diseño experimental y tamaño muestral	14
5.3	Intervención con BoNTA en músculo masetero	16
5.4	Extracción y cuantificación de ARN total, RT – PCR tiempo real (qPCR).....	17
5.5	Criocortes del músculo masetero, inmunofluorescencia indirecta y cuantificación de diámetro mínimo de Feret de fibras musculares.....	19
5.6	Presentación de datos y análisis estadístico.....	20

INDICE

6.1	Comparación de masa corporal, masa de músculo masetero y diámetro de fibras musculares en ratones machos y hembras sin intervención	21
6.2	Efecto de la inyección de BoNTA en la masa corporal y masa de musculo masetero de ratones hembras y machos	23
6.3	Efecto de la parálisis inducida por BoNTA en la expresión relativa de genes de atrofia y regeneración muscular en ratones hembras y machos	26
6.4	Efecto de la parálisis inducida por BoNTA en el diámetro de fibras musculares en ratones hembras y machos	28
6.5	Efecto de la parálisis inducida por BoNTA en el diámetro de fibras de músculo contralateral inyectado con solución salina en ratones hembras y machos	33
7.	DISCUSIÓN	35
7.1	Caracterización por sexo de masa corporal y maseterina en ratones BALB/c hembras y machos sin intervenir.....	35
7.2	Efecto de inyección unilateral de BoNTA en masa corporal y de músculos maseteros de ratones BALB/c hembras y machos	37
7.3	Inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero promueve niveles equivalentes de atrofia muscular en ratones BALB/c hembras y machos.....	38
8.	CONCLUSION	41
9.	ALCANCES Y PROYECCIONES.....	42
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La inyección de toxina botulínica tipo A (BoNTA) en músculo masetero es ampliamente usada, de manera *off label*, en el tratamiento de trastornos temporomandibulares (TTM). Estudios preclínicos han determinado que, además de parálisis, genera atrofia muscular progresiva. Esto se ha evaluado principalmente en animales macho, sin embargo los TTM afectan más frecuentemente a mujeres que hombres. Existe dimorfismo sexual en la morfofunción del tejido muscular y la respuesta a inductores de atrofia, con mayor propensión a atrofia en hembras. Por tanto, la pregunta de este estudio fue: ¿se atrofia diferencialmente el músculo masetero de ratones machos y hembras por inyección de BoNTA?

OBJETIVO: Cuantificar y comparar marcadores moleculares e histológicos de atrofia en músculo masetero de ratones machos y hembras inyectados con BoNTA.

MATERIALES Y MÉTODOS: Ratones de 9 semanas (machos/hembras) fueron divididos en un grupo no intervenido y un grupo experimental (CICUA 20381-ODO-UCH-e1); éste último recibió una inyección de BoNTA en el músculo masetero derecho y solución salina en el masetero izquierdo. La eutanasia y disección de los músculos maseteros se realizó a los 2-7-14 días post-intervención. Se cuantificaron los niveles relativos de ARNm de marcadores de atrofia (Atrogina, Murf, Miogenina) por RT-qPCR. y el diámetro de las fibras musculares en criocortes transversales.

RESULTADOS: Se observó un aumento significativo de marcadores de atrofia a los 2,7 y 14 días post-intervención en ambos sexos, sin diferencia entre ellos. El diámetro de fibras del músculo masetero inyectado con BoNTA disminuyó significativamente en hembras y machos a los 7 y 14 días post intervención, siendo estas diferencias mayores en hembras. El músculo masetero contralateral aumentó el diámetro de fibras en hembras y disminuyó en machos.

CONCLUSIONES: La inyección de BoNTA unilateral en masetero de ratón promueve un aumento de expresión de genes de atrofia muscular similar en hembras y machos. Sin embargo, en hembras parece existir una disminución más acentuada del diámetro de fibras a los 7 y 14d. El músculo masetero contralateral a la inyección de BoNTA, se adapta diferencialmente de acuerdo al sexo: en machos muestra signos de atrofia muscular, mientras que en hembras se hipertrofia.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Generalidades del músculo esquelético

El músculo esquelético es un tejido organizado y dinámico, que permite la generación de fuerza y movimiento del cuerpo humano. Se caracteriza por su plasticidad, ya que frente a estímulos químicos, mecánicos u hormonales modifica su estructura y función para adaptarse a la demanda (Frontera & Ochala, 2015).

La unidad celular del músculo es la fibra muscular. Ésta tiene en su interior una compleja organización del citoesqueleto en forma de miofibrillas, que corresponden a unidades repetidas de sarcómeros, que son la maquinaria contráctil del músculo (Figura 1). La contracción sarcomérica consiste en un movimiento de filamentos gruesos de Miosina sobre filamentos delgados de Actina, con ayuda de múltiples proteínas accesorias (Mukund & Subramaniam, 2020; Schiaffino & Reggiani, 2011).

Las fibras musculares son células multinucleadas, donde la proteína motora principal es la Miosina. Según la expresión de distintas isoformas de cadena pesada de Miosina ("Myosin Heavy Chain", MyHC), las fibras musculares se pueden clasificar en tipo I y II (Blaauw et al., 2013). Las fibras tipo I o lentas, tienen velocidad de contracción lenta, son resistentes a la fatiga muscular, tienen metabolismo oxidativo y alto contenido de mitocondrias. Por otro lado, dentro de las fibras tipo II o rápidas se encuentran dos subtipos, IIA y IIX, que se caracterizan por tener velocidad de contracción rápida y gran generación de fuerza, se fatigan más rápidamente, tienen un metabolismo principalmente glicolítico y presentan un mayor diámetro en comparación a las fibras tipo I (Qaisar et al., 2016; Schiaffino & Reggiani, 2011).

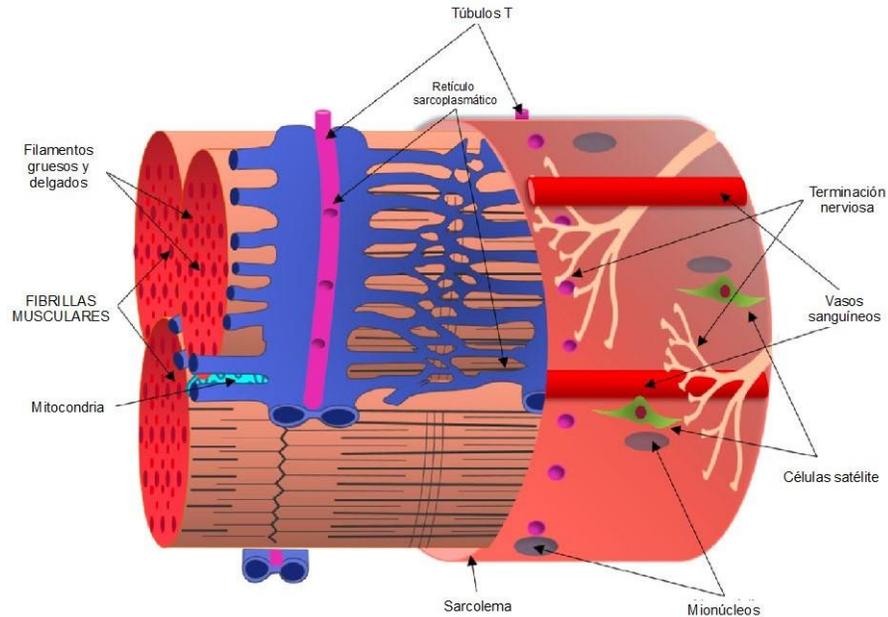


Figura 1. Representación de una porción de una fibra muscular esquelética. Se muestra la fibra muscular como conjunto de miofibrillas, revestidas por el sarcolema (membrana plasmática). Las células satélite residen a lo largo de la fibra muscular, sobre el sarcolema, debajo de la lámina basal y próximas a los mionúcleos. Las fibras nerviosas invasoras se extienden a lo largo de la fibra muscular, pero se contactan con las fibras musculares en regiones específicas. Imagen modificada de Mukund y cols. (Mukund & Subramaniam, 2020).

La unidad funcional del músculo, denominada unidad motora, se compone de una motoneurona y el conjunto de fibras musculares que inerva. Éstas se comunican a través de una sinapsis química especializada, la unión neuromuscular, región donde se produce la transmisión de impulsos eléctricos mediante la liberación del neurotransmisor Acetilcolina (Ach) desde la terminal nerviosa a la fibra muscular para finalmente generar la contracción (Mukund & Subramaniam, 2020). La unión neuromuscular se compone de tres estructuras principales (Figura 2): 1) Región presináptica, que contiene “vesículas sinápticas” cargadas con acetilcolina (Ach), las cuales se fusionan en “zonas activas” para iniciar la transmisión neuromuscular. Estas zonas contienen proteínas altamente especializadas, asociadas al acoplamiento, fusión y exocitosis de las vesículas, lo cual ocurre por la entrada de calcio al terminal nervioso. La maquinaria exocítica se compone del receptor de la proteína de unión a NSF soluble (SNARE) y de

proteínas tipo SEC1/MUNC18 (SM). El complejo SNARE (SNAP receptors) consta de las proteínas SNAP25, Sintaxina-1 (asociadas a la membrana presináptica) y Sinaptobrevina (asociada a la vesícula) (Hughes et al., 2006; Mukund & Subramaniam, 2020). 2) Hendidura sináptica, que contiene la lámina basal compuesta por proteínas estructurales de matriz extracelular, como colágeno y laminina. 3) Superficie post sináptica, compuesta por la membrana de la fibra muscular (sarcolema) con pliegues de unión (Mukund & Subramaniam, 2020).

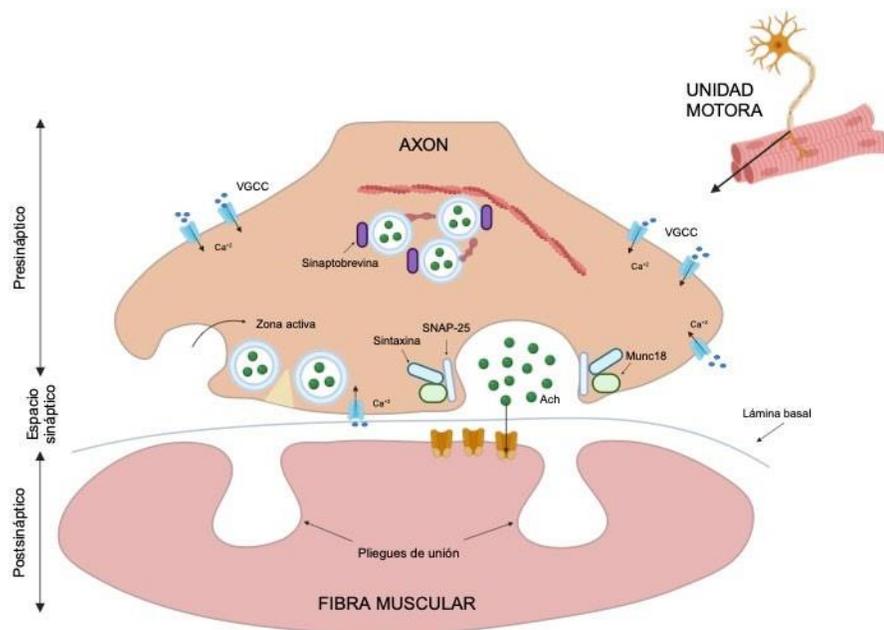


Figura 2. Representación de una unión neuromuscular. En la zona presináptica las vesículas se fusionan con la membrana terminal y liberan acetilcolina (ACh) a la hendidura sináptica. La entrada de calcio a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VGCC) desencadena la fusión de vesículas y la liberación de las zonas activas. El espacio sináptico contiene la lámina basal. Imagen modificada de Mukund y cols. (Mukund & Subramaniam, 2020).

Las células satélite son células madre miogénicas quiescentes, ubicadas alrededor de la fibra muscular, específicamente entre el sarcolema y la lámina basal (Frontera & Ochala, 2015). Éstas cumplen un rol fundamental en la capacidad de reparación y regeneración muscular, ya que se activan, proliferan y se diferencian en nuevas fibras musculares frente a estímulos tanto fisiológicos

(por ejemplo, ejercicio), como patológicos (por ejemplo, daño o lesión muscular) (Frontera & Ochala, 2015; Musarò & Carosio, 2017). Su activación está asociada a diferentes factores reguladores miogénicos, como MyoD1 y Miogenina, que están relacionados directamente con la masa muscular o reparación muscular (Manzano et al., 2011).

1.2 Músculos Masticatorios

El sistema masticatorio es un grupo organizado de estructuras craneofaciales donde huesos, músculos y articulación temporomandibular (ATM) son un componente fundamental en las funciones orofaciales, tales como la masticación, deglución y habla. Los músculos masticatorios se dividen en músculos elevadores (temporal, masetero, pterigoideo medial) y músculos depresores (digástrico, pterigoideo lateral, genihioideo y milohioideo) (Isola et al., 2018).

Los músculos masticatorios tienen múltiples diferencias con los músculos del tronco y extremidades, tales como: 1. Derivan del mesodermo del primer arco faríngeo, mientras que los músculos de tronco y extremidades derivan de los somitos; 2. Expresan isoformas de MyHC que en músculos de tronco y extremidades no se expresan en la etapa adulta (MyHC fetal, neonatal y cardíaca); 3. Hay una gran proporción de fibras híbridas, es decir, una misma fibra muscular expresa distintas isoformas de MyHC; 4. Sus fibras tipo II tienen un menor diámetro que las tipo I, contrario a lo que ocurre en tronco y extremidades; 5. Sus fibras tipo I alcanzan velocidades de contracción mucho más lentas y las tipo II velocidades mucho más rápidas que sus contrapartes en músculos de tronco y extremidades, lo que da un mayor rango dinámico contráctil. Todo lo anterior da lugar a una alta heterogeneidad de fibras musculares en los músculos masticatorios, que generan gran fuerza y tienen alta resistencia a la fatiga, además de ser capaces de responder frente a factores genéticos, hormonales y ambientales (Schiaffino & Reggiani, 1996; Sciote et al., 2003).

1.3 Trastornos temporomandibulares

Los trastornos temporomandibulares (TTM) son un grupo de patologías de origen multifactorial, que involucran a ATM, músculos masticatorios, huesos y estructuras blandas asociadas. Causan dolor y disfunción y son de etiología compleja; a pesar de tener bases físicas reconocibles, muchos casos involucran factores biopsicosociales o emocionales, dificultando su diagnóstico y posterior tratamiento (Li & Leung, 2021).

Estudios han determinado que los TTM afectan entre un 6 y un 12% de la población, que sólo alrededor de un 5% del porcentaje afectado presenta signos y síntomas con necesidad de tratamiento y que existe una mayor prevalencia en mujeres (De Rossi et al., 2014). Estudios en Chile han demostrado que de la población afectada con TTM, un 62% corresponde a mujeres y un 38% a hombres (Díaz Guzman et al., 2012; Guerrero et al., 2017), lo que sugiere que el sexo es un factor importante a considerar en la prevalencia de estas patologías.

Los TTM pueden ser de origen articular y no articular. Estos últimos son desórdenes que afectan a los músculos masticatorios y se presentan en más del 50% de los casos como dolor miofascial, que surge a partir de hábitos parafuncionales, como por ejemplo el bruxismo (Liu & Steinkeler, 2013). Los tratamientos se han enfocado principalmente en la reducción de dolor y mejora de la función mandibular. Se han utilizado distintos métodos como medicación analgésica y antiinflamatoria, dispositivos oclusales, fisioterapia, intervenciones psicológicas, acupuntura o inyección de toxina botulínica tipo A (BoNTA) (Li & Leung, 2021). La inyección de BoNTA en músculo masetero es ampliamente utilizada para el tratamiento de TTM; sin embargo, los efectos de esta toxina en la mejoría del dolor no son consistentes a través de los estudios (Datta Gupta et al., 2022; Wu et al., 2023). Un estudio reciente demostró que la inyección de BoNTA y solución salina (placebo) tienen efectos similares en el tratamiento de dolor miofascial a corto plazo (Reeve et al., 2024). Si bien no se ha encontrado un

mayor riesgo de daño por su uso, se concluyó que los estudios no han sido diseñados para medir esto de manera rigurosa (la Fleur & Adams, 2020).

1.4 Toxina botulínica

La toxina botulínica (BoNT) es una proteína liberada por bacterias anaeróbicas Gram positivo llamadas *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyrricum*, *Clostridium barati*, entre otras especies. (Choudhury et al., 2021; Patil et al., 2016). Existen 8 serotipos de BoNT, donde la mayoría causa parálisis muscular flácida a nivel de la unión neuromuscular, bloqueando el proceso de secreción de Ach desde la motoneurona, mediado por proteínas SNAREs (Figura 3) (Miller & Clarkson, 2016; Tinastepe et al., 2015).

Las distintas cepas bacterianas secretan esta neurotoxina junto con otro tipo de proteínas con acción hemoaglutinadora, conocidas como proteínas asociadas a neurotoxina (NAPs), las que le otorgan protección contra el ambiente, como acidez y temperatura. Estas formas complejas de BoNT son usadas actualmente en aplicaciones terapéuticas (Choudhury et al., 2021). Se han descrito 8 serotipos de toxina botulínica, de los cuales la tipo A (BoNTA) y tipo B son de uso clínico (Janes et al., 2021).

La parálisis inducida por la toxina es temporal (2-6 meses en humanos), teniendo BoNTA mayor duración de acción que la tipo B. Ambas son ampliamente utilizadas en desórdenes musculares para los cuales la toxina está aprobada por la FDA, incluyendo distonías, espasmos, temblores y migrañas (Allergan, 2023).

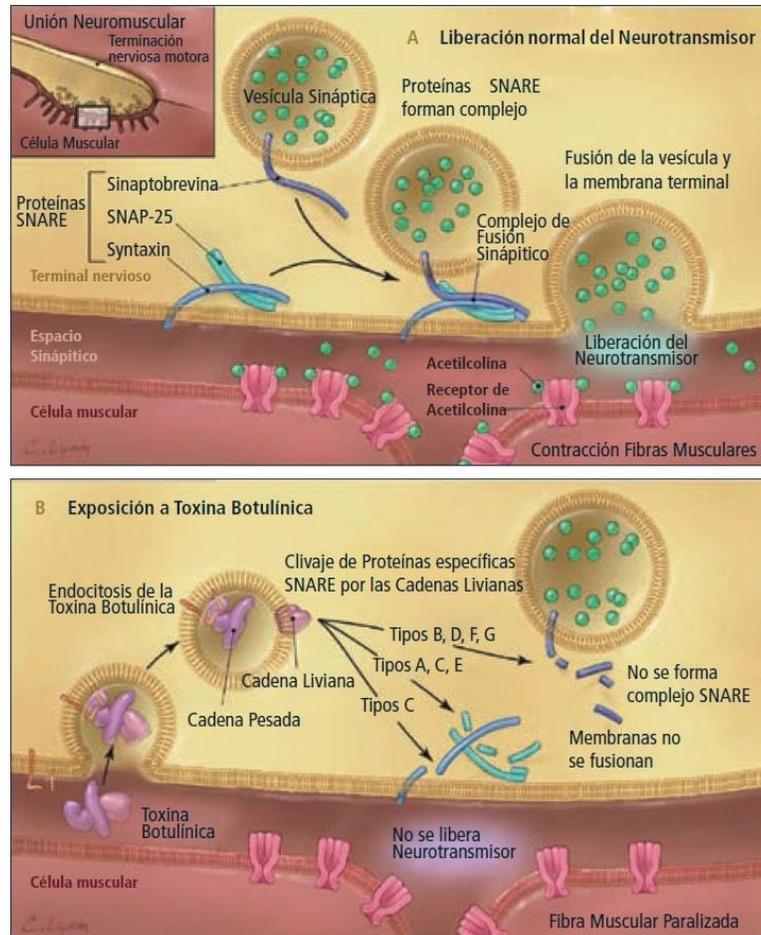


Figura 3. Esquema del efecto de la toxina botulínica en la unión neuromuscular. (A) Liberación normal del neurotransmisor en la unión neuromuscular. (B) Mecanismo de acción de toxina botulínica. Se muestran los blancos moleculares de acción de los distintos serotipos de toxina botulínica (Cecilia Cortés-Monroy & Soledad Soza, 2014)

1.4.1 Usos clínicos y estéticos de BoNTA en músculo masetero

Uno de los recientes usos de BoNTA ha sido en el tratamiento de TTMs, como los que afectan los músculos masticatorios, donde se inyecta BoNTA para disminuir su función y nocicepción. En la práctica odontológica, la inyección de BoNTA en músculo masetero es ampliamente utilizada para el tratamiento de dichos trastornos, como el bruxismo, dolor orofascial o hipertrofia maseterina (Tinastepe et al., 2015; von Lindern et al., 2001). En Chile, estos usos están

aprobados por el Instituto de Salud Pública (ISP) (ISP, 2021). Sin embargo, cabe recalcar que la inyección de BoNTA en músculo masetero no está aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration, EE. UU*) ni recomendada por el fabricante. Por lo tanto, su uso se considera *off label*.

La aplicación de BoNTA en el aparato masticatorio requiere estudios a mayor profundidad, debido a la multifactorialidad de trastornos como el bruxismo y la descripción reciente de efectos de atrofia y osteopenia generados por BoNTA en este territorio (De la Torre Canales et al., 2024; Patel et al., 2019).

1.5 Atrofia muscular

La atrofia muscular se define como la pérdida de masa y disminución de fuerza muscular. Se caracteriza por una disminución del área de sección transversal de las fibras musculares, cambios en el tipo de fibras o isoformas de Miosina, y disminución de la razón síntesis/degradación de proteínas (Ding et al., 2018; Gomes et al., 2001; Yin et al., 2021). La atrofia muscular puede ocurrir en condiciones tanto agudas, como el desuso del músculo (por ejemplo, por inmovilización transitoria), como asociada a patologías crónicas (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas o genéticas), o durante el envejecimiento (Ding et al., 2018; Gao et al., 2018). Se puede clasificar en atrofia primaria, como resultado de patologías neuromusculares congénitas o genéticas; y atrofia secundaria, como resultado de patologías adquiridas o condición física (ejemplo: inmovilización, desuso) (Yin et al., 2021).

La atrofia por desuso es consecuencia de episodios de inactividad muscular, lo que produce una rápida pérdida de masa muscular. Esto ocurre debido a un desbalance en la síntesis y degradación de proteínas que son reguladas por los factores de transcripción de la familia FoxO (Forhead Box-O) (Wall et al., 2013).

La síntesis y degradación de proteínas es regulada por distintas vías de señalización. La síntesis de proteínas es principalmente comandada por el factor

de crecimiento similar a la insulina (IGF1). La vía de señalización IGF1-Akt/PKB-mTOR promueve la síntesis proteica al activar Akt, que inhibe la degradación de proteínas mediante la inhibición de los factores de transcripción FoxO y estimula la síntesis de proteínas a través del complejo de molécula diana de rapamicina en mamíferos (mTOR) (Anderson et al., 2017; Schiaffino & Mammucari, 2011). Por el contrario, las principales vías de degradación proteica involucradas en la atrofia muscular son el sistema ubiquitina proteasoma (UPS) y la autofagia (Sandri, 2013). La vía UPS cumple un rol fundamental en los procesos catabólicos que contribuyen en la atrofia muscular y se compone principalmente de Ubiquitina ligasas E1, E2 y E3. Las proteínas MuRF-1 (muscle RING finger protein 1) y MAFbx/Atrogin-1 (muscle atrophy F-box), son las principales ligasas de E3 que se expresan en el músculo esquelético (Zhang et al., 2018). Los factores FoxO son necesarios para la inducción transcripcional de las ligasas MuRF-1 y Atrogin-1, las cuales se encargan de degradar miosinas y proteínas musculares en general. Los factores FoxO, a su vez, son regulados positivamente por la proteína Miostatina, encargada de frenar el crecimiento muscular (Figura 4) (Bodine et al., 2001; McFarlane et al., 2006).

1.6 Atrofia de músculo masticatorio inducida por toxina botulínica

En humanos, la inyección de toxina botulínica en músculos masticatorios, particularmente en músculos masetero y/o temporal, se realiza con fines estéticos o para aliviar dolores faciales producto de los TTM, tales como bruxismo, trismus e hipertrofia (Rafferty et al., 2012).

En un estudio en ratas macho adultas donde se realizó inyección bilateral de BoNTA en músculo masetero y temporal, se observó un aumento de proteínas Atrogin-1 y MuRF-1 y además, pérdida ósea del cóndilo mandibular adyacente (Kün-Darbois et al., 2015). De igual manera, un estudio en ratas hembras adultas concluyó que la inyección bilateral de BoNTA en musculo masetero produce pérdida de masa muscular, aumento de Atrogin-1 y MuRF-1, provocando una disminución de carga oclusal y función masticatoria (Shi et al., 2018).

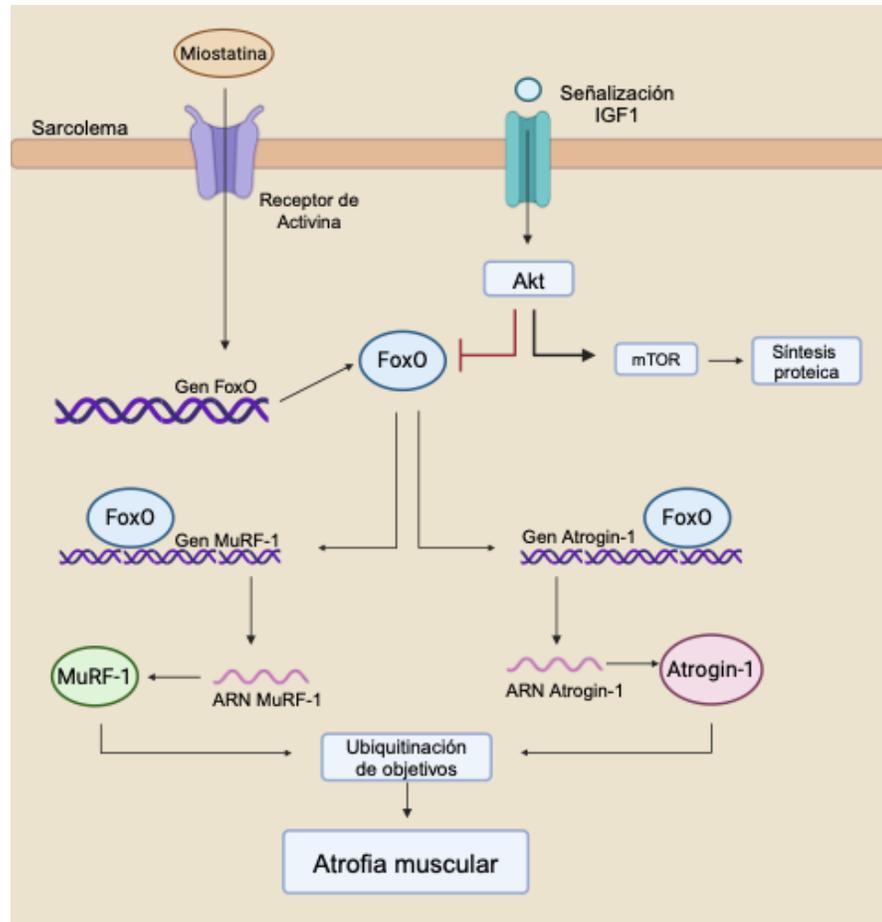


Figura 4. Mecanismo de señalización para atrofia muscular: efecto de vías de síntesis y degradación de proteínas. Los factores de transcripción FoxO aumentan la expresión de genes de ubiquitina ligasa E3 específicos de músculo, MuRF1 y Atrogin-1, durante la atrofia muscular. FoxO es regulado negativamente por Akt y positivamente por miostatina. La vía IGF-1 inhibe los factores de transcripción FoxO y activa la vía mTOR. Figura modificada de (Ebert et al., 2019).

En ratones machos adultos, la inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero disminuye la masa muscular y aumenta la expresión de marcadores de atrofia muscular desde los 2 días post-inyección; además, reduce el área de sección transversal de las fibras musculares desde los 7 días post inyección (Balanta-Melo et al., 2023; Balanta-Melo et al., 2018). Dado que a la fecha no existe evidencia que compare este efecto en hembras y machos, es de gran relevancia evaluar si existen posibles diferencias que permitan establecer dimorfismo sexual en el efecto adverso de BoNTA sobre el aparato masticatorio.

1.7 Dimorfismo sexual en músculo esquelético

Existen diferencias en la proporción de distintos tipos de fibras musculares entre hembras y machos. Las hembras tienden a tener un mayor contenido de fibras tipo I en músculo esquelético y, por lo tanto, una tendencia al metabolismo oxidativo que permite una mayor resistencia y recuperación, en comparación con los machos (Haizlip et al., 2015).

Por otro lado, los machos tienen un mayor porcentaje de fibras tipo II, las cuales producen mayor fuerza que las fibras tipo I (Nuzzo, 2024). Además, el área de sección transversal de fibras musculares es mayor en hombres que en mujeres, lo que se condice con el mayor porcentaje de masa muscular que tienen los hombres (Callahan et al., 2014; Haizlip et al., 2015).

En ratones hembras adultas se encontró que en músculo extensor largo de dedos hay una menor cantidad de células satélite por fibra muscular en comparación a machos, lo que sugiere que en hembras hay una menor capacidad de reparación muscular (Neal et al., 2012). Estudios han demostrado que los machos tienen una mayor activación y proliferación de células satélites que las hembras. Estas diferencias pueden deberse en parte a diferencias en la proliferación de células satélite mediada por la hormona testosterona (Rosa-Caldwell & Greene, 2019).

Las hormonas sexuales cumplen un rol fundamental en la homeostasis del tejido muscular. Los andrógenos y estrógenos, derivadas del colesterol, secretados principalmente por las gónadas y glándulas adrenales, contribuyen a la diferencia en morfología y función del músculo esquelético (Anderson et al., 2017). La testosterona, principal hormona masculina, actúa mediante la acción de los receptores de andrógenos (AR) para aumentar la síntesis proteica, cumpliendo un rol fundamental en el aumento de masa y fuerza muscular (Alexander et al., 2022; Anderson et al., 2017; Rosa-Caldwell & Greene, 2019).

Los estrógenos son las principales hormonas femeninas. Existen múltiples receptores de estrógenos tanto en el citosol como en el sarcolema de los miocitos, los cuales participan en la regulación de masa y contracción muscular; sin embargo, los estudios han presentado controversias y se necesita ampliar el conocimiento en esta área (Anderson et al., 2017). Los niveles de estrógenos varían durante el ciclo menstrual y disminuyen con la edad. Posterior a la menopausia los niveles de estrógenos permanecen muy bajos (Alexander et al., 2022; Spangenburg et al., 2012). La forma más abundante de estrógeno producida en el cuerpo es 17β - estradiol (E2) (Enns & Tiidus, 2010). Se ha visto que la presencia de E2 intramuscular está altamente asociada a la fuerza y potencia muscular. Sin embargo, las vías de señalización aún no están suficientemente claras y se desconocen los factores que podrían gatillar las posibles diferencias con los machos, lo que requiere mayor estudio a profundidad (Pöllänen et al., 2015).

1.8 Dimorfismo sexual y atrofia muscular

Estudios en ratas demostraron que bajo descarga de extremidades traseras las hembras tienen una mayor disminución de peso y del área de sección transversal de fibras musculares de músculo sóleo que machos. Se observó que en hembras hay mayores niveles de proteínas ubiquitinadas y una mayor activación de desfosforilación de FOXOa3 a los 7 días posteriores a la descarga de extremidades traseras, lo que se traduce en una regulación positiva del UPS; esto quiere decir que la ruta catabólica está más activa en hembras que en machos (Yoshihara et al., 2019). De manera similar, en ratones bajo descarga de extremidades se encontró que las hembras tienen una ruta catabólica más activa y mayor disminución de síntesis proteica, lo cual se correlaciona con una mayor pérdida muscular en comparación a los machos (Rosa-Caldwell et al., 2021).

Recientemente, se indicó que después de periodos de atrofia, la regulación de la masa y fuerza muscular en mujeres parece ser afectada por el estado de las hormonas ováricas, específicamente de E2 (McMillin et al., 2022).

Considerando la información expuesta, podemos señalar que:

- La inyección de BoNTA en músculo masetero es una práctica clínica habitual, aunque *off label*, para tratar TTMs de origen muscular.
- Las mujeres tienen mayor prevalencia de TTMs y son las que más utilizan BoNTA para intervenciones clínicas y estéticas.
- Estudios preclínicos demuestran que la inyección de BoNTA en músculo masetero induce atrofia muscular.
- Los estudios preclínicos se han realizado principalmente en animales machos.
- Existen diferencias en la morfofunción del tejido muscular y respuesta a factores inductores de atrofia en machos y hembras, con mayor propensión a atrofia en hembras.

Teniendo esto en cuenta, nos preguntamos “¿Existen mayores niveles de atrofia en músculo masetero de hembras que de machos posterior a la inyección de BoNTA?”

2. HIPÓTESIS

La inyección unilateral de toxina botulínica tipo A en músculo masetero de ratón adulto induce mayores niveles de atrofia en hembras que en machos.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar y comparar signos de atrofia de músculo masetero inducida por inyección unilateral de BoNTA en ratones hembra y macho adultos.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Cuantificar y comparar en machos y hembras la expresión relativa de marcadores moleculares de atrofia y reparación en músculo masetero.
- 2) Determinar y comparar en machos y hembras marcadores macroscópicos e histológicos de atrofia de músculo masetero.

5. METODOLOGÍA

5.1 Tipo de estudio

Estudio experimental en modelo animal.

5.2 Diseño experimental y tamaño muestral

Se utilizaron músculos maseteros de ratones macho y hembra adultos para comparar su afectación luego de parálisis muscular unilateral inducida por BoNTA. Se utilizaron los siguientes grupos experimentales (Figura 5).

- Ratones sin intervenir: 7 hembras y 7 machos
- Ratones con inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero: 41 hembras y 41 machos. De este grupo, se eutanasiaron animales a distintos días post intervención (2, 7 y 14 días) para comparar entre hembras y machos no solo la magnitud, sino también la temporalidad de los efectos de atrofia muscular. El desglose del número de animales se resume en la Tabla 1.

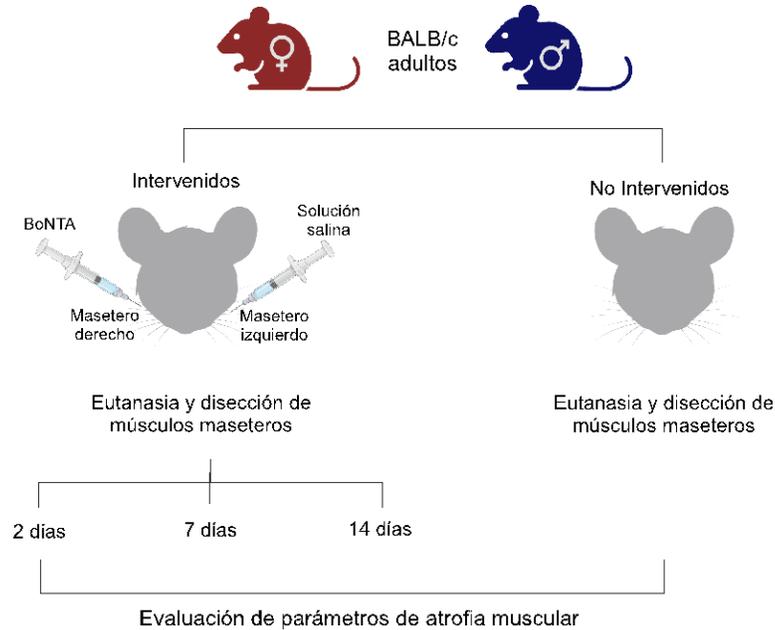


Figura 5. Esquema de diseño experimental. ♀ = hembras, ♂ = machos.

Tabla 1. Número de animales utilizados en cada grupo de estudio.

Tiempo post intervención	Grupo no intervenido	Grupos intervenidos con BoNTA/salino		
		2 días	7 días	14 días
N° hembras (total n=41)	qRT-PCR: n=4	qRT-PCR: n=8	qRT-PCR: n=9	qRT-PCR: n=8
	Histología: n=3	Histología: n=3	Histología: n=3	Histología: n=3
N° machos (total n=41)	qRT-PCR: n=4	qRT-PCR: n=8	qRT-PCR: n=9	qRT-PCR: n=8
	Histología: n=3	Histología: n=3	Histología: n=3	Histología: n=3

El tamaño muestral necesario para determinar diferencias en expresión génica entre los lados inyectados con BoNTA o solución salina ha sido calculado y reportado por nuestro grupo en estudios previos como n=6 (Balanta-Melo et al., 2023), mientras que para detectar cambios en el diámetro de fibras musculares

por técnicas histológicas basta un $n=3$ (Balanta-Melo et al., 2018). Como en este trabajo se utilizaron muestras derivadas del proyecto Fondecyt 1201385, algunos grupos intervenidos tienen un $n>6$, pues se utilizaron todas las muestras disponibles.

Los protocolos para el manejo animal y procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile (N°20381-ODO-UCH-e1) y Comité de Bioseguridad del Campus Norte de la Universidad de Chile (FDO N° 137). Cabe mencionar que todo el trabajo con animales y toma de muestras formó parte del proyecto Fondecyt 1201385 (IR: Sonja Buvinic), y fue realizado por personal certificado (Sonja Buvinic, Noelia Blanco).

5.3 Intervención con BoNTA en músculo masetero

Ratones BALB/c adultos (8-9 semanas de edad, 18-28g) se alojaron en condiciones controladas (20 ± 2 °C, humedad relativa 42% - 48% y 12 h ciclo luz / oscuridad), con agua y comida *ad libitum* (LabDiet® JL Rata y ratón / Auto 6F 5K67; Lab Diet, St Louis, MO, EE. UU.).

En el día 0, los ratones fueron anestesiados mediante una inyección *i.p.* de Ketamina-Xilacina (80 mg/kg – 8 mg/kg). Luego, los animales del grupo BoNTA recibieron una única inyección de BoNTA (0,2U/10 μ L; Onabotulinumtoxin A; BOTOX®, Allergan Chile, Chile) en el músculo masetero derecho. La dosis y protocolo de inyección se estandarizó en un estudio anterior (Balanta-Melo et al., 2019) y fue escalada a la masa del músculo masetero del ratón según las dosis informadas para procedimientos clínicos en humanos (Miller & Clarkson, 2016; Van Eijden et al., 1997). El músculo masetero izquierdo se inyectó con 10 μ L de solución salina (0,9% p/v de NaCl) como control intra-individuo. Los animales del grupo no intervenido no tuvieron ningún tipo de intervención adicional a la anestesia.

Se realizó una evaluación diaria general del bienestar animal y se registró masa corporal al comienzo, día por medio y al final del protocolo, por personal de la Plataforma Experimental de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Posterior a la intervención (2, 7 o 14 días), cada animal recibió una sobredosis de combinación de anestesia (Ketamina/Xilacina) i.p. como método de eutanasia, verificado mediante la evaluación de signos vitales. Se diseccionaron los músculos maseteros derecho e izquierdo y se cuantificó su masa en balanza analítica (Balanta-Melo et al., 2019). Las muestras se procesaron de acuerdo a la técnica a utilizar.

5.4 Extracción y cuantificación de ARN total, RT – PCR tiempo real (qPCR)

Los músculos destinados a análisis de qPCR, se separaron en mitades luego de la disección y se congelaron como muestra y contramuestra de forma separada en nitrógeno líquido por 1 min. Luego se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. La obtención del ARN total del músculo masetero se realizó con el reactivo Trizol® (ThermoFisher, MA, EE. UU.), siguiendo el protocolo descrito previamente (Balanta-Melo et al., 2018). Se precipitó el ARN con isopropanol y GlycoBlue® (ThermoFisher, MA, EE. UU.) toda la noche a -20°C . Luego se lavó con etanol frío al 75% y resuspendió en 20 μl de agua libre de nucleasas. Para eliminar las trazas de ADN genómico se realizó tratamiento del ARN mediante el kit DNasa I (ThermoFisher, #AM1906, MA, EE. UU.) y se determinó la concentración de ARN en $\text{ng}/\mu\text{l}$, evaluando la pureza mediante la razón de absorbancias 260/280 nm por espectrofotometría en equipo Nanodrop. La obtención de ADNc a partir de ARN fue mediante la disolución de 1 μg de ARN en agua libre de nucleasas, utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher, #4368814, MA, EE. UU.) en un volumen total de 20 μl y luego se llevó a termociclador MiniAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific) en el esquema siguiente: 25°C por 10 min, 37°C por

120 min, 85°C por 5 min, 4°C ∞; la duración total fue de 2 h y 15 min aproximadamente. Posteriormente, las muestras se guardaron a -20°C.

El qPCR se realizó utilizando el producto Fast SYBR™ Green Master Mix (ThermoFisher, #4385616, MA, EE. UU.), mezclando 6 µl del mix con 1 µl de ADNc (dilución de 1:5 del ADNc derivado de la transcripción inversa), 1,2 µl de mezcla de partidores sentido y antisentido correspondientes (concentración final en reacción, 400 nM) y 3,8 µl de H₂O sin nucleasas. La reacción de qPCR se realizó en el equipo StepOne™ Real-Time PCR System (Thermo Fischer Scientific, MA, EE. UU.), utilizando el siguiente esquema de ciclos: 95°C durante 20 s, 40 ciclos de 95°C por 3 s y 60°C por 30 s.

Se analizaron los niveles de expresión relativa de ARNm de *Atrogin-1*, *MuRF-1* y *Miogenina* (marcadores de atrofia muscular) y se utilizó como normalizador el gen “housekeeping” *Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa* (*Gapdh*). Los partidores específicos para cada gen analizado se detallan en la Tabla 2. Los valores fueron normalizados a la expresión del gen constitutivo *Gapdh* y analizados según método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl, 2001).

Tabla 2. Descripción de los partidores usados para qPCR

Gen	Partidor sentido (5'-3')	Partidor Anti-sentido (5'-3')	Referencia
<i>Atrogin-1</i>	GTTTTCAGCAGGCCAAGAAG	TTGCCAGAGAACACGCTATG	(Murphy et al., 2012)
<i>MuRF-1</i>	TGCCTACTTGCTCCTTGT	CTGGTGGCTATTCTCCTT	(Murphy et al., 2012)
<i>Miogenina</i>	CTCCCTTACGTCCATCGT	CAGGACAGCCCCACTTAA	(Church et al., 2014)
<i>Gapdh</i>	CAACTTTGGCATTGTGGAAG	CTGCTTCACCACCTTCTTG	(Bustamante et al., 2014)

5.5 Criocortes del músculo masetero, inmunofluorescencia indirecta y cuantificación de diámetro mínimo de Feret de fibras musculares

Posterior a la eutanasia y disección de los músculos maseteros izquierdo y derecho, éstos se embebieron en el criopreservante Tissue-Tek® OCT (Sakura Finetek, #4583, CA, EE. UU.) y luego se congelaron de manera independiente durante 1 min según protocolo de isopentano en nitrógeno líquido (Meng et al., 2014). Cada músculo se almacenó en un tubo eppendorff a -80°C hasta su procesamiento. Se realizaron criocortes de músculo masetero en secciones transversales congeladas de 10 µm de grosor (Criostato Leica CM-1520) y se ubicaron en portaobjetos silanizados StarFrost®. Las placas se guardaron a -20°C hasta su procesamiento.

Los criocortes de músculo masetero se lavaron con tampón fosfato salino (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7,2), se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS por 30 min a temperatura ambiente y se incubaron con glicina 100 mM en PBS por 10 min. Se permeabilizó la membrana con 0,1% de Tritón 100X en PBS por 10 min a temperatura ambiente y luego se bloqueó con PBS suplementado con albúmina de suero bovino (BSA) al 4% por 10 min a temperatura ambiente. Se incubó el anticuerpo primario anti-caveolina3 1:100 (BD Biosciences, #610421, CA, EE.UU.) en PBS-BSA al 2% durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente, los cortes se lavaron 3 veces por 5 min con PBS-BSA 4%. Se incubaron las muestras simultáneamente con el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 Anti-mouse 1:100 (ThermoFisher, #A11001, MA, EE. UU.) y con tinción de Hoechst 33342 1:2000 para marcar los núcleos (ThermoFisher, #H3570, MA, EE. UU.), por 30 min a 37°C en oscuridad. Se utilizó medio de montaje DAKO (Agilent, CA, EE. UU.). Se dejó secar a oscuras durante 24 h. Adicionalmente se realizó un control negativo en el cual un criocorte de músculo masetero fue incubado sólo con el anticuerpo secundario, para ver la posible unión inespecífica de este anticuerpo a las muestras.

Las imágenes de las inmunofluorescencias fueron obtenidas en un microscopio de epifluorescencias Nikon Ti-E invertido, con un objetivo 10x. Se adquirieron tres imágenes de cada corte. Se utilizó el programa ImageJ (National Institute of Health, NIH, EE.UU.) para visualizar imágenes y se guardaron en formato TIFF.

El diámetro mínimo de Feret de las fibras musculares se cuantificó utilizando el programa DRAGONFLY (V.2022.2.0.1361, Object Research System, Canadá). Para asegurar un correcto análisis, se trabajó en ciego con las muestras codificadas, sin saber a qué condición correspondían. Se obtuvo un modelo en el cual se realizó un entrenamiento del programa para identificar las fibras musculares, utilizando distintos recortes de las imágenes de las muestras que contuvieran 15-20 fibras. En este se definieron los rangos que diferenciaban “fibras” y “background”, y luego se realizó un mejoramiento manual de lo preseleccionado por el equipo.

Para obtener el análisis, se cargaron individualmente los archivos TIFF en el programa DRAGONFLY, que reconstruye la imagen en una escala de grises, de 0 a 255. A cada recorte se le aplicó el modelo generado previamente, donde se obtuvieron las regiones de interés (ROI) y se cuantificó el parámetro de “diámetro mínimo de Feret”. Los resultados del análisis fueron exportados en formato CSV, el que es compatible con Excel. Estos datos fueron compilados y guardados con su identificación correspondiente para su posterior análisis estadístico.

5.6 Presentación de datos y análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron ordenados y asociados a las muestras correspondientes. Los gráficos y el análisis estadístico se realizaron con el programa GraphPad Prism 10.2.3, los resultados se expresaron como promedio \pm error estándar de la media (SEM). El nivel de significancia establecido fue de $p < 0,05$. La distribución normal de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Si los datos presentaban distribución normal, se utilizó test de t

pareado para comparar los dos lados de un mismo animal, y no pareado para comparar datos de distintos animales. En caso de no tener distribución normal de los datos, se utilizaron pruebas no paramétricas como el Test de Wilcoxon o Mann Whitney para comparación entre dos condiciones (pareada y no pareada, respectivamente).

En los casos de diámetro de fibra, se evaluaron un rango de 100-250 fibras por foto tomada en las muestras; se utilizaron tres fotos por cada muestra, y tres muestras (3 animales diferentes) para cada condición (total de 9 imágenes por condición). Al tener múltiples datos provenientes de cada individuo, se utilizó el t-test anidado de dos colas para comparar dentro de cada grupo. Para comparar 3 o más condiciones se utilizó ANOVA anidado de dos colas.

6. RESULTADOS

6.1 Comparación de masa corporal, masa de músculo masetero y diámetro de fibras musculares en ratones machos y hembras sin intervención

Para caracterizar y comparar los parámetros físicos de masa corporal y del músculo masetero en los ratones en condiciones normales, se evaluaron ratones hembras y machos sin intervención. Se evaluó la masa corporal como indicador de dimensión general de los animales. Además, se evaluó la masa de los músculos maseteros.

La masa corporal de los ratones macho fue un 15% mayor que la de las hembras (Figura 6A). Pese a que la masa de los músculos maseteros no tuvo diferencia significativa entre sexos (Figura 6B), al normalizarla con sus respectivas masas corporales, se observa que los músculos maseteros de las hembras son significativamente más grandes en relación al tamaño del animal que los de los machos (Figura 6C).

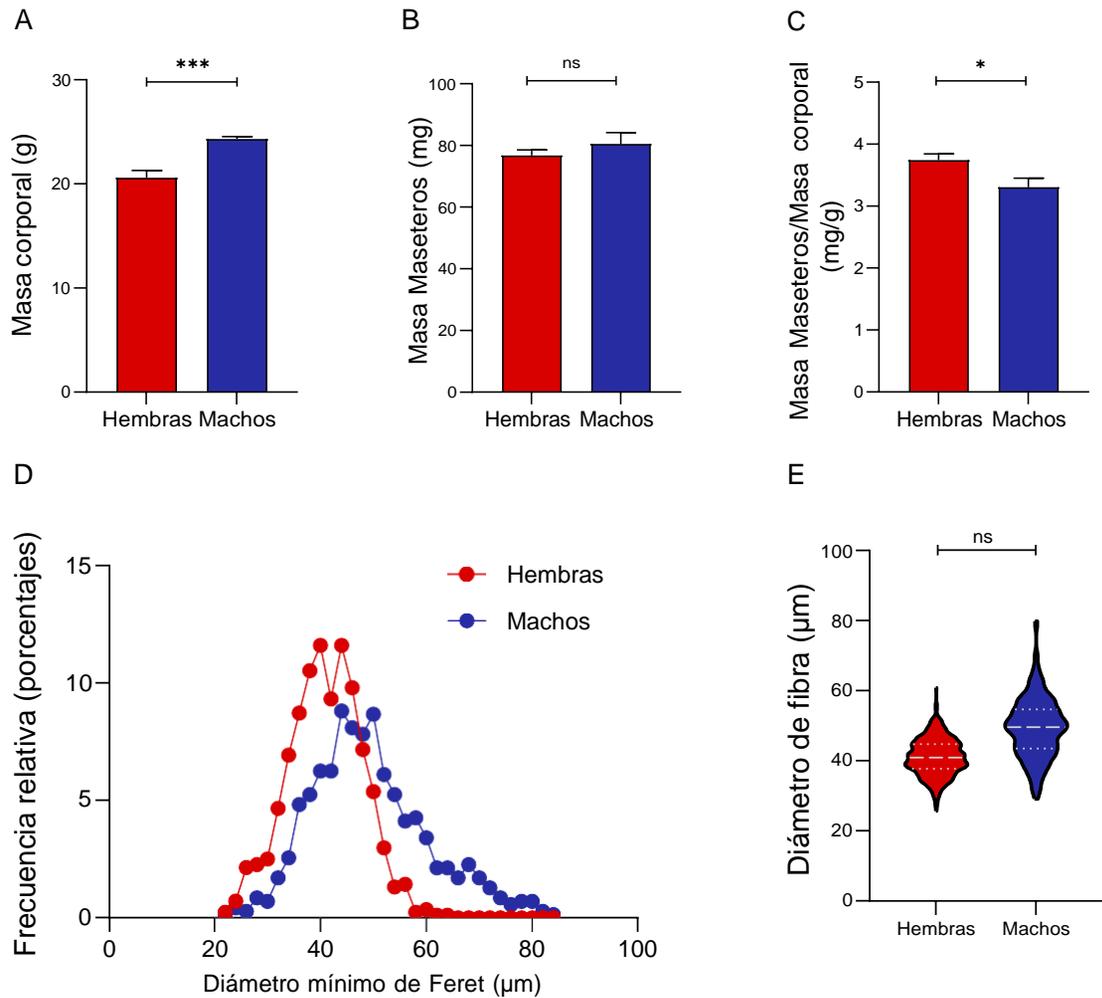


Figura 6. Comparación de masa corporal, masa de músculos maseteros y diámetro de fibras de músculo masetero entre ratones hembras y machos no intervenidos. Se compararon los parámetros físicos e histológicos de ratones BALB/c hembras y machos de 9 semanas, sin intervención. (A) Masa corporal. (B) Masa de músculos maseteros. (C) Masa de músculos maseteros normalizada por masa corporal. n=6 animales por sexo. Datos expresados como promedio \pm SEM. Test t no pareado, ns: no significativo; *: $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. (D-E) Los músculos fueron diseccionados y se realizaron criocortes para analizar el diámetro de las fibras musculares. (D) Histograma de distribución del porcentaje de fibras; muestra la frecuencia de fibras musculares de hembras y machos a los distintos diámetros. (E) Análisis anidado de la distribución de fibras de acuerdo a su diámetro mínimo de Feret. Los valores se presentan como mediana (línea discontinua) y cuartiles (línea de puntos). ns: no significativo. Test de t anidado. El histograma (D) y el t-test anidado (E) fueron obtenidos evaluando el diámetro mínimo de Feret de fibras únicas (3 fotos diferentes por animal, 250-500 fibras por masetero; n=3 hembras y n=3 machos).

Se evaluó el diámetro de Feret de las fibras musculares de músculos maseteros de ratones hembras y machos no intervenidos, lo que se representa como un histograma que indica el porcentaje de fibras que presenta cierto diámetro (Figura 6D). Del histograma se desprende que las hembras tienen una tendencia a tener fibras de menor diámetro que los machos, lo que se manifiesta como un corrimiento de la curva hacia la izquierda. Sin embargo, al evaluar el diámetro promedio de las fibras musculares, y analizarlo mediante un test anidado, no se observan diferencias significativas entre machos y hembras (Figura 6E).

Pese a que el músculo de las hembras parece ser más grande respecto del tamaño corporal, el diámetro de fibras entre hembras y machos no es significativamente diferente, e incluso tiende a ser menor en hembras en comparación a machos.

6.2 Efecto de la inyección de BoNTA en la masa corporal y masa de musculo masetero de ratones hembras y machos

Para evaluar si la inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero afectaba la ingesta de alimento, se utilizó como indicador el registro de masa corporal previo a la inyección (“inicial”) e inmediatamente posterior a la eutanasia (“final”). Esto se comparó con los indicadores registrados para animales no intervenidos incorporados en los grupos de estudio.

El tratamiento unilateral con BoNTA en el músculo masetero generó una leve disminución en la masa corporal de las hembras a los 2, 7 y 14 días post intervención, siendo más acentuada a los 2 días post intervención y tendiendo a revertir a lo largo de los días (Figura 7A). En el caso de los machos, sólo se observó una disminución significativa de la masa corporal a los 2 días post intervención (Figura 7B).

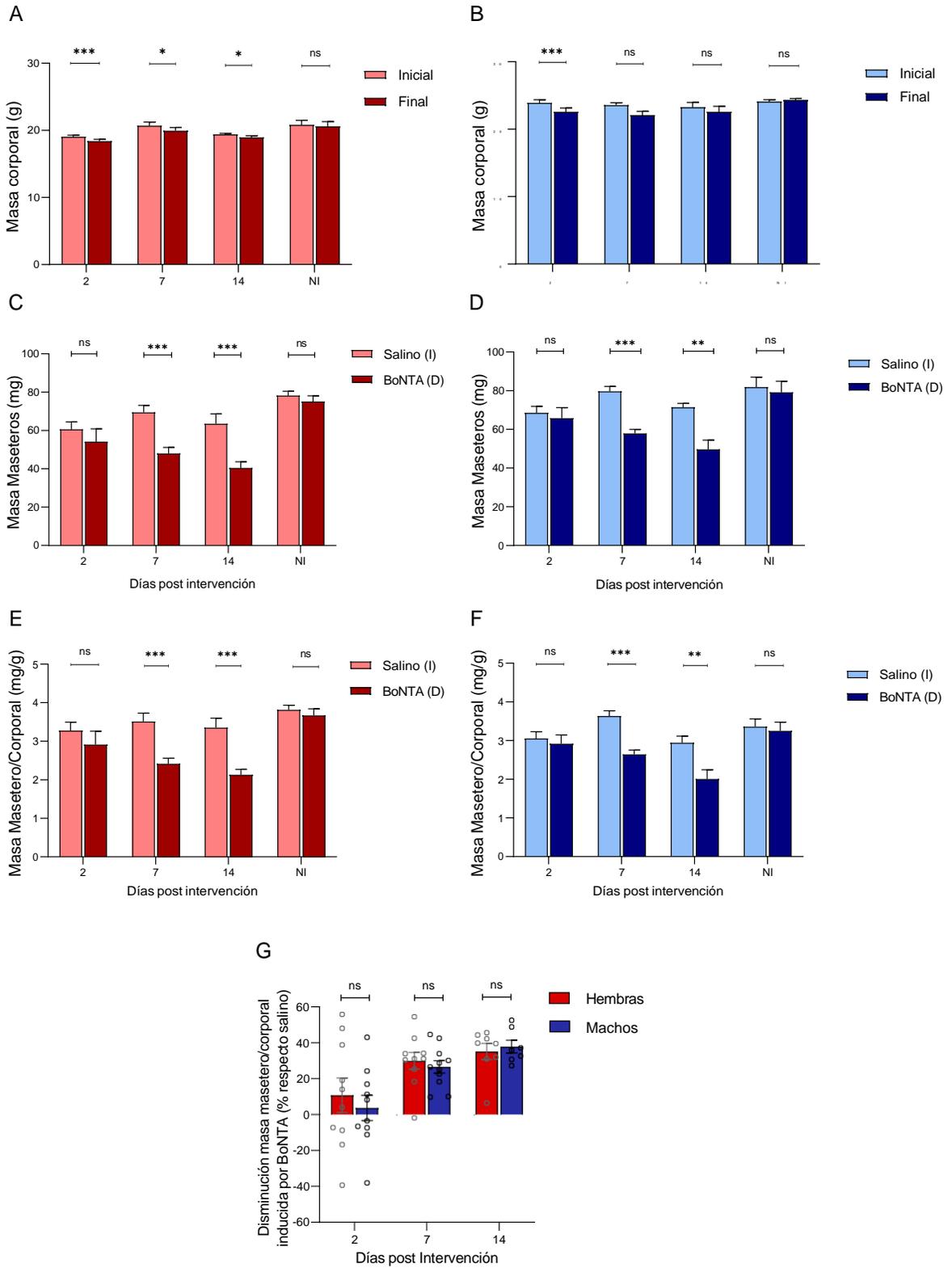


Figura 7. (Página anterior) Efecto del tratamiento unilateral con BoNTA a diferentes días en la masa corporal y la masa del músculo masetero en ratones hembras y machos. (A-B) Comparación de la masa corporal previa a la inyección única de BoNTA/Salino (“Inicial”) e inmediatamente posterior a la eutanasia (“Final”) a diferentes días post intervención en ratones hembras (A) y machos (B). (C-D) Comparación de la masa del músculo masetero inyectado con solución salina y su contralateral inyectado con BoNTA, a diferentes días post intervención en ratones hembras (C) y machos (D). (E-F) Comparación de masa de músculo maseteros normalizada con su masa corporal correspondiente. Para C-D-E-F, NI corresponde a animales no intervenidos, en que las barras claras son el músculo masetero izquierdo y las barras oscuras el músculo masetero derecho. (G) Comparación de la disminución de masa masetero/corporal inducida por BoNTA respecto de su lado contralateral inyectado con salino, en los distintos tiempos entre hembras y machos. Datos expresados como promedio \pm SEM. $n=6-11$; *test de t pareado* (A-F; *mismos animales, masa inicial/final, lado salino vs BoNTA a cada tiempo post intervención*); *test t no pareado* (G, *ratones hembras vs machos a cada tiempo post intervención*), *: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$; ns: *no significativo*. NI: *no intervenido*.

Al comparar la masa del músculo masetero inyectado con BoNTA, con el musculo masetero inyectado con solución salina (derecho e izquierdo, respectivamente) se detectó en hembras y machos una disminución significativa a los 7 y 14 días post intervención, siendo esta última levemente más acentuada en hembras (36% reducción, $p<0,001$) que en machos (32% reducción, $p<0,01$) (Figura 7C y 7D). Lo mismo ocurre al normalizar la masa de músculos maseteros con la masa corporal, donde en hembras hay un 31% de reducción a los 7 días y 36% a los 14 días (Figura 7E). En el caso de los machos, la reducción de masa del lado inyectado con BoNTA fue de un 27% a los 7 días y 32% a los 14 días (Figura 7F).

Finalmente se compara el porcentaje de reducción de masa masetero/masa corporal inducida por BoNTA en hembras y machos (Figura 7G). Pese a que parece haber una tendencia de mayor pérdida de masa inducida por BoNTA luego de 2d en hembras que en machos, los resultados no son significativos a ninguna de las temporalidades estudiadas.

6.3 Efecto de la parálisis inducida por BoNTA en la expresión relativa de genes de atrofia y regeneración muscular en ratones hembras y machos

Para evaluar si existe dimorfismo sexual en el efecto de la inyección unilateral de BoNTA en el músculo masetero en la expresión de marcadores moleculares de atrofia muscular, se cuantificaron los niveles de expresión relativa de ARNm de *Atrogin-1*, *MuRF-1* y *Miogenina* de ratones hembras y machos a los 2, 7 y 14 días post intervención, además de ratones no intervenidos. Para obtener los resultados, los valores fueron normalizados respecto al promedio de los animales no intervenidos (masetero izquierdo/derecho) tanto en hembras como en machos.

Para la representación y discusión de datos, en cada figura se muestra: un gráfico pareado por cada sexo que une con una línea los lados izquierdos (salino) y derechos (BoNTA) de cada individuo; un gráfico de barra por cada sexo, que muestran el promedio \pm desviación estándar de cada medición, junto con la significancia estadística de las diferencias; y un gráfico del porcentaje de cambio de cada parámetro (aumento o disminución en lado BoNTA respecto de cada lado salino), comparando hembras y machos para cada tiempo.

Los resultados del gen *Atrogin-1* fueron similares entre hembras y machos (Figura 8 A y B). Se observa un gran aumento de expresión a los 2-7 días post inyección de BoNTA, que se reduce a los 14d (Figura 8 A-D). Pese a que en los gráficos de la figura 8 C-D parece que hubiese un mayor aumento de *Atrogin-1* a los 2 y 14d en hembras que en machos, cuando se expresa como porcentaje de aumento respecto de su lado salino no se observan diferencias significativas entre sexos a ninguna temporalidad (Figura 8E).

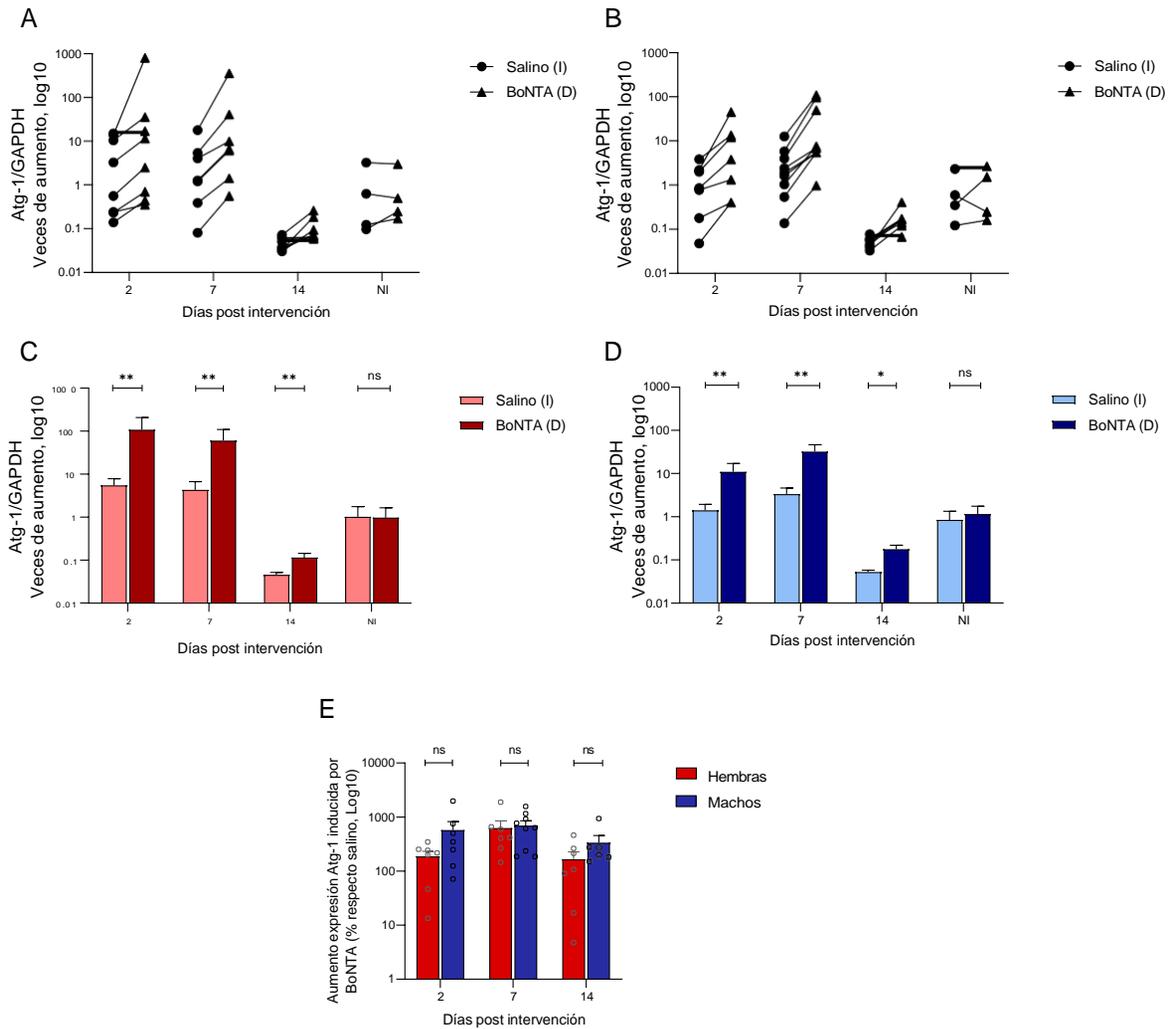


Figura 8. La inyección unilateral de BoNTA aumenta expresión del marcador de atrofia muscular Atrogin-1 en magnitudes semejantes en hembras y machos. Ratones hembras o machos fueron inyectados con BoNTA en el músculo masetero derecho y solución salina en músculo masetero izquierdo. Los animales se eutanasiaron a distintos tiempos post intervención (2-7-14 días) y no intervenidos. Los músculos se diseccionaron y procesaron para cuantificar los niveles relativos de expresión de ARNm del gen *Atrogin-1* (*Atg-1*) mediante qRT-PCR. Se utilizó GAPDH como normalizador. Se muestra la cuantificación del gen expresado en veces de aumento (escala logarítmica) en hembras (A-C) y en machos (B-D). Los gráficos A-B comparan la expresión relativa a Atrogin-1 en músculos contralaterales de cada individuo (lado salino, círculos vs lado BoNTA, triángulos); los dos lados de un mismo animal se muestran unidos por una línea. Los gráficos C-D corresponden a la representación del promedio \pm SEM de los valores de todos los individuos mostrados en A-B. (E) Comparación del porcentaje de aumento de expresión de gen *Atrogin-1* inducido por BoNTA en los distintos tiempos entre hembras y machos. $n=8-11$; *test de t pareado* (C-D; mismos animales, lado salino vs BoNTA a cada tiempo post intervención); *test t no pareado* (E, ratones hembras vs machos a cada tiempo post intervención), *: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ns: no significativo. NI: no intervenido.

El análisis de *MuRF-1* muestra resultados similares entre hembras y machos (Figura 9). Hembras y machos presentan un aumento significativo desde los 2 días post inyección de BoNTA en músculo masetero derecho, en comparación al lado contralateral. Al igual que en el caso de *Atrogin*, el aumento ocurre mayormente a tiempos tempranos (2-7 días post intervención) y se reduce luego de 14 días (Figura 9 A-D). El análisis de porcentaje de cambio del lado inyectado con BoNTA respecto del lado inyectado con solución salina muestra que no existen diferencias significativas entre sexos a ninguna de las temporalidades evaluadas (Figura 9E).

Por último, el análisis de expresión relativa del gen de *Miogenina* muestra un aumento significativo en el lado inyectado con BoNTA a las tres temporalidades estudiadas, tanto en machos como en hembras (Figura 10 A-D). Pese a que el aumento parece ser mayor en hembras a los 2 días, no hay diferencia significativa entre sexos a ninguno de los tiempos evaluados (Figura 10E).

Es importante destacar que en el caso de los animales no intervenidos, la expresión de los genes de atrofia fue equivalente en los maseteros izquierdos y derechos (Figuras 8-9-10).

6.4 Efecto de la parálisis inducida por BoNTA en el diámetro de fibras musculares en ratones hembras y machos

Para evaluar si existe dimorfismo sexual en el efecto de la inyección unilateral de BoNTA en el músculo masetero en marcadores histológicos de atrofia muscular, se evaluó el diámetro de las fibras musculares en cortes transversales de músculo de ratones hembras (Figura 11) y machos (Figura 12). Se muestran cortes representativos de músculo masetero inyectado con solución salina, o su contralateral inyectado con BoNTA, a los 2d (Figura 11A y 12A), 7d (Figura 11B y 12B) o 14d (Figura 11C y 12C) post intervención. En las imágenes el límite celular

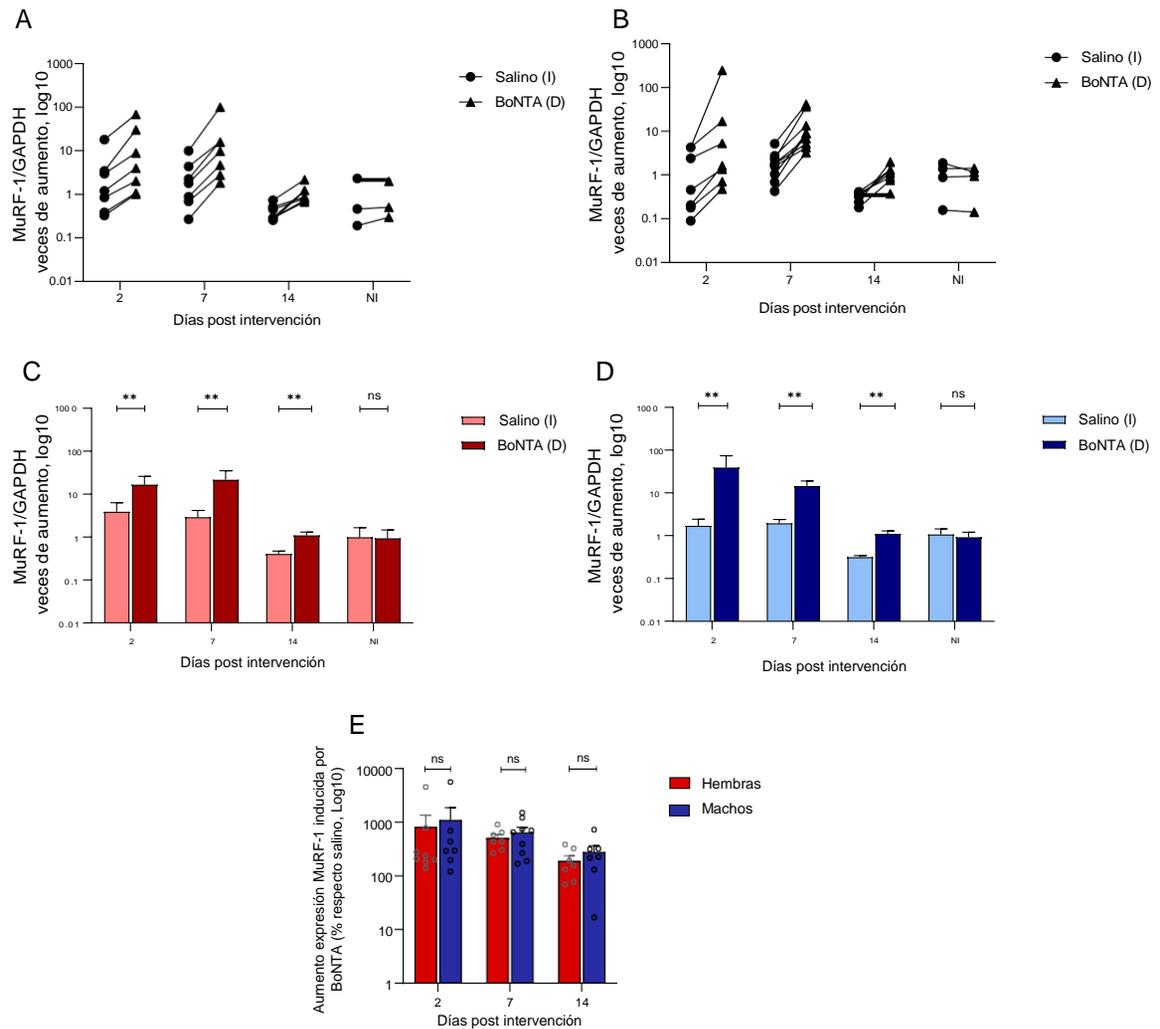


Figura 9. La inyección unilateral de BoNTA aumenta expresión del marcador de atrofia muscular MuRF-1 en magnitudes semejantes hembras y machos. Ratones hembras o machos fueron inyectados con BoNTA en el músculo masetero derecho y solución salina en músculo masetero izquierdo. Los animales se eutanasiaron a distintos tiempos post intervención (2-7-14 días) y no intervenidos. Los músculos se diseccionaron y procesaron para cuantificar los niveles relativos de expresión de ARNm del gen *MuRF-1* mediante qRT-PCR. Se utilizó GAPDH como normalizador. Se muestra la cuantificación de gen expresado en veces de aumento (escala logarítmica) en hembras (A-C) y en machos (B-D). Los gráficos A-B comparan la expresión relativa a MuRF-1 en músculos contralaterales de cada individuo (lado salino, círculos vs lado BoNTA, triángulos); los dos lados de un mismo animal se muestran unidos por una línea. Los gráficos C-D corresponden a la representación del promedio \pm SEM de los valores de todos los individuos mostrados en A-B. (E) Comparación del porcentaje de aumento de expresión de gen *MuRF-1* inducido por BoNTA en los distintos tiempos entre hembras y machos. $n=8-11$; test de *t* pareado (C-D; mismos animales, lado salino vs BoNTA a cada tiempo post intervención); test *t* no pareado (E, ratones hembras vs machos a cada tiempo post intervención), *: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ns: no significativo. NI: no intervenido.

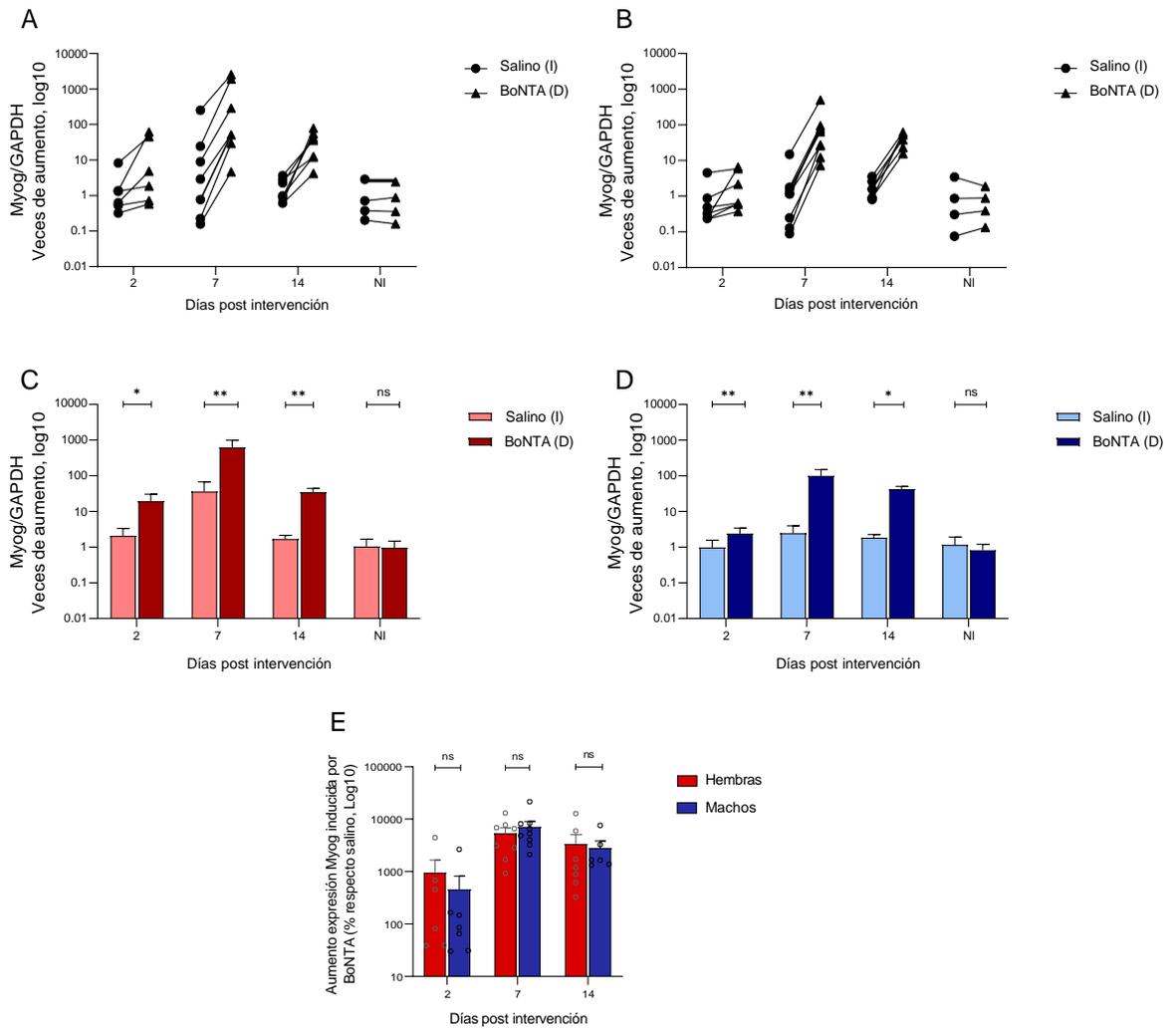


Figura 10. La inyección unilateral de BoNTA aumenta expresión del marcador de atrofia muscular Miogenina en magnitudes semejantes en hembras y machos. Ratones hembras o machos fueron inyectados con BoNTA en el músculo masetero derecho y solución salina en músculo masetero izquierdo. Los animales se eutanasiaron a distintos tiempos post intervención (2-7-14 días) y no intervenidos. Los músculos se diseccionaron y procesaron para cuantificar los niveles relativos de expresión de ARNm del gen *Miogenina* (*Myog*) mediante qRT-PCR. Se utilizó GAPDH como normalizador. Se muestra la cuantificación de gen expresado en veces de aumento (escala logarítmica) en hembras (A-C) y en machos (B-D). Los gráficos A-B comparan la expresión relativa a Miogenina en músculos contralaterales de cada individuo (lado salino, círculos vs lado BoNTA, triángulos); los dos lados de un mismo animal se muestran unidos por una línea. Los gráficos C-D corresponden a la representación del promedio \pm SEM de los valores de todos los individuos mostrados en A-B. (E) Comparación del porcentaje de aumento de expresión de gen *Miogenina* inducido por BoNTA en los distintos tiempos entre hembras y machos. $n=8-11$; test de *t* pareado (C-D; mismos animales, lado salino vs BoNTA a cada tiempo post intervención); test *t* no pareado (E, ratones hembras vs machos a cada tiempo post intervención), *: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ns: no significativo. NI: no intervenido.

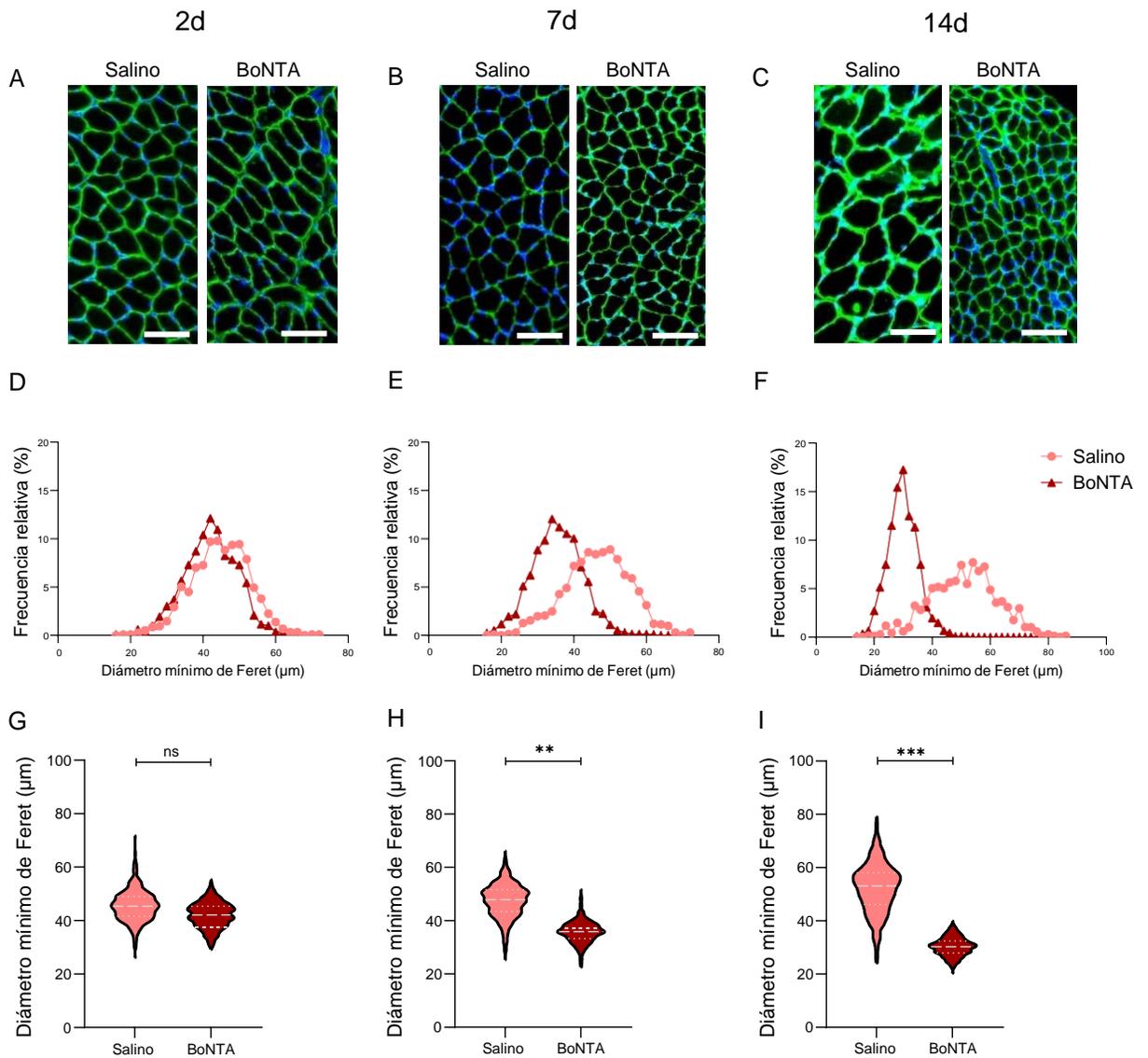


Figura 11. Diámetro de fibras musculares disminuye gradualmente a los 2, 7 y 14 días post inyección de BoNTA en músculo masetero en ratones hembras. Ratones hembras fueron inyectados con BoNTA en el músculo masetero derecho y solución salina en músculo masetero izquierdo. Los animales se eutanasiaron a distintos tiempos post intervención (2-7-14 días). Los músculos se diseccionaron y congelaron, para realizar criocortes transversales de 10 μm . Se realizó inmunofluorescencia indirecta para marcar límites celulares con un anticuerpo anti-caveolina3 (verde) y se tiñeron los núcleos con Hoescht (azul). Se adquirieron imágenes por microscopía de epifluorescencia. A-C: Imágenes representativas de las inmunofluorescencias de músculos maseteros inyectados con solución salina o BoNTA, a los 2d (A), 7d (B) o 14d (C) post intervención. Barra de escala: 100 μm . D-F: Histogramas de distribución del porcentaje de fibras en hembras muestra la frecuencia de diámetro de fibras musculares comparando músculos inyectados con solución salina y músculos inyectados con BoNTA, a distintos días post intervención. G-I: Gráficos anidados de la distribución del diámetro de fibras en hembras a distintos días post intervención.

Gráficos anidados: Los valores se presentan como mediana (línea discontinua) y cuartiles (línea de puntos). $n=3$. *Test t anidado*. ns: no significativo; *: $p<0,05$; **: $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Los histogramas (C-D) y test t anidados (E-F) fueron obtenidos evaluando el diámetro mínimo de Feret de fibras únicas (300-600 fibras por masetero), $n=3$ hembras.

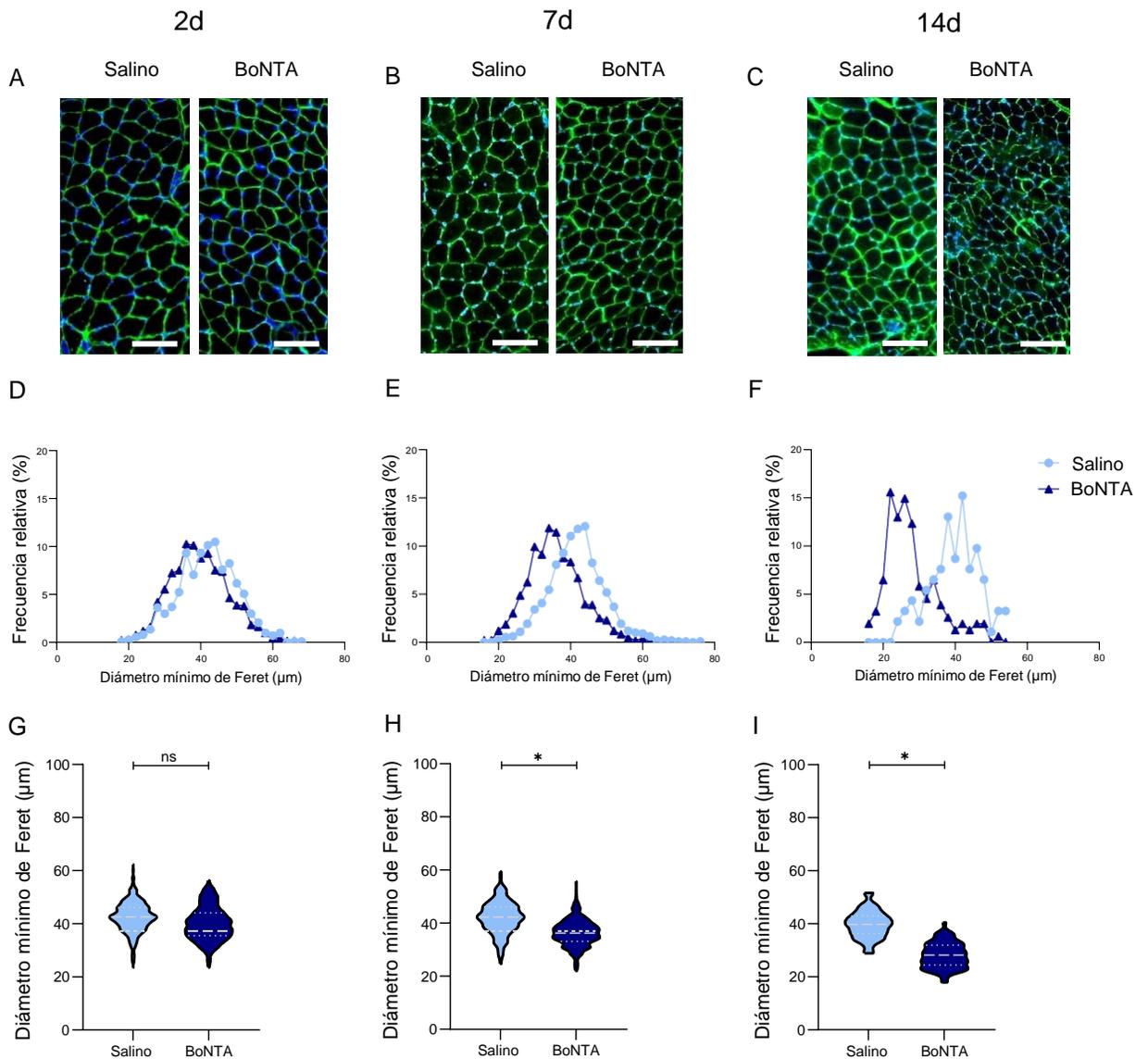


Figura 12. Diámetro de fibras musculares disminuye gradualmente a los 2, 7 y 14 días post inyección de BoNTA en músculo masetero en ratones machos. Ratones machos fueron inyectados con BoNTA en el músculo masetero derecho y solución salina en músculo masetero izquierdo. Los animales se eutanasiaron a distintos tiempos post intervención (2-7-14 días). Los músculos se diseccionaron y congelaron, para realizar criocortes transversales de 10 μm . Se realizó inmunofluorescencia indirecta para marcar límites celulares con un anticuerpo anti-caveolina3 (verde) y se tiñeron los núcleos con Hoescht (azul). Se adquirieron imágenes por microscopía de epifluorescencia. A-C: Imágenes representativas de las inmunofluorescencias de músculos maseteros inyectados con solución salina o BoNTA, a los 2d (A), 7d (B) o 14d (C) post intervención. Barra de escala: 100 μm . D-F: Histogramas de distribución del porcentaje de fibras en machos muestra la frecuencia de diámetro de fibras musculares comparando músculos inyectados con solución salina y músculos inyectados con BoNTA, a distintos días post intervención. G-I: Gráficos anidados de la distribución del diámetro de fibras en machos a distintos días post intervención.

Gráficos anidados: Los valores se presentan como mediana (línea discontinua) y cuartiles (línea de puntos). $n=3$. *Test t anidado*. ns: no significativo; *: $p < 0,05$.

Los histogramas (C-D) y test t anidados (E-F) fueron obtenidos evaluando el diámetro mínimo de Feret de fibras únicas (300-600 fibras por masetero), $n=3$ machos.

se detecta como marca fluorescente de la proteína Caveolina3 (verde), y los núcleos se distinguen como tinción azul con el reactivo de Hoechst. Las imágenes salino-BoNTA en cada caso corresponden a lados contralaterales de un mismo animal, y se aprecia claramente como el diámetro de las fibras musculares va disminuyendo en el lado inyectado con BoNTA a medida que pasa el tiempo post intervención, tanto en hembras como en machos. Para evaluar cuantitativamente tal efecto, se determinó el diámetro mínimo de Feret de las fibras musculares. Para esto, se utilizaron muestras de 3 animales por cada condición, y de cada músculo se cuantificó el diámetro de las fibras en tres imágenes diferentes. Al representar dichos datos como histogramas de frecuencia de fibras de acuerdo a su diámetro, se observa que la curva de músculos inyectados con BoNTA se va desplazando secuencialmente hacia diámetros menores a medida que avanzan los días post intervención, tanto en hembras (Figura 11 D-F) como en machos (Figura 12 D-F). La disminución del diámetro promedio de las fibras queda demostrada con las gráficas de violín y test estadísticos anidados, que muestran una disminución significativa del diámetro del lado BoNTA respecto del lado salino a los 7 y 14d post intervención, tanto en hembras (Figura 11 G-I) como en machos (Figura 12 G-I). En ambas temporalidades, el nivel de significancia de la diferencia estadística fue mayor en hembras que en machos.

6.5 Efecto de la parálisis inducida por BoNTA en el diámetro de fibras de músculo contralateral inyectado con solución salina en ratones hembras y machos

Adicionalmente a evaluar el efecto de BoNTA sobre el músculo masetero, se determinó qué le ocurre al diámetro de fibras musculares del músculo contralateral, inyectado con solución salina, con el paso de los días post intervención, en hembras y machos (Figura 13).

Se observó que a mayor tiempo post intervención, hay un efecto diferencial en el masetero inyectado con solución salina (contralateral al lado BoNTA) de

hembras y machos, al compararlos con músculos de ratones no intervenidos de su mismo sexo y edad. Al evaluar los histogramas de frecuencia de fibras de acuerdo a su diámetro, se observó que en hembras a medida que pasan los días post intervención se observa un corrimiento secuencial hacia el lado derecho; es decir, aumenta la frecuencia de fibras de mayor diámetro (Figura 13A). En cambio, en machos existe un corrimiento de las curvas hacia la izquierda a lo largo de los días, hacia diámetros menores (Figura 13B). Lo anterior se ve reforzado cuando se realiza el análisis estadístico anidado de los diámetros de fibras de cada muestra, en que se detecta un aumento significativo del diámetro promedio de las fibras a los 14d post intervención en hembras (Figura 13C) y una disminución significativa del diámetro de fibras a la misma temporalidad en machos (Figura 13D), respecto de músculos maseteros de animales no intervenidos.

7. DISCUSIÓN

El presente trabajo aborda por primera vez el dimorfismo sexual en la atrofia de músculo masetero de ratón inducida por inyección unilateral de BoNTA. Interesantemente, no se observan diferencias en la inducción de atrofia por BoNTA en machos y hembras. Sin embargo, sí se encuentran diferencias significativas en la adaptación del músculo contralateral inyectado con solución salina. Mientras que en ratones hembra muestra aumentos de diámetro de fibras que sugieren hipertrofia, en ratones macho disminuye secuencialmente el diámetro de fibras musculares, sugiriendo un fenómeno de atrofia.

7.1 Caracterización por sexo de masa corporal y maseterina en ratones BALB/c hembras y machos sin intervenir

La primera etapa fue caracterizar los parámetros de masa corporal y masa de maseteros de los ratones hembras y machos.

En los ratones no intervenidos, se encontró que las hembras tienen una menor masa corporal en comparación a los machos de la misma especie y edad. Al comparar la masa de músculos maseteros se observó que los valores son similares, siendo ligeramente menores en hembras que en machos. Sin embargo, al normalizar la masa muscular de los maseteros respecto a la masa corporal correspondiente, se encontró que las hembras tienen valores mayores, lo que puede indicar una mayor fuerza de mordida relativa a su tamaño. Un estudio previo en músculo masetero de humanos encontró que el tono muscular es mayor en hombres que en mujeres, sugiriendo que esto puede deberse a efectos hormonales, como la testosterona, principal hormona masculina, que influye directamente en la masa muscular (Ramazanoglu et al., 2021). No se comparó, sin embargo, el tamaño del músculo masetero y su relación con las dimensiones corporales. Cabe mencionar que el tamaño muscular no siempre se relaciona con la fuerza ejercida por el músculo (Loenneke et al., 2019; Riviati & Indra, 2023; Wang et al., 2021), ya que podría estar variando el tipo de fibras musculares, que es lo que se relaciona directamente con la función. Interesantemente, en el presente trabajo evaluamos el diámetro de fibras de músculos maseteros de ratones no intervenidos, y encontramos que las hembras (diámetro promedio de 40,9 μm) presentan diámetros menores que las de machos (diámetro promedio de 49,3 μm), lo que se ve reflejado en un claro corrimiento en el histograma de frecuencia de fibras hacia menores diámetros en hembras. Por lo tanto, es posible que las hembras tengan un tipo de fibra distinta que los machos en el músculo masetero, ya sea globalmente o en alguna de sus zonas. Esto requeriría de estudios adicionales para su comprobación. Estudios previos han descrito que el área de sección transversal de todo el músculo en las mujeres es del 60% al 70% de la de los hombres (Nuzzo, 2024).

7.2 Efecto de inyección unilateral de BoNTA en masa corporal y de músculos maseteros de ratones BALB/c hembras y machos

En el presente trabajo se evaluó si el tratamiento con BoNTA afecta la masa corporal de los ratones, comparando este parámetro al inicio del tratamiento (día de inyección unilateral de BoNTA) con su valor al final del tratamiento (día de eutanasia y toma de muestras: 2, 7 o 14d). El resultado muestra que tanto en hembras como en machos luego de 2d de inyección de BoNTA hay una leve pero significativa reducción de peso, entre 3-5% del peso corporal total. Esto puede deberse a que el procedimiento o la parálisis maseterina afecta la capacidad de alimentación de los ratones. Esta disminución significativa del peso se mantiene en hembras a los 7 y 14d post intervención, pero en machos se torna no significativa en esas temporalidades. De todas formas, una disminución menor al 5% del peso corporal total en un procedimiento es considerada inocua y sin significancia biológica, de acuerdo con la escala de bienestar animal de Morton y Griffiths (Morton & Griffiths, 1985). En un estudio con conejos, se encontró que al realizar una inyección bilateral de BoNTA en los músculos maseteros se afecta la alimentación de los animales provocando una baja de un 12% de su masa corporal (Liu et al., 2023). Sin embargo, es distinto paralizar el músculo masetero unilateral que bilateralmente.

Estudios previos de nuestro laboratorio habían evaluado el efecto de la inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero luego de 14 días, exclusivamente en ratones macho. En esas condiciones se reportó que la inyección de BoNTA disminuye significativamente la masa y volumen del músculo masetero, respecto del músculo contralateral inyectado con BoNTA. Paralelamente, no se encontraron diferencias en la masa de músculos maseteros inyectados con solución salina, respecto de músculos maseteros sin intervención (Balanta-Melo et al., 2023; Balanta-Melo et al., 2018; Balanta-Melo et al., 2019). El gran aporte de este trabajo es haber comparado no sólo temporalidades más tempranas, sino el efecto en machos y hembras. En ese contexto, se reporta en el

presente estudio que la inyección de BoNTA en músculo masetero reduce significativamente su masa a partir de los 7 días post intervención, sin diferencias en la magnitud del cambio entre machos y hembras.

7.3 Inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero promueve niveles equivalentes de atrofia muscular en ratones BALB/c hembras y machos

Atrogin-1 y MuRF-1 son ligasas de la vía de degradación UPS que son altamente expresadas durante la atrofia muscular (Bodine et al., 2001; Gomes et al., 2001). La Miogenina es conocida por su papel en la formación de fibras musculares; específicamente, participa en la diferenciación de mioblastos durante el desarrollo embrionario. Posterior al nacimiento su expresión disminuye ya que es inhibida por la inervación muscular (Macpherson et al., 2011; Moresi et al., 2010). Un estudio en ratones adultos concluyó que la Miogenina es un mediador que contribuye a la atrofia muscular inducida por denervación, en parte, por la activación del gen Atrogin-1 (Macpherson et al., 2011). Además, se sobreexpresa en denervación de músculo esquelético humano (Chen et al., 2011). Similar a la denervación, el mecanismo de acción de BoNTA bloquea el impulso nervioso en la unión neuromuscular, provocando una parálisis muscular reversible (Pirazzini et al., 2017).

Previos trabajos de nuestro grupo determinaron que los marcadores moleculares de atrofia y regeneración muscular Atrogin-1, MuRF y Miogenina tienen un aumento significativo a 2, 7 y 14 días posterior a la inyección unilateral de BoNTA en ratones machos. Además, se observó que la expresión génica de Atrogin-1 y MuRF tienden a aumentar en menor magnitud a los 14 días (Balanta-Melo et al., 2023).

En el presente trabajo, se observó un patrón similar; a los 2 y 7 días post intervención aumenta la expresión de *Atrogin-1*, *MuRF-1* y *Miogenina* en

magnitudes similares en hembras y machos. A los 14 días aumentan en menor magnitud en ambos sexos.

Para comparar el nivel de aumento de marcadores de atrofia y regeneración entre hembras y machos, se analizó el porcentaje de cambio de expresión de cada uno de los genes del lado tratado (BoNTA) contra el lado no tratado (solución salina). En ninguno de los tres marcadores analizados se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de cambio entre hembras y machos, lo que sugiere que ambos son afectados de manera similar a nivel molecular.

Un estudio previo de nuestro grupo encontró que la inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero de ratones machos aumenta la expresión génica de marcadores de atrofia y regeneración no sólo en el músculo masetero intervenido, sino también en músculos agonistas ipsilaterales (músculo temporal y pterigoideo medial) (Balanta-Melo et al., 2023). Esto podría deberse a una comunicación bioquímica de los músculos mediante de moléculas secretadas, o a compensaciones biomecánicas por carga y descarga.

Para evaluar el efecto morfológico de la inyección de BoNTA en los músculos, se cuantificó el diámetro mínimo de Feret de las fibras de músculos maseteros de hembras y machos a los 2, 7 y 14 días, donde se comparó el lado tratado (BoNTA) vs el lado no tratado (solución salina). Se detectó que existe una disminución progresiva del diámetro de fibras del músculo inyectado con BoNTA desde 2 días post intervención, con una diferencia significativa a los 7 y 14 días para hembras y machos. Esta disminución en el diámetro de fibras alcanzó mayor significancia estadística en hembras, en las que además se nota un mayor corrimiento en las curvas de los histogramas de diámetros de fibras entre los lados salino y BoNTA. De manera similar, estudios previos en ratas encontraron que posterior a 7 días de descarga los músculos de extremidades de hembras tienen mayor reducción del área de sección transversal en comparación a los machos (Yoshihara et al., 2019).

Interesantemente, donde sí se encontró una diferencia entre sexos fue con la adaptación del músculo inyectado con solución salina, contralateral al músculo paralizado con BoNTA. Al evaluar el diámetro de fibras de músculos maseteros inyectados con solución salina a distintos días post intervención, se encontró una disminución progresiva del diámetro en animales machos, que a los 14d es significativa respecto de fibras de músculos maseteros sin intervención. Esto sugiere que podría existir cierto grado de atrofia muscular incluso en el músculo contralateral a la inyección de BoNTA. En hembras, en cambio, se observa el fenómeno opuesto, en que el diámetro de las fibras del músculo masetero contralateral a la inyección de BoNTA aumenta progresivamente, siendo significativo a los 14d respecto del músculos sin intervención. Esto sería un posible indicador de hipertrofia, que podría ocurrir de manera compensatoria para suplir la función del músculo masetero paralizado por BoNTA. Un estudio previo en conejos hembras, encontró que posterior a la inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero existía un aumento de diámetro de fibras en el músculo contralateral no inyectado, y que además tenían mayor masa muscular que músculos de animales control no intervenidos (Baldwin et al., 2022). Esta hipertrofia muscular puede deberse a una compensación del lado contralateral inyectado con BoNTA. Es importante mencionar que, para hablar directamente de atrofia e hipertrofia muscular, es necesario un trabajo más detallado en el que evalúen marcadores moleculares de estas vías. Adicionalmente, al analizar la expresión de *Miogenina* en el músculo masetero inyectado con solución salina de hembras y machos, se observa que mientras que en machos no hay cambios, en hembras hay un aumento de expresión a los 7d en comparación a músculos no intervenidos. Este puede deberse a la activación de células satélite de las fibras musculares en respuesta a los estímulos hipertróficos, las que a su vez producen un aumento de expresión de *Miogenina* (Manzano et al., 2011; Saliu et al., 2024).

Un estudio en ratones hembra y machos adultos en músculos de extremidades encontró que las hembras tienen una programación catabólica exacerbada y represión anabólica en respuesta a la atrofia por desuso, lo que

parece corresponder a una mayor pérdida muscular en comparación a machos (Rosa-Caldwell et al., 2021). Cabe destacar que el papel hormonal tiene un rol fundamental en el musculo esquelético, ya que hombres y mujeres responden diferencialmente a procesos de desgaste muscular. La testosterona es una hormona masculina altamente estudiada en hombres y se ha visto que participa en el mantenimiento de masa muscular; sin embargo, los efectos en mujeres son mínimos o desconocidos (Anderson et al., 2017). Por otro lado, los estrógenos parecen tener un efecto protector en la preservación de masa y función muscular, aunque las vías moleculares aún son estudiadas. La predisposición a pérdida de masa muscular inducida por el desuso es más evidente en condiciones de deficiencia de estrógenos, como ocurre posterior al inicio de la menopausia (Anderson et al., 2017; McMillin et al., 2022).

8. CONCLUSION

Existe dimorfismo sexual en la estructura muscular de músculos maseteros de ratones BALB/c adultos hembras y machos. Las hembras presentan músculos maseteros más grandes en relación a su masa corporal en comparación a machos. Paralelamente, las hembras presentan diámetros de fibras musculares en masetero menores que en machos.

La inyección de BoNTA en músculo masetero aumenta progresivamente la expresión relativa de marcadores moleculares de atrofia muscular, sin diferencia entre machos y hembras. Sin embargo, a nivel histológico existe una disminución más significativa del diámetro de fibras a los 7 y 14 días post intervención en hembras.

El músculo masetero contralateral a la inyección de BoNTA se adapta diferencialmente de acuerdo al sexo. En hembras muestra signos de hipertrofia muscular y en machos de atrofia muscular.

9. ALCANCES Y PROYECCIONES

Este trabajo describe la diferencia a nivel molecular e histológico del músculo posterior a la inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero, comparando por primera vez machos y hembras.

Existe una adaptación diferencial en hembras y machos, donde en hembras se produce una hipertrofia del músculo contralateral no inyectado y en machos una atrofia muscular. Es necesario evaluar las vías de adaptación que se producen en hembras y machos durante la atrofia, y cómo la morfo-función y eje hormonal puede afectar a cada uno de ellos.

Es relevante estudiar si esto se replica en humanos, ya que son las mujeres quien se ven más afectadas por trastornos temporomandibulares y quienes mayormente se intervienen con BoNTA con fines clínicos y estéticos, en comparación a los hombres.

Si bien el presente trabajo se realizó en ratones jóvenes, sería interesante evaluar el efecto diferencial de BoNTA en animales hembras post menopaúsicos, considerando que el eje hormonal es distinto.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, S. E., Pollock, A. C., & Lamon, S. (2022). The effect of sex hormones on skeletal muscle adaptation in females. *Eur J Sport Sci*, 22(7), 1035-1045. <https://doi.org/10.1080/17461391.2021.1921854>
- Allergan. (2023). HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION. BOTOX® (onabotulinumtoxinA) for injection, for intramuscular, intradetrusor, or intradermal use. In U. S. F. a. D. Administration (Ed.).
- Anderson, L. J., Liu, H., & Garcia, J. M. (2017). Sex Differences in Muscle Wasting. *Adv Exp Med Biol*, 1043, 153-197. https://doi.org/10.1007/978-3-319-70178-3_9
- Balanta-Melo, J., Eyquem-Reyes, A., Blanco, N., Vásquez, W., Kupczik, K., Toro-Ibacache, V., & Buvinic, S. (2023). Unilateral Hypofunction of the Masseter Leads to Molecular and 3D Morphometric Signs of Atrophy in Ipsilateral Agonist Masticatory Muscles in Adult Mice. *Int J Mol Sci*, 24(19). <https://doi.org/10.3390/ijms241914740>
- Balanta-Melo, J., Toro-Ibacache, V., Torres-Quintana, M. A., Kupczik, K., Vega, C., Morales, C., Hernández-Moya, N., Arias-Calderón, M., Beato, C., & Buvinic, S. (2018). Early molecular response and microanatomical changes in the masseter muscle and mandibular head after botulinum toxin intervention in adult mice. *Ann Anat*, 216, 112-119. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2017.11.009>
- Balanta-Melo, J., Torres-Quintana, M. A., Bemmann, M., Vega, C., González, C., Kupczik, K., Toro-Ibacache, V., & Buvinic, S. (2019). Masseter muscle atrophy impairs bone quality of the mandibular condyle but not the alveolar process early after induction. *J Oral Rehabil*, 46(3), 233-241. <https://doi.org/10.1111/joor.12747>

- Baldwin, M. C., Liu, Z. J., Rafferty, K. L., Keith, A., Tamasas, B., Kaiyala, K., & Herring, S. W. (2022). Botulinum toxin in the masseter muscle: Lingering effects of denervation. *Anat Rec (Hoboken)*, 305(5), 1215-1230. <https://doi.org/10.1002/ar.24756>
- Blaauw, B., Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2013). Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. *Compr Physiol*, 3(4), 1645-1687. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130009>
- Bodine, S. C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V. K., Nunez, L., Clarke, B. A., Poueymirou, W. T., Panaro, F. J., Na, E., Dharmarajan, K., Pan, Z. Q., Valenzuela, D. M., DeChiara, T. M., Stitt, T. N., Yancopoulos, G. D., & Glass, D. J. (2001). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, 294(5547), 1704-1708. <https://doi.org/10.1126/science.1065874>
- Bustamante, M., Fernández-Verdejo, R., Jaimovich, E., & Buvinic, S. (2014). Electrical stimulation induces IL-6 in skeletal muscle through extracellular ATP by activating Ca(2+) signals and an IL-6 autocrine loop. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 306(8), E869-882. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00450.2013>
- Callahan, D. M., Bedrin, N. G., Subramanian, M., Berking, J., Ades, P. A., Toth, M. J., & Miller, M. S. (2014). Age-related structural alterations in human skeletal muscle fibers and mitochondria are sex specific: relationship to single-fiber function. *J Appl Physiol (1985)*, 116(12), 1582-1592. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01362.2013>
- Cecilia Cortés-Monroy, H., & Soledad Soza, B. (2014). Usos prácticos de la toxina botulínica en adultos en medicina física y rehabilitación [10.1016/S0716-8640(14)70033-1]. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(2), 225-236. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70033-1](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70033-1)

- Chen, L., Huang, H. W., Gu, S. H., Xu, L., Gu, Y. D., & Xu, J. G. (2011). The study of myogenin expression in denervated human skeletal muscles. *J Int Med Res*, 39(2), 378-387. <https://doi.org/10.1177/147323001103900205>
- Choudhury, S., Baker, M. R., Chatterjee, S., & Kumar, H. (2021). Botulinum Toxin: An Update on Pharmacology and Newer Products in Development. *Toxins (Basel)*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/toxins13010058>
- Church, J. E., Trieu, J., Sheorey, R., Chee, A. Y., Naim, T., Baum, D. M., Ryall, J. G., Gregorevic, P., & Lynch, G. S. (2014). Functional β -adrenoceptors are important for early muscle regeneration in mice through effects on myoblast proliferation and differentiation. *PLoS One*, 9(7), e101379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101379>
- Datta Gupta, A., Edwards, S., Smith, J., Snow, J., Visvanathan, R., Tucker, G., & Wilson, D. (2022). A Systematic Review and Meta-Analysis of Efficacy of Botulinum Toxin A for Neuropathic Pain. *Toxins (Basel)*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/toxins14010036>
- De la Torre Canales, G., Câmara-Souza, M. B., Ernberg, M., Al-Moraissi, E. A., Grigoriadis, A., Poluha, R. L., Christidis, M., Jasim, H., Lövgren, A., & Christidis, N. (2024). Botulinum Toxin-A for the Treatment of Myogenous Temporomandibular Disorders: An Umbrella Review of Systematic Reviews. *Drugs*, 84(7), 779-809. <https://doi.org/10.1007/s40265-024-02048-x>
- De Rossi, S. S., Greenberg, M. S., Liu, F., & Steinkeler, A. (2014). Temporomandibular disorders: evaluation and management. *Med Clin North Am*, 98(6), 1353-1384. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2014.08.009>
- Díaz Guzman, W., Lucía Guzmán, C., & Martín Ardila, C. (2012). Prevalencia y necesidad de tratamiento de trastornos temporomandibulares en una población Chilena. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 16, 602-609.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552012000500009&nrm=iso

- Ding, S., Dai, Q., Huang, H., Xu, Y., & Zhong, C. (2018). An Overview of Muscle Atrophy. *Adv Exp Med Biol*, 1088, 3-19. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1435-3_1
- Ebert, S. M., Al-Zougbi, A., Bodine, S. C., & Adams, C. M. (2019). Skeletal Muscle Atrophy: Discovery of Mechanisms and Potential Therapies. *Physiology (Bethesda)*, 34(4), 232-239. <https://doi.org/10.1152/physiol.00003.2019>
- Enns, D. L., & Tiidus, P. M. (2010). The influence of estrogen on skeletal muscle: sex matters. *Sports Med*, 40(1), 41-58. <https://doi.org/10.2165/11319760-000000000-00000>
- Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int*, 96(3), 183-195. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>
- Gao, Y., Arfat, Y., Wang, H., & Goswami, N. (2018). Muscle Atrophy Induced by Mechanical Unloading: Mechanisms and Potential Countermeasures. *Front Physiol*, 9, 235. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00235>
- Gomes, M. D., Lecker, S. H., Jagoe, R. T., Navon, A., & Goldberg, A. L. (2001). Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(25), 14440-14445. <https://doi.org/10.1073/pnas.251541198>
- Guerrero, L., Coronado, L., Maulén, M., Meeder, W., Henríquez, C., & Lovera, M. (2017). Prevalencia de trastornos temporomandibulares en la población adulta beneficiaria de Atención Primaria en Salud del Servicio de Salud Valparaíso, San Antonio. *Avances en Odontoestomatología*, 33, 113-120. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852017000300003&nrm=iso

- Haizlip, K. M., Harrison, B. C., & Leinwand, L. A. (2015). Sex-based differences in skeletal muscle kinetics and fiber-type composition. *Physiology (Bethesda)*, 30(1), 30-39. <https://doi.org/10.1152/physiol.00024.2014>
- Hughes, B. W., Kusner, L. L., & Kaminski, H. J. (2006). Molecular architecture of the neuromuscular junction. *Muscle Nerve*, 33(4), 445-461. <https://doi.org/10.1002/mus.20440>
- Isola, G., Anastasi, G. P., Matarese, G., Williams, R. C., Cutroneo, G., Bracco, P., & Piancino, M. G. (2018). Functional and molecular outcomes of the human masticatory muscles. *Oral Dis*, 24(8), 1428-1441. <https://doi.org/10.1111/odi.12806>
- ISP. (2021). BOTOX POLVO PARA SOLUCIÓN INYECTABLE 200 U (ONABOTULINUM TOXINA). In M. d. S. Instituto de Salud Pública, Gobierno de Chile (Ed.).
- Janes, L. E., Connor, L. M., Moradi, A., & Alghoul, M. (2021). Current Use of Cosmetic Toxins to Improve Facial Aesthetics. *Plast Reconstr Surg*, 147(4), 644e-657e. <https://doi.org/10.1097/prs.0000000000007762>
- Kün-Darbois, J. D., Libouban, H., & Chappard, D. (2015). Botulinum toxin in masticatory muscles of the adult rat induces bone loss at the condyle and alveolar regions of the mandible associated with a bone proliferation at a muscle entheses. *Bone*, 77, 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.03.023>
- la Fleur, P., & Adams, A. (2020). CADTH Rapid Response Reports. In *Botulinum Toxin for Temporomandibular Disorders: A Review of Clinical Effectiveness, Cost-Effectiveness, and Guidelines*. Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health

- Li, D. T. S., & Leung, Y. Y. (2021). Temporomandibular Disorders: Current Concepts and Controversies in Diagnosis and Management. *Diagnostics (Basel)*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/diagnostics11030459>
- Liu, F., & Steinkeler, A. (2013). Epidemiology, diagnosis, and treatment of temporomandibular disorders. *Dent Clin North Am*, 57(3), 465-479. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2013.04.006>
- Liu, Z. Z., Rafferty, K. L., Wang, D. B., Owart, B., & Herring, S. W. (2023). Bilateral treatment of the masseter with botulinum toxin: Consequences for mastication, muscle force and the mandibular condyle. *J Oral Rehabil*, 50(9), 775-781. <https://doi.org/10.1111/joor.13495>
- Loenneke, J. P., Buckner, S. L., Dankel, S. J., & Abe, T. (2019). Exercise-Induced Changes in Muscle Size do not Contribute to Exercise-Induced Changes in Muscle Strength. *Sports Medicine*, 49(7), 987-991. <https://doi.org/10.1007/s40279-019-01106-9>
- Macpherson, P. C., Wang, X., & Goldman, D. (2011). Myogenin regulates denervation-dependent muscle atrophy in mouse soleus muscle. *J Cell Biochem*, 112(8), 2149-2159. <https://doi.org/10.1002/jcb.23136>
- Manzano, R., Toivonen, J. M., Calvo, A. C., Miana-Mena, F. J., Zaragoza, P., Muñoz, M. J., Montarras, D., & Osta, R. (2011). Sex, fiber-type, and age dependent in vitro proliferation of mouse muscle satellite cells. *J Cell Biochem*, 112(10), 2825-2836. <https://doi.org/10.1002/jcb.23197>
- McFarlane, C., Plummer, E., Thomas, M., Hennebry, A., Ashby, M., Ling, N., Smith, H., Sharma, M., & Kambadur, R. (2006). Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol*, 209(2), 501-514. <https://doi.org/10.1002/jcp.20757>

- McMillin, S. L., Minchew, E. C., Lowe, D. A., & Spangenburg, E. E. (2022). Skeletal muscle wasting: the estrogen side of sexual dimorphism. *Am J Physiol Cell Physiol*, 322(1), C24-c37. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00333.2021>
- Meng, H., Janssen, P. M., Grange, R. W., Yang, L., Beggs, A. H., Swanson, L. C., Cossette, S. A., Frase, A., Childers, M. K., Granzier, H., Gussoni, E., & Lawlor, M. W. (2014). Tissue triage and freezing for models of skeletal muscle disease. *J Vis Exp*(89). <https://doi.org/10.3791/51586>
- Miller, J., & Clarkson, E. (2016). Botulinum Toxin Type A: Review and Its Role in the Dental Office. *Dent Clin North Am*, 60(2), 509-521. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2015.11.007>
- Moresi, V., Williams, A. H., Meadows, E., Flynn, J. M., Potthoff, M. J., McAnally, J., Shelton, J. M., Backs, J., Klein, W. H., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2010). Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases. *Cell*, 143(1), 35-45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.004>
- Morton, D. B., & Griffiths, P. H. (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec*, 116(16), 431-436. <https://doi.org/10.1136/vr.116.16.431>
- Mukund, K., & Subramaniam, S. (2020). Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 12(1), e1462. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>
- Murphy, K. T., Chee, A., Trieu, J., Naim, T., & Lynch, G. S. (2012). Importance of functional and metabolic impairments in the characterization of the C-26 murine model of cancer cachexia. *Dis Model Mech*, 5(4), 533-545. <https://doi.org/10.1242/dmm.008839>

- Musarò, A., & Carosio, S. (2017). Isolation and Culture of Satellite Cells from Mouse Skeletal Muscle. *Methods Mol Biol*, 1553, 155-167. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6756-8_12
- Neal, A., Boldrin, L., & Morgan, J. E. (2012). The satellite cell in male and female, developing and adult mouse muscle: distinct stem cells for growth and regeneration. *PLoS One*, 7(5), e37950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037950>
- Nuzzo, J. L. (2024). Sex differences in skeletal muscle fiber types: A meta-analysis. *Clin Anat*, 37(1), 81-91. <https://doi.org/10.1002/ca.24091>
- Patel, J., Cardoso, J. A., & Mehta, S. (2019). A systematic review of botulinum toxin in the management of patients with temporomandibular disorders and bruxism. *Br Dent J*, 226(9), 667-672. <https://doi.org/10.1038/s41415-019-0257-z>
- Patil, S., Willett, O., Thompkins, T., Hermann, R., Ramanathan, S., Cornett, E. M., Fox, C. J., & Kaye, A. D. (2016). Botulinum Toxin: Pharmacology and Therapeutic Roles in Pain States. *Curr Pain Headache Rep*, 20(3), 15. <https://doi.org/10.1007/s11916-016-0545-0>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pirazzini, M., Rossetto, O., Eleopra, R., & Montecucco, C. (2017). Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. *Pharmacol Rev*, 69(2), 200-235. <https://doi.org/10.1124/pr.116.012658>
- Pöllänen, E., Kangas, R., Horttanainen, M., Niskala, P., Kaprio, J., Butler-Browne, G., Mouly, V., Sipilä, S., & Kovanen, V. (2015). Intramuscular sex steroid hormones are associated with skeletal muscle strength and power in women

with different hormonal status. *Aging Cell*, 14(2), 236-248.
<https://doi.org/10.1111/ace.12309>

Qaisar, R., Bhaskaran, S., & Van Remmen, H. (2016). Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. *Free Radic Biol Med*, 98, 56-67. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.025>

Rafferty, K. L., Liu, Z. J., Ye, W., Navarrete, A. L., Nguyen, T. T., Salamati, A., & Herring, S. W. (2012). Botulinum toxin in masticatory muscles: short- and long-term effects on muscle, bone, and craniofacial function in adult rabbits. *Bone*, 50(3), 651-662. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.11.015>

Ramazanoglu, E., Turhan, B., & Usgu, S. (2021). Evaluation of the tone and viscoelastic properties of the masseter muscle in the supine position, and its relation to age and gender. *Dent Med Probl*, 58(2), 155-161. <https://doi.org/10.17219/dmp/132241>

Reeve, G. S., Insel, O., Thomas, C., Houle, A. N., & Miloro, M. (2024). Does the Use of Botulinum Toxin in Treatment of Myofascial Pain Disorder of the Masseters and Temporalis Muscles Reduce Pain, Improve Function, or Enhance Quality of Life? *J Oral Maxillofac Surg*, 82(4), 393-401. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2023.12.014>

Riviati, N., & Indra, B. (2023). Relationship between muscle mass and muscle strength with physical performance in older adults: A systematic review. *SAGE Open Med*, 11, 20503121231214650. <https://doi.org/10.1177/20503121231214650>

Rosa-Caldwell, M. E., & Greene, N. P. (2019). Muscle metabolism and atrophy: let's talk about sex. *Biol Sex Differ*, 10(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s13293-019-0257-3>

Rosa-Caldwell, M. E., Lim, S., Haynie, W. A., Brown, J. L., Deaver, J. W., Morena Da Silva, F., Jansen, L. T., Lee, D. E., Wiggs, M. P., Washington, T. A., &

- Greene, N. P. (2021). Female mice may have exacerbated catabolic signalling response compared to male mice during development and progression of disuse atrophy. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 12(3), 717-730. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12693>
- Saliu, T. P., Goh, J., Kang, G., Burke, B. I., Ismaeel, A., & McCarthy, J. J. (2024). Satellite cell dynamics during skeletal muscle hypertrophy. *Biochem Soc Trans*. <https://doi.org/10.1042/bst20240201>
- Sandri, M. (2013). Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *Int J Biochem Cell Biol*, 45(10), 2121-2129. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.04.023>
- Schiaffino, S., & Mammucari, C. (2011). Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet Muscle*, 1(1), 4. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-4>
- Schiaffino, S., & Reggiani, C. (1996). Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev*, 76(2), 371-423. <https://doi.org/10.1152/physrev.1996.76.2.371>
- Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*, 91(4), 1447-1531. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>
- Sciote, J. J., Horton, M. J., Rowlerson, A. M., & Link, J. (2003). Specialized cranial muscles: how different are they from limb and abdominal muscles? *Cells Tissues Organs*, 174(1-2), 73-86. <https://doi.org/10.1159/000070576>
- Shi, Z., Lv, J., Xiaoyu, L., Zheng, L. W., & Yang, X. W. (2018). Condylar Degradation from Decreased Occlusal Loading following Masticatory Muscle Atrophy. *Biomed Res Int*, 2018, 6947612. <https://doi.org/10.1155/2018/6947612>

- Spangenburg, E. E., Geiger, P. C., Leinwand, L. A., & Lowe, D. A. (2012). Regulation of physiological and metabolic function of muscle by female sex steroids. *Med Sci Sports Exerc*, *44*(9), 1653-1662.
<https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31825871fa>
- Tinastepe, N., Küçük, B. B., & Oral, K. (2015). Botulinum toxin for the treatment of bruxism. *Cranio*, *33*(4), 291-298.
<https://doi.org/10.1080/08869634.2015.1097296>
- Van Eijden, T. M., Korfage, J. A., & Brugman, P. (1997). Architecture of the human jaw-closing and jaw-opening muscles. *Anat Rec*, *248*(3), 464-474.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0185\(199707\)248:3<464::aid-ar20>3.3.co;2-4](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0185(199707)248:3<464::aid-ar20>3.3.co;2-4)
- von Lindern, J. J., Niederhagen, B., Appel, T., Bergé, S., & Reich, R. H. (2001). Type A botulinum toxin for the treatment of hypertrophy of the masseter and temporal muscles: an alternative treatment. *Plast Reconstr Surg*, *107*(2), 327-332. <https://doi.org/10.1097/00006534-200102000-00004>
- Wall, B. T., Dirks, M. L., & van Loon, L. J. (2013). Skeletal muscle atrophy during short-term disuse: implications for age-related sarcopenia. *Ageing Res Rev*, *12*(4), 898-906. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2013.07.003>
- Wang, L., Yin, L., Zhao, Y., Su, Y., Sun, W., Chen, S., Liu, Y., Yang, M., Yu, A., Guglielmi, G., Blake, G. M., Cheng, X., Wu, X., Veldhuis-Vlug, A. G., & Engelke, K. (2021). Muscle Density, but Not Size, Correlates Well With Muscle Strength and Physical Performance. *Journal of the American Medical Directors Association*, *22*(4), 751-759.e752.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jamda.2020.06.052>
- Wu, Y., Zeng, D., & Wu, S. (2023). Botulinum Toxin Type A for the Treatment of Masseter Muscle Prominence in Asian Populations. *Aesthet Surg J Open Forum*, *5*, ojad005. <https://doi.org/10.1093/asjof/ojad005>

- Yin, L., Li, N., Jia, W., Wang, N., Liang, M., Yang, X., & Du, G. (2021). Skeletal muscle atrophy: From mechanisms to treatments. *Pharmacol Res*, 172, 105807. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105807>
- Yoshihara, T., Natsume, T., Tsuzuki, T., Chang, S. W., Kakigi, R., Sugiura, T., & Naito, H. (2019). Sex differences in forkhead box O3a signaling response to hindlimb unloading in rat soleus muscle. *J Physiol Sci*, 69(2), 235-244. <https://doi.org/10.1007/s12576-018-0640-6>
- Zhang, Y., Pan, X., Sun, Y., Geng, Y. J., Yu, X. Y., & Li, Y. (2018). The Molecular Mechanisms and Prevention Principles of Muscle Atrophy in Aging. *Adv Exp Med Biol*, 1088, 347-368. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1435-3_16