

Instituto Nacional de Endocrinología

GLUCEMIA, INSULINEMIA Y SECRECIÓN DE INSULINA EN RATAS HIPOANDROGENIZADAS E HIPERANDROGÉNICAS

Lic. Aimée Álvarez Álvarez,¹ Lic. Eulises Díaz Díaz,² Dra. Beatriz Huguez Hernandorena³ y Dr. Roberto M. González Suárez⁴

RESUMEN

Se estudió, en ratas machos adultas, el efecto de la castración y de una sobredosis de enantato de testosterona sobre las modificaciones de la glucemia y la insulinemia *in vivo*, durante una prueba de tolerancia a la glucosa (PTG), e *in vitro*, la capacidad de secreción de insulina estimulada por glucosa de los islotes de Langerhans de estas ratas hipoandrogenizadas e hiperandrogenizadas. Se consideró que la castración se acompañaba de un incremento en la sensibilidad a la insulina, sin deterioro de la capacidad de secreción de insulina de los islotes. Sin embargo, se comprobó que la hiperandrogenización estaba asociada al desarrollo de una insulinoresistencia caracterizada por hiperinsulinemia; se observó además un aumento de la capacidad de secreción de insulina en este grupo de ratas hiperandrogenizadas.

Descriptor DeCS: GLUCOSA DE LA SANGRE/análisis; INSULINA/análisis; INSULINA/secreción; ISLOTES DE LANGERHANS/ secreción; TESTOSTERONA/farmacología; RATAS WISTAR; TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA.

En la década de los años 80 se estableció que en el síndrome de ovarios poliquísticos las evidencias clínicas que relacionaban la intolerancia a la glucosa y/o la diabetes con el hirsutismo eran la expresión clínica de un estado de insulinoresistencia (IR) e hiperinsulinismo secundario, asociado a un hiperandrogenismo de origen ovárico,¹ de forma

tal que quedó establecida una relación causal entre el hiperandrogenismo y la insulinoresistencia.² Sin embargo, los mecanismos en que se basa esta asociación y la relación de causalidad siguen siendo muy controvertidos.

Algunas evidencias señalan que es el hiperinsulinismo el que de forma directa (estímulo de la producción de andrógenos

¹ Licenciada en Bioquímica. Investadora Agregada.

² Licenciado en Bioquímica. Aspirante a Investigador.

³ Médico Veterinario. Responsable del Vivario.

⁴ Doctor en Ciencias Médicas. Investigador. Profesor Titular.

ováricos tras la unión de la insulina a los receptores de IGF-1 en el ovario) o más probablemente de forma indirecta (mediante el sinergismo entre la insulina y la hormona luteinizante [LH] o a través de la disminución de las proteínas portadoras de los factores de crecimiento e incremento relativo de éstos), induce un incremento de la producción de andrógenos en el ovario.³⁻⁶ Las principales evidencias que soportan esta hipótesis son indirectas y se basan en la persistencia de la IR tras la supresión de la LH con anticonceptivos o con análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), o a la inversa, la disminución de los andrógenos cuando se normalice la insulina tras la reducción del peso.⁶ No está claro porque la hiperinsulinemia afectaría únicamente la producción de andrógenos sin observarse cambios en la producción de otros esteroides por el ovario.¹ No existen resultados que demuestren de forma clara y directa que el exceso de insulina incremente la producción de andrógenos.⁷

La hipótesis alternativa considera el hiperandrogenismo como causa de la insulinoresistencia (IR), también se basa en resultados contradictorios. Hay evidencias de que la administración de altas dosis de andrógenos induce resistencia periférica a la insulina y algunos autores han apreciado remisiones parciales de la IR tras la normalización del hiperandrogenismo.^{8,9} Lo cierto es que los mecanismos patogénicos de la asociación del hiperinsulinismo y el hiperandrogenismo sigue siendo un tema muy discutido. La mayoría de las evidencias provienen de estudios realizados en mujeres con síndrome de ovarios poliquísticos. En hombres esta asociación ha sido muy poco estudiada. Existen reportes de inducción de IR por tratamiento con andrógenos sintéticos¹⁰ y por el abuso de esteroides anabólicos en atletas

jóvenes.¹¹ En un estudio reciente en que se trataron hombres sanos con dosis farmacológicas de 19-nortestosterone no se encontraron cambios en la sensibilidad a la insulina.¹² Se ha reportado sin embargo una disminución de la sensibilidad a la insulina durante la pubertad normal asociada a un defecto del metabolismo periférico de la glucosa.^{13,14} En este trabajo nos propusimos estudiar en ratas machos adultas, *in vivo*, el efecto de la castración y de una sobredosis de enantato de testosterona sobre las modificaciones de la glucemia y la insulinemia durante una prueba de tolerancia a la glucosa (PTG), e *in vitro*, el efecto sobre la capacidad de secreción de insulina estimulada por glucosa de los islotes de Langerhans de estas ratas hipoandrogenizadas e hiperandrogenizadas.

MÉTODOS

Para el estudio utilizamos ratas Wistar machos adultas que tenían entre 130 y 150 g de peso. Establecimos 3 grupos experimentales de al menos 6 ratas cada uno: I-ratas intactas, II-ratas castradas y III-ratas castradas y tratadas con testosterona. Realizamos los experimentos con las ratas del grupo II de 1 sem después de la castración. Las del grupo III recibieron el tratamiento hormonal 1 sem después de la castración, y consistió en una inyección única de 5 mg de enantato de testosterona en 1 mL de aceite vegetal; estas ratas las utilizamos para los experimentos 48 h después de tratadas. Determinamos los valores de testosterona para cada grupo experimental por radioinmunoensayo (RIA).

PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (PTG)

Administramos glucosa a razón de 3 g por kg de peso, para realizar la prueba por

inyección intraperitoneal. La sangre para las determinaciones de insulina y glucemia la obtuvimos de la arteria retroorbital antes, 15, 30, 60 y 120 min después de la administración de glucosa y la recogimos sobre heparina.¹⁵ Determinamos la glucemia por el método de la glucosa oxidasa.¹⁶ Cuantificamos la insulina por RIA.¹⁷

OBTENCIÓN Y ESTIMULACIÓN DE ISLOTES DE LANGERHANS

Aislamos los islotes según una modificación del método de Lacy.¹⁸ Extrajimos el páncreas de la rata e inmediatamente le eliminamos la grasa en una placa Petri con tampón Krebs-Ringer-bicarbonato (KRB) (NaCl 118mM; KCl 6,2mM; CaCl₂ 5,6mM; MgSO₄ 1,5mM; KH₂PO₄ 1,5mM; NaHCO₃ 32,2mM; ph 7,4, suplementado con Hepes 10mM, albúmina de suero bovino 0,2 % y glucosa 3,3 mM), sobre hielo.

Realizamos la digestión del páncreas en 5 mL de tampón KRB con 12 mg de colagenasa (SIGMA), con agitación manual, durante 20-30 min. Una vez terminada la digestión hicimos 3 lavados con tampón KRB para eliminar la colagenasa y transferimos el tejido digerido a una plaza Petri de fondo oscuro; aislamos los islotes libres de colágeno con una pipeta Pasteur bajo microscopio estereoscópico.

Para los experimentos de estimulación empleamos 20 islotes por tubo en 0,5 mL de tampón KRB. A cada tubo le añadimos 0,5 mL de tampón KRB con 3-isobutil-metilxantina (IBMX) 0,1mM, que es un inhibidor de la fosfodiesterasa de AMPc y es capaz de potenciar la respuesta secretora de los islotes, más glucosa en concentración final de 1,65; 9,9; 18,9 y 34,9 mmol/L. Incubamos los islotes a 37 °C con agitación durante 1 h en atmósfera de carbógeno (95 % O₂-5 % CO₂). Tomamos 500 µL del sobrenadante para determinar insulina por RIA.

PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Procesamos los resultados según el *test* no paramétrico de suma de rangos para 2 grupos de Wilcoxon, mediante el programa de Software Microsta (Ecosoft, Inc, 1984), con un nivel de significación $p < 0,05$.

RESULTADOS

Los niveles de testosterona plasmáticos en nmol/L fueron de $3,14 \pm 1,41$ para las ratas controles, $0,71 \pm 0,16$ para el grupo de ratas castradas (1 sem después de la castración) y $14,75 \pm 3,26$ para el grupo de ratas castradas y tratadas con testosterona (48 h después del tratamiento). El nivel de testosterona circulante en el grupo de ratas castradas es casi 5 veces menor que en los controles, mientras que en el grupo de ratas tratadas es casi 5 veces mayor que en los controles, lo que caracteriza estados de hipoandrogenismo e hiperandrogenismo, respectivamente.

El comportamiento de la glucemia y la insulinemia durante la PTG en el grupo de ratas castradas se muestra en las figuras 1 y 2. Este grupo mantiene los niveles plasmáticos de glucosa de forma similar al grupo control (para la diferencia de áreas bajo la curva $p > 0,05$), con valores de insulina significativamente inferiores al grupo control ($p < 0,05$ para la diferencia de áreas bajo la curva).

Los valores de la glucemia y la insulinemia del grupo de ratas tratadas con testosterona 1 sem después de castradas se muestran en las figuras 3 y 4. En este grupo de ratas hiperandrogenizadas, se observa una marcada hiperinsulinemia ($p < 0,001$) con aumento de los valores de glucemia ($p < 0,05$), fundamentalmente en la primera media hora de la PTG.

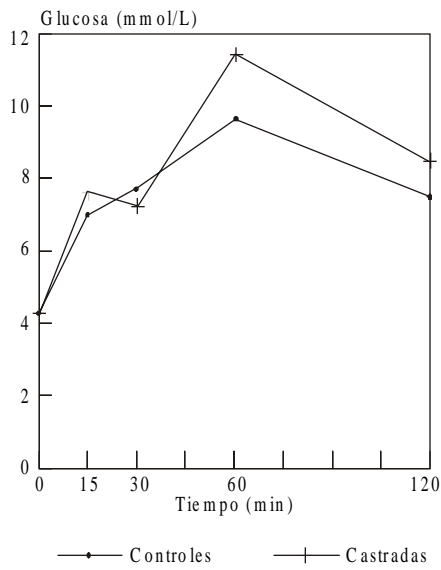


FIG. 1. Efecto de la castración sobre la glucemia durante la PTG, $p > 0,5$ para la diferencia de áreas bajo las curvas.

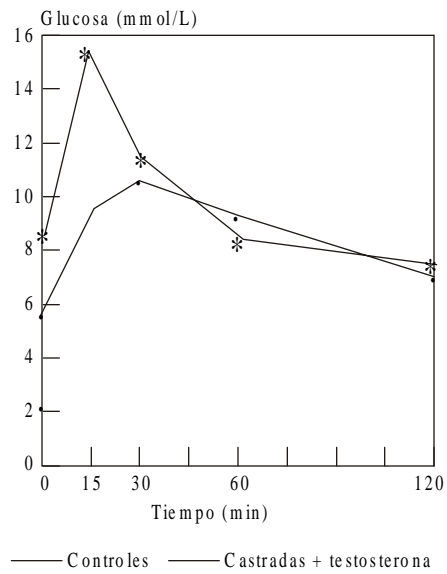


FIG. 3. Efecto del tratamiento con testosterona sobre la glucemia, durante la PTG, $p < 0,05$ para la diferencia de áreas bajo las curvas.

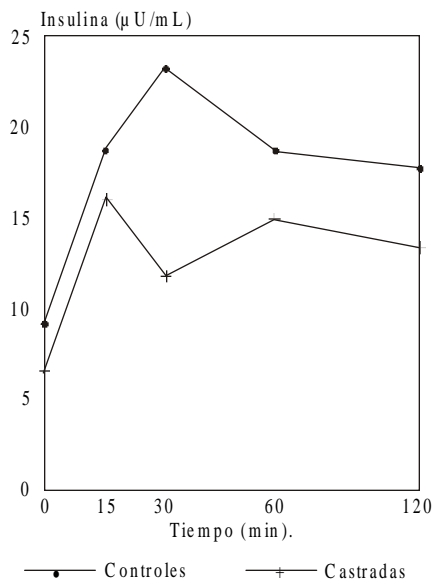


FIG. 2. Efecto de la castración sobre la insulinemia durante la PTG, $p < 0,05$ para la diferencia de áreas bajo las curvas.

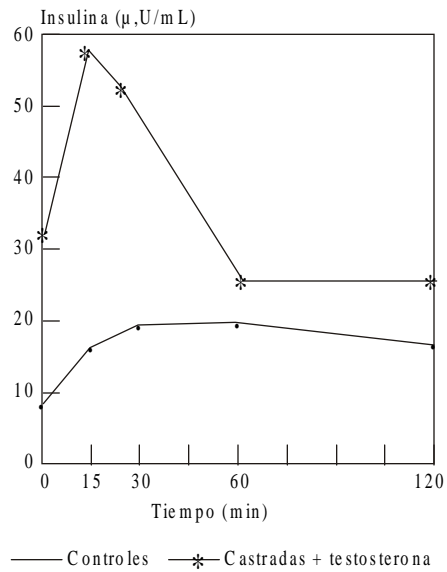
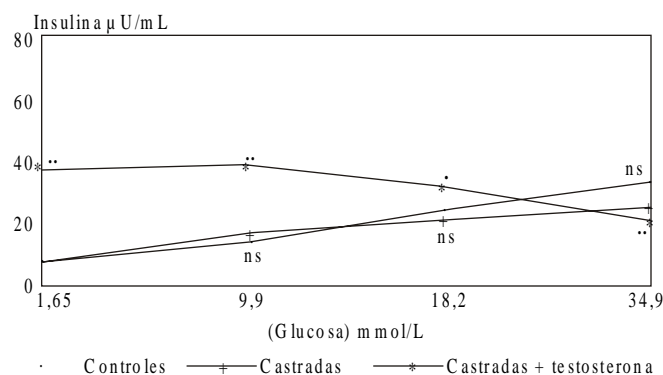


FIG. 4. Efecto del tratamiento con testosterona sobre la insulinemia durante la PTG, $p < 0,001$ para la diferencia de áreas bajo las curvas.

FIG. 5. Efecto de la castración y el tratamiento con testosterona sobre la secreción de insulina de los islotes de Langerhans. (ns - diferencia estadísticamente no significativa, * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$)).



En la figura 5 se muestran los resultados del estudio *in vitro* de la capacidad de secreción de insulina de los islotes de Langerhans. Los islotes de las ratas castradas (hipoandrogénicas) tuvieron un comportamiento similar al de las ratas controles para todas las concentraciones estimuladoras de glucosa utilizadas. Sin embargo, en el grupo de ratas tratadas con testosterona (hiperandrogenizadas) existe un marcado aumento de la secreción de insulina cuando estimulamos los islotes con concentraciones de glucosa subumbral ([glucosa] = 1,65 mmol/L, $p < 0,001$) y ligeramente supraumbral ([glucosa] = 9,9 mmol/L, $p < 0,01$). En este mismo grupo de ratas, sin embargo, se observa que a concentraciones estimuladoras de glucosa de 18,2 y 34,9 mmol/L, se produce una disminución de la secreción de insulina por los islotes, que llega a ser menor que la del grupo control a concentración de glucosa de 34,9 mmol/L ($p < 0,001$).

DISCUSIÓN

Es conocido que en las ratas, la secreción de esteroides sexuales procede exclusivamente de las gónadas. De esta

forma, con la castración logramos tener un grupo de ratas hipoandrogénicas y con el tratamiento con testosterona (5 mg) logramos establecer un grupo de ratas hiperandrogenizadas (al menos en las 48 h posteriores al mismo) que nos permitió estudiar el efecto de los niveles de andrógenos en la insulinemia, la glucemia y la secreción de insulina.

El comportamiento de las curvas de glucemia y de insulinemia durante la PTG de las ratas castradas (figs. 1 y 2) muestra una disminución de los requerimientos de insulina para el control de la glucemia, lo cual indica un aumento de la sensibilidad a la insulina de los tejidos periféricos asociado al hipoandrogenismo. La capacidad de secreción de insulina de los islotes de Langerhans en este grupo de ratas es similar al de las ratas controles (fig. 5), lo cual refuerza la idea de que la disminución de los valores de la insulinemia en este grupo de ratas hipoandrogénicas no se debe a una disminución de la capacidad secretora, sino a un aumento de la sensibilidad de la insulina.

Las ratas hiperandrogenizadas por el contrario, desarrollan una insulinoresistencia caracterizada por hiperinsulinemia ($p < 0,001$) (figs. 3 y 4). Resulta interesante que la capacidad de secreción de insulina de los islotes de estas ratas

hiperandrogenizadas esté aumentada a concentraciones estimuladoras de glucosa cercanas al rango fisiológico (fig. 5), lo cual pudiera ser uno de los mecanismos de que se valen para mantener la hiperinsulinemia que necesitan para lograr el control glucémico. No está claro si el aumento de la capacidad de secreción de insulina de los islotes está mediada por la acción directa sobre el páncreas de los altos niveles de andrógenos circulantes, o si es a consecuencia de mecanismos más complejos derivados de la insulino-resistencia como tal.

La disminución de la respuesta secretora de los islotes pancreáticos a

altas concentraciones de glucosa (18,2 y 34,9 mmol/L) o glucotoxicidad, ha sido descrita por otros autores en diferentes estudios,^{19,20} podría ser que el hiperandrogenismo causara indirectamente un incremento de dicha glucotoxicidad de las células beta del páncreas.

Este modelo experimental de ratas hiperandrogenizadas muestra una asociación causal entre el hiperandrogenismo y la hiperinsulinemia y podría tener utilidad para el estudio, a más largo plazo, de los mecanismos involucrados en la aparición de la insulino-resistencia.

SUMMARY

The effect of castration and of an overdose of heptanoate of testosterone on the modifications of glycaemia and insulinemia was studied *in vivo* during a glucose tolerance test conducted among adult male rats. The capacity of these hypoandrogenic and hyperandrogenic rats to secrete insulin stimulated by glucose of the islets of Langerhans was analyzed *in vitro*. It was considered that castration led to an increase of sensitivity to insulin without deteriorating the capacity of the islets for secreting insulin. However, it was demonstrated that hyperandrogenization was associated with the development of an insulin resistance characterized by hyperinsulinemia. It was also observed a rise of the capacity for secreting insulin in these hyperandrogenic rats.

Subject headings: BLOOD GLUCOSE/analysis; INSULIN/analysis; INSULIN/secretion; ISLETS OF LANGERHANS/secretion; TESTOSTERONE/pharmacology; RATS, WISTAR; GLUCOSE TOLERANCE TEST

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. New perspectives in polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metabol* 1996;7:267-71.
2. Poretsky L. On the paradox of insulin-induced hyperandrogenism in insulin-resistant states. *Endocrinol Rev* 1991;12:3-13.
3. Barbieri RL, Makris A, Randall RW, Daniels G, Kistner RW, Ryan KI. Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of ovarian stroma obtained from women with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metabol* 1986;62:904-10.
4. Nestler JE, Barlaschinico MDW. Suppression of serum insulin by diazoxide reduces serum testosterone levels in obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metabol* 1989;68:1027-1032.
5. Velázquez EM, Mendoza S, Hamer T, Sosa F, Glueck CI. Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy. *Metabolism* 1994;43:647-54.

6. Espinos Gómez JJ. Hiperinsulinismo o hiperandrogenismo. El dilema continúa. *Endocrinología* 1998;45(2):49-51.
7. Grainger DA. Hyperandrogenism and hyperinsulinism: cause and effect or unrelated association. *Semin Reprod Endocrinol* 1994;12:124-35.
8. Espinós JJ, Calaf J. Hiperandrogenismo, hiperinsulinismo e insulinoresistencia en el síndrome de ovarios poliquísticos. *Cuad Med Reprod* 1996;2:29-48.
9. Podelrman KH, Gooren LJJ, Henk AAB, Heine RJ. Induction of insulin resistance by androgens and estrogens. *J Clin Endocrinol Metabol* 1994;79(1):265-71.
10. Moghetti P, Tosi F, Castello R, Magnani CM, Negri C, Brune A. The insulin resistance in women with hyperandrogenism is partially reversed by antiandrogen treatment: evidence that androgen impair insulin action in women. *J Clin Endocrinol Metabol* 1996;81:952-60.
11. Landom J, Wynn V, Samols E. The effect of anabolic steroids on blood sugar and plasma insulin levels in men. *Metabolism* 1963;12:924-8.
12. Cohen JC, Hickman R. Insulin resistance and diminished glucose tolerance in power lifters ingesting anabolic steroids. *J Clin Endocrinol Metabol* 1987;64:960-3.
13. Friedl FE, Jones RE, Hannan CF Jr, Plymate SR. The administration of pharmacological doses of testosterone or 19-nortestosterone to normal men is not associated with increased insulin secretion or impaired glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metabol* 1989;68:971-5.
14. Amiel SA, Caprio S, Sherwin RS, Plewe G, Morey WH, Tamborlance WV. Insulin resistance of puberty: a defect restricted to peripheral glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metabol* 1991;72:277-82.
15. Deás M, Menéndez R, Álvarez A, González RM. Efecto hipoglicémico de la Albahaca Morada sobre la glicemia y la insulinemia en modelos animales. *Rev Cubana Invest Biomed* 1988;7(1):53-9.
16. Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 1969;6:24-7.
17. Arranz CC, González SR. Utilización de un método rápido para la separación de la hormona libre y unida en el radioinmunoensayo de insulina. *Rev Cubana Med* 1989;17(3):150-6.
18. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967;16:15-23.
19. Anello M, Rabnazzo Am, Degano C. Fast reversibility of glucose-induced desensitization in rat pancreatic islets. Evidence for an involvement of ionic fluxes. *Diabetes* 1996;45:502-6.
20. Jorns A, Tiedge M, Sickel E. Loss of GLUT2 glucose transporter expression in pancreatic beta cells from diabetic Chinese hamsters. *Virchows Arch* 1996;428:177-85.

Recibido: 18 de enero de 1999. Aprobado: 25 de marzo de 1999.

Lic. *Aimée Álvarez Álvarez*. Instituto Nacional de Endocrinología. Zapata y D. El Vedado, Ciudad de la Habana, Cuba. CP 10400.