



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DE LA TESTOSTERONA SOBRE LA
SINTESIS Y SECRECION DE INSULINA EN LA
RATA PREPUBER

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A ,
RENATA RIVERA JUAREZ



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2005

m347234



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Homero Hernández Montes
Vocal: Raquel Ortega Muñoz
Secretario: Lydia Sumiko Morimoto Martínez
Primer suplente: Felipe Cruz García
Segundo suplente: María Esther de la Rosa Duque

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"



Dra. Lydia Sumiko Morimoto Martínez
Asesor



Rivera Juárez Renata
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por haberme permitido llegar a este momento,
por los dones y gracias recibidos.

A mis padres por su amor, tolerancia, comprensión,
apoyo de hoy y siempre...con todo mi cariño y respeto
este logro es para ustedes.

A Juanito, Jorge y Andrea por compartir esta existencia,
llenándola de hermosos recuerdos como amigos
incondicionales e inseparables.

A todos los que ya no están como un recuerdo en su
memoria. †

A la UNAM mi alma mater, casa formadora...
mi segundo hogar.

A todos lo profesores que dejaron un trocito de su ser en mi mente y en mi corazón.

A Roberto, Mary y Lulú amigos y compañeros del laboratorio de Hormonas Esteroides por su enseñanza y amistad.

A ti Sumi que más que tutora ha sido mi amiga y consejera.

Al jurado que me concedió el honor de revisar esta tesis.

A ti compadre mi compañero, consejero, critico y palero con mi más profundo agradecimiento gran parte de lo que soy te lo debo a ti

INDICE

Objetivos	1
Hipótesis	1
Introducción	3
Estructura microscópica	5
Cápsula	5
Tabiques	5
Acinos	6
Islotes de Langerhans	7
Biosíntesis de la insulina	9
El gen de la insulina	9
Expresión génica	11
Regulación de la transcripción	11
Regulación del gen de insulina	13
Síntesis de la insulina	15
Secreción de la insulina	18
Regulación de la síntesis de insulina	20
Esteroides y biosíntesis de la insulina	21
Materiales y métodos	27
Animales de estudio	27
Extracción de RNA y Northern blot	27
Prehibridación	30
Marcaje de la sonda	31

Determinación de las concentraciones hormonales en sangre periférica	33
Resultados	35
Discusión y conclusiones	41
Bibliografía	44

EFFECTO DE LA TESTOSTERONA SOBRE LA SINTESIS Y SECRECIÓN DE INSULINA EN LA RATA PREPUBER.

OBJETIVO:

- ✂ Identificar el efecto de la testosterona en la expresión del gen de la insulina en el páncreas de la rata prepúber
- ✂ Observar el efecto de la testosterona en la concentración circulante de la insulina en la rata prepúber.

HIPOTESIS:

- ✂ La testosterona en dosis equivalentes a la terapia de sustitución hormonal incrementará la expresión del gen de insulina en la rata prepúber.
- ✂ La terapia de sustitución con la testosterona incrementará los niveles de insulina circulante en la rata prepúber.

INTRODUCCION.

El páncreas está constituido por dos órganos funcionalmente diferentes distintos: el páncreas exocrino, la principal glándula digestiva del cuerpo, que segrega 1200 mL de jugo digestivo y el páncreas endocrino, lugar donde se origina la insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático. Mientras que la acción primordial de los productos del páncreas exocrino, es el procesamiento de los alimentos ingeridos con la finalidad de que estén disponibles para su absorción, las hormonas del páncreas modulan aspectos de la nutrición celular desde el índice de absorción de alimentos hasta el almacenamiento celular o metabolismo de nutrientes (Baxter J,1995).

La disfunción del páncreas endocrino o respuestas anormales de sus hormonas en tejidos blanco, dan como resultado trastornos graves en la homeostasis de nutrientes, incluso síndromes clínicos importantes agrupados con el nombre de diabetes sacarina (Baxter J,1995).

En el páncreas la síntesis de proteínas, tiene lugar en los ribosomas que están unidos a la membrana del retículo endoplásmico. En los polirribosomas, éstas unidades están unidas entre sí a través de su fijación a una delgada cadena de RNA mensajero que codifica la información necesaria para el ensamblaje secuencial de los aminoácidos en una proteína específica. A medida que los ribosomas se desplazan a lo largo de la molécula de RNA mensajero, su secuencia de bases es traducida o interpretada por el RNA de

transferencia a la secuencia aminoacídica de la proteína. La molécula proteica en fase de formación es trasladada vectorialmente desde el ribosoma y, tras atravesar la membrana subyacente del retículo, queda finalmente libre en su luz (Fawcett DW, 1988).

Las moléculas de tripsinógeno, quimotripsinógeno, procarboxi peptidasa, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, lipasa, elastasa, amilasa y factor inhibidor de la tripsina ya completas son incluidas en pequeñas vesículas que salen a través de las regiones transicionales del retículo endoplásmico que carecen de ribosomas. Estas vesículas se unen a una cisterna de la cara cis del complejo de Golgi. En su desplazamiento a través de esta organelo, algunas proteínas son convertidas en glucoproteínas por acción de la enzima glucosil transferasa; otras no se modifican de forma significativa. La clasificación de los productos de la síntesis proteica tiene lugar en la red Golgi trans, en donde ciertas glucoproteínas son separadas en vesículas que se dirigen hacia el plasmalema para contribuir a su composición proteica (Fawcett DW, 1988)

Otras proteínas, destinadas a la secreción, son introducidas en vesículas que se unen formando las vacuolas de condensación. Estas vacuolas adoptan gradualmente el aspecto de los gránulos maduros de cimógeno y se desplazan hacia el citoplasma apical para su almacenamiento temporal en esta zona (Fawcett DW, 1988).

El páncreas endocrino consiste en 0.7 a 1 millón de pequeñas glándulas endocrinas (los islotes de Langerhans), distribuidos dentro

de la sustancia glandular del páncreas exocrino. El volumen de los islotes comprende de 1 a 1.5% de la masa total del páncreas y pesa alrededor de 1 a 2 gramos en el humano adulto (Baxter JD, 1995)

Es un órgano blanco rosado, situado retroperitonealmente, a nivel de la segunda y tercera vértebras lumbares. Su cabeza, a la derecha, está adherida a la porción media del duodeno; su cuerpo y su cola se extienden transversalmente, por la pared posterior del abdomen, hacia el bazo. En el adulto mide de 20 a 25 cm de largo y su peso varía entre 100 a 150 g. Está recubierto por una fina capa de tejido conjuntivo, que no forma, sin embargo, una cápsula fibrosa bien definida. Presenta una fina lobulación y los perfiles de los lobulillos mayores pueden verse a simple vista (Fawcett DW, 1988).

Estructura microscópica.

Cápsula: la cápsula de tejido conectivo que separa el tejido pancreático de las estructuras adyacentes es extraordinariamente fina y apenas podría justificar tal nombre. Esta cubierta por peritoneo (Ham AW, 1984).

Tabiques: desde la cápsula penetran tabiques de tejido conectivo que dividen el páncreas en lobulillos. Los tabiques son finos pero suele haber notable condensación de tejido conectivo denso alrededor del conducto principal de la glándula y de sus ramas más inmediatas. Tienen la función de sostén interno (Ham AW, 1984).

Acinos: comprenden la mayor parte del parénquima de los lobulillos. Dentro de los lobulillos los acinos están dispuestos en una forma bastante irregular y entre ellos existe poco tejido conectivo laxo o areolar que contiene capilares, de tal forma que un corte muestra a los acinos en todos los planos imaginables, casi todos están seccionados en forma oblicua (Ham AW, 1984).

Los núcleos de las células secretorias están dirigidos hacia su base, y por ésta razón, los núcleos de un sólo acino tienden a estar dispuestos para formar un anillo irregular en su parte exterior. El citoplasma situado en la base de las células y alrededor de los núcleos es basófilo, por su contenido de RNA como cabría esperar en una célula que muestra notable capacidad de sintetizar proteínas (Ham AW, 1984).

Dicha secreción consiste en gránulos de cimógeno los cuales son más abundantes en el ayuno, y disminuyen considerablemente tras la copiosa secreción de los mismos lo que induce la ingestión de alimento. Al disminuir el número de gránulos de cimógeno, el complejo de Golgi aumenta de tamaño mientras se están formando nuevos gránulos de secreción (Fawcett DW, 1988)

Aunque el término "gránulo" de cimógeno implica una consistencia sólida o semisólida, es evidente con microscopía electrónica que su contenido es líquido en el momento de la descarga debido a que parece fluir a través de la abertura que se forma por la fusión de la membrana limitante con el plasmalema (Fawcett DW, 1988).

Quizá sería más apropiada y descriptiva la denominación de "vesícula secretoria" que la de "gránulo de secreción". A pesar de que se amontonan en el citoplasma apical, normalmente están separadas excepto en la fase de secreción muy activa en las que una segunda vesícula de zimógeno se puede unir a otra que está en fase de exocitosis y una tercera se puede unir a la segunda, de manera que se forma una serie de vesículas secretoras intercomunicadas que se extiende a cierta distancia en el citoplasma apical (Fawcett DW, 1988).

Sí se secciona un acino en el centro, lo que ocurre pocas veces, puede advertirse que tales células pertenecen al llamado conducto intercalar por el cual el acino vacía su secreción. Las células del conducto comienzan en el centro del acino y por ésta razón se les ha llamado centroacinares (Ham AW, 1984).

Las células centroacinares se continúan con el epitelio de revestimiento de los delgados conductos intercalados que drenan el acino, y no sólo eso, su epitelio de revestimiento es activo en el transporte de agua y iones bicarbonato hacia la luz, por lo que realizan una contribución importante al volumen total de la secreción pancreática (Fawcett DW, 1988).

Islotes de langerhans.

El tejido endocrino del páncreas está dividido en agregados celulares relativamente pequeños que constituyen los islotes de Langerhans.

Estos grupos de células no son visibles a simple vista, pero al perfundir la glándula con una solución diluida del colorante rojo neutro se tiñen selectivamente los islotes de manera que es posible estudiar su número y distribución. Están diseminados en toda la glándula, aunque son más numerosos en la cola que en el cuerpo y la cabeza del páncreas. Se ha estimado que en el páncreas humano existen más de un millón de islotes, aunque debido a su pequeño tamaño, constituyen sólo el 1 al 2 % del volumen de la glándula. Cada islote está formado por 2000 a 3000 células (Ham AW, 1984)

Los islotes de Langerhans contienen cuatro tipos principales de células, cada uno de los cuales secreta una hormona diferente:

- ⊗ células α (células A) que secretan glucagón, proglucagon;
- ⊗ células β (células B) que secretan insulina, péptido C, proinsulina, amilina;
- ⊗ células δ (células D) que secretan somatostatina, y
- ⊗ células PP (células F) que secretan polipéptido pancreático (Baxter JD, 1995)

Estas células no se pueden diferenciar en las preparaciones rutinarias teñidas con hematoxilina y eosina, pero se han desarrollado métodos que permiten teñir selectivamente las células α , β y δ (Fawcett DW, 1988).

Las células β son el tipo celular predominante en el islote, ocupan la parte central del mismo y constituyen hasta un 70 % de su volumen.

Todas éstas células presentan la dotación de organelos que esperaríamos en células epiteliales secretoras de proteínas, aunque la cantidad de retículo endoplásmico rugoso o granular que muestran es mucho mayor que la que muestran las células acinares (Fawcett DW, 1988).

Entre las células de los islotes de Langerhans se pueden observar terminaciones axonales simpáticas y parasimpáticas. En animales de experimentación, la estimulación simpática disminuye la secreción de insulina, mientras que la estimulación parasimpática aumenta la secreción de esta hormona (Fawcett DW, 1988).

Biosíntesis de la insulina.

El gen de la insulina.

Estructura: consta de 3 exones y 2 intrones (Bell *et. al.*, 1980). El exón 1 se localiza en la región no traducible. El péptido señal, la cadena B y una parte del péptido C se encuentran codificados en el exón 2. En el exón 3 se encuentra la información génica correspondiente al resto del péptido C y la cadena A de la insulina. En el humano el gen de la insulina (figura 1) se encuentra en copia única en el brazo largo del cromosoma 11 (Harper ME, et al, 1981), mientras que en la rata y el ratón existen 2 genes de la insulina, el I y II (Wentworth *et. al.*, 1986).

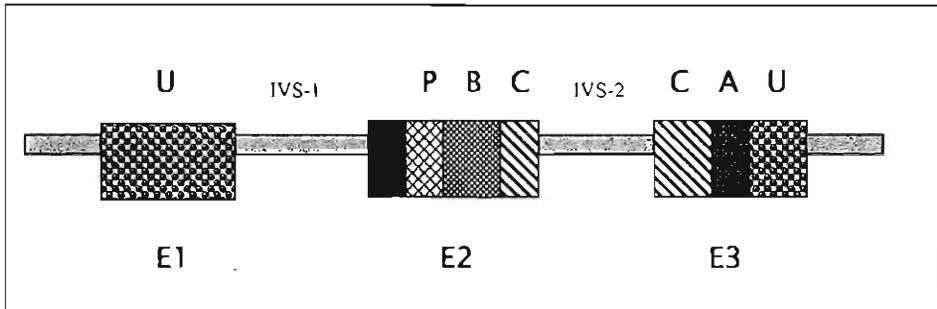


Figura 1. Gen de la insulina humana ((Docherty K y Clark AR, 1994).

E1: Exón 1 (42 pb)	IVS-1: Intrón 1 (179 pb)	B: Cadena B
E2: Exón 2 (204 pb)	IVS-2: Intrón 2 (786 pb)	C: Péptido C
E3: Exón 3 (219 pb)	P: Pre-péptido	A: Cadena A

El promotor del gen de la insulina posee una secuencia conservada TATAA de alrededor de 20 a 30 nucleótidos río arriba (-20 a -30) del sitio de inicio de la transcripción. Esta secuencia se une al factor TFIID y señala el sitio de inicio de la transcripción. El potenciador del gen de insulina está compuesto de elementos secuenciales directos que interactúan con proteínas reguladoras nucleares que regulan la actividad del promotor de manera positiva o negativa. Las secuencias IEB son sitios clásicos de regulación conocidos como cajas E, las cuales tienen una secuencia consenso CANNTG y están implicadas en la regulación tejido específico de genes en músculo, páncreas y tejido linfoide. De igual forma estas secuencias se unen al potenciador 1 del gen de insulina (Docherty K y Clark AR, 1994).

El gen de la insulina también contiene un elemento de respuesta a

AMPc denominado CRE de -184 a -177 río arriba, esta presente en el gen de insulina tanto humano como de rata con la siguiente secuencia consenso TGACGTCC. La función de ésta secuencia está incorporada de un modelo en el que se incrementan los niveles de AMPc como resultado de su disociación de la subunidad catalítica de la proteína cinasa A (PKA) de su subunidad reguladora.

Expresión génica.

Un gen se expresa a través del RNAm generado por el proceso denominado transcripción, que básicamente consiste en la reproducción de una hebra de DNA monocadena, dicha reproducción se lleva a cabo por la RNA polimerasa que esta compuesta de un complejo proteico con distintas subunidades, las cuales se encargan de hacer una copia fiel de la cadena codificante con la diferencia que en lugar de adicionar Timina se adiciona Uracilo, así mismo se adiciona una cola de poli Adeninas y un CAP para estabilizarlo en el citoplasma y posteriormente ser traducido a proteínas.

Regulación de la transcripción.

La expresión génica se lleva a cabo a través del RNAm generado por un proceso denominado transcripción, para posteriormente ser traducido a las proteínas para las que codifica el gen. Por tanto ésta expresión puede ser regulada a nivel transcripcional o postranscripcional, en cuanto a la primera se ha descrito la participación de secuencias de DNA en "cis" (intragénicas) ubicadas

cerca del gen con elementos "trans" (proteínas) (Mitchel y Tijan, 1989). Los elementos en "cis" han sido clasificados como promotores y aumentadores (enhancers).

Los promotores están localizados próximos al sitio de inicio de la transcripción, típicamente de 100 pb de longitud, representan el sitio de ensamble del complejo de iniciación, el cual comprende a la RNA pol II y a algunos factores generales de la transcripción como TFIIA, TFIIB, TFIIC, TFIIE y TFIIIF (Saltzman y Weinmann, 1989).

Muchos contienen una secuencia TATAAA conservada que se sitúa en dirección 5' a unos 20 o 30 nucleótidos del sitio de inicio de la transcripción, su función principal es evitar que los transcritos se inicien inespecíficamente (Hampsey, 1998).

Los potenciadores son secuencias que regulan la expresión de diversos genes y se sitúan a distancias variables río arriba del sitio de inicio de la transcripción (entre 100 y algunos miles de pb) (Hampsey, 1998). Se cree que estos potenciadores interactúan con proteínas de la maquinaria de transcripción (Ptashne, 1988; Johnson and McKnight, 1989). Así mismo se sabe que la interacción entre los potenciadores y proteínas que se unen al DNA forman una asa, en cuyo seno se activa la transcripción (Müller *et. al.*, 1988).

La actividad de estos potenciadores se diversifica en relación a estímulos como fenómenos de choque térmico, factores de crecimiento, metales y hormonas esteroides.

Regulación del gen de la insulina.

La mayoría de los estudios realizados sobre la regulación del gen de insulina se han realizado en los genes I y II de insulina de rata. Al igual que otros genes la regulación depende de la interacción de secuencias contenidas en el gen y de la interacción con proteínas transactivadoras (figura 2).

La PKA activa fosforila a CREB (proteína de unión a CRE) para activarlo. La secuenciación de aminoácidos reveló que la serina 133 de CREB posiblemente sea el blanco de fosforilación por AMPc y PKA (Docherty K y Clark AR, 1994).

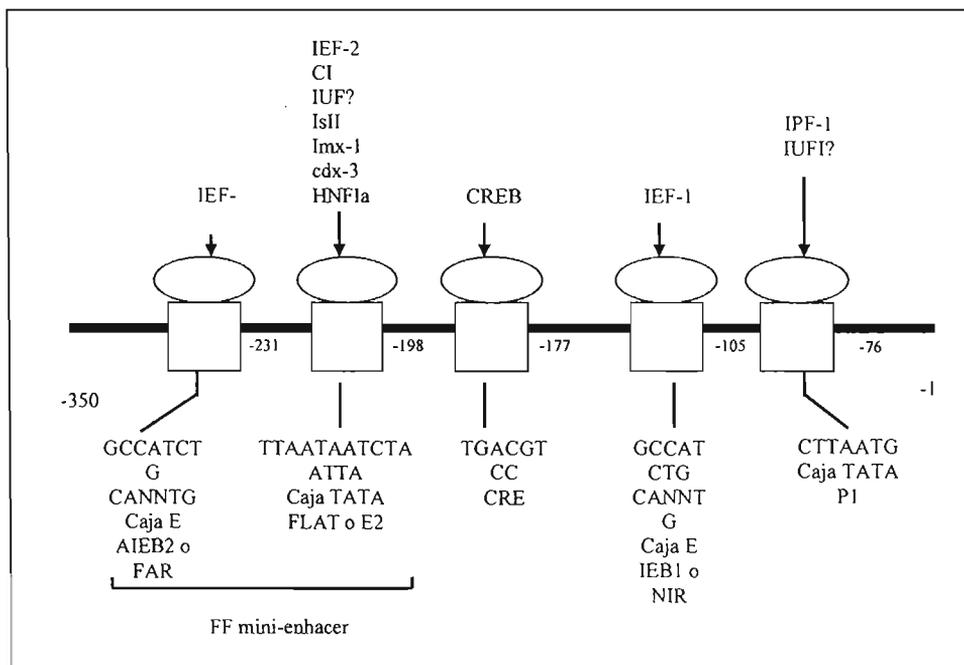


Figura 2. Regulación del gen de insulina (Docherty K y Clark AR, 1994).

Existen dos hipótesis sobre el mecanismo de inducción de CREB, uno sugiere que la fosforilación produce un cambio conformacional en CREB creando un dominio estrecho de 14 aminoácidos que en conjunto con la serina 133 son requeridos para desplegar la inducción de la transcripción completamente. La otra hipótesis propone que la fosforilación en la serina 133 causa fosforilaciones secundarias en forma de cascada (Bohmann D, 1990)

La subunidad catalíticamente activa libre puede ser translocada al núcleo donde fosforila a la proteína CREB de 43 kDa de peso molecular, lo que incrementa su habilidad de activar la transcripción (Docherty K y Clark, 1994).

Estudios previos han demostrado que el factor de transcripción CREB y su sitio de unión a DNA el CRE, regulan la expresión génica en respuesta a despolarizaciones de membrana y flujo de calcio en líneas celulares de islotes de páncreas y en células neuronales. La vía de señalización calcio-CREB ofrece un mecanismo por el cual el calcio moviliza secretagogos de insulina en conjunto con la estimulación de secreción hormonal produciendo un efecto prolongado en la función de las células β , a través de cambios en los patrones de expresión génica. Lo que nos dice que el calcio puede ser extremadamente localizado como segundo mensajero, como lo ha demostrado en la transcripción del gen de insulina, cuya actividad puede depender de cómo el calcio entre a la célula (Eckert B *et. al.* 1996)

Síntesis de la insulina

Una molécula precursora, la preproinsulina, péptido de cadena larga de peso molecular 11500 daltones, se produce por la síntesis de RNA dirigida por el DNA en el retículo endoplásmico rugoso de las células β del páncreas. Se desdobra por enzimas microsomales a proinsulina (peso molecular cercano a 9000 daltones), casi después de su síntesis (Feling y Bergman, 1995). La proinsulina se transporta al aparato de Golgi donde tiene lugar su empacamiento en gránulos secretores recubiertos de clatrina. La maduración del gránulo secretor se relaciona con la pérdida de la cubierta de clatrina y la conversión de la proinsulina a insulina y a un péptido conector más pequeño o péptido C mediante la destrucción proteolítica en dos sitios a lo largo de la cadena peptídica (figura 3). Los gránulos secretores maduros normales contienen insulina y péptido C en cantidades equimolares y sólo pequeñas cantidades de proinsulina, las cuales consisten en intermediarios parcialmente degradados (Baxter JD, 1995).

La proinsulina consiste en una sola cadena de 86 aminoácidos que incluye las cadenas A y B de la molécula de insulina y un segmento conector de 35 aminoácidos. Las enzimas convertidoras (quizá proteasas semejantes a Tripsina y a Carbopeptidasa B) fragmentan dos pares de aminoácidos dibásicos (tres Argininas y una Lisina) de la molécula de proinsulina (Baxter JD, 1995).

El resultado es una molécula de insulina de 51 aminoácidos y un residuo de 31 aminoácidos, el péptido C.

Una pequeña cantidad de proinsulina producida por el páncreas no se desdobra y se secreta intacta hacia el flujo sanguíneo junto con la insulina y el péptido C. La mayor parte del suero antiinsulina utilizado en el inmunoanálisis estándar para la insulina, cruza con la proinsulina; cerca de 3 a 5% de la insulina inmunoreactiva extraída del páncreas humano, es realmente proinsulina (Baxter JD, 1995).

El péptido C, el residuo de 31 aminoácidos (PM de 3000) formado durante la rotura de insulina a partir de proinsulina, no tiene actividad biológica conocida, se libera de las células β en cantidades equimolares a la insulina. No se degrada por el hígado sino que se excreta principalmente por el riñón. En el estado basal, después de un ayuno durante la noche la concentración promedio del péptido C puede ser de hasta 1000 pmol/L (Baxter JD, 1995).

La insulina endógena tiene una vida media en circulación de 3 a 5 minutos. Se cataboliza principalmente por insulinasas en hígado, riñón y placenta. Cerca del 50% de la insulina se elimina por un solo paso a través del hígado (Baxter JD, 1995).

El páncreas humano secreta alrededor de 40 a 50 unidades de insulina por día en adultos normales. La concentración basal de la insulina en sangre de humanos en ayuno tiene como promedio 10 μ U/mL (0.4ng/mL o 69 pmol/L). En controles normales, la insulina rara vez se eleva a más de 100 μ U/mL (690 pmol/L) después de una comida normal. Hay un aumento en la concentración de insulina

periférica que se inicia de 8 a 10 minutos después de la alimentación y llega a un máximo en sangre periférica a los 30 o 45 minutos. Esto es seguido de una declinación rápida en la glucosa plasmática posprandial, que regresa a valores basales en 90 a 120 minutos (Baxter JD, 1995).

Aunque se sabe que los valores de glucosa plasmática por debajo de 80 a 100 mg/dL (4.4 a 5.6 mmol/L) no estimulan la liberación de insulina, también se ha demostrado que la presencia de glucosa es necesaria (en los sistemas *in vitro*) para que sean efectivos la mayor parte de otros reguladores conocidos de secreción de insulina (Baxter JD, 1995).

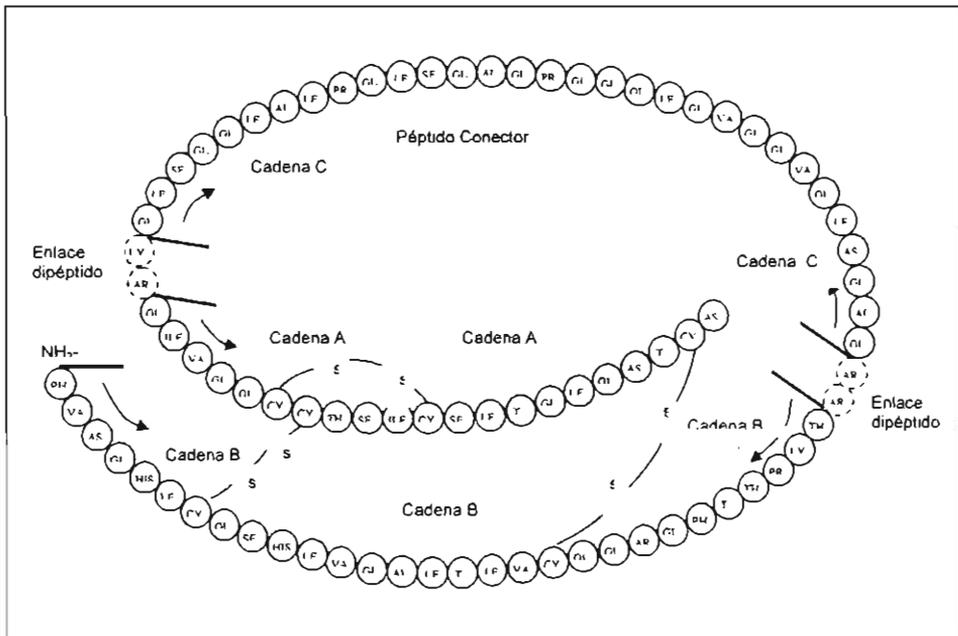


Figura 3. La insulina (Baxter JD, 1995)

Secreción de la insulina

La glucosa es el estimulante más poderoso para la liberación de insulina. El páncreas perfundido de rata ha demostrado una liberación bifásica de insulina en respuesta a la glucosa. Cuando la concentración de glucosa en el sistema se incrementa súbitamente, ocurre una liberación de insulina inicial de corta duración (fase temprana). Si la concentración de glucosa se mantiene a ese nivel, la liberación de insulina gradualmente cae y después empieza a subir nuevamente hasta un valor estable (fase tardía), (Baxter JD, 1995).

Se sabe que la glucosa penetra a la célula β pancreática mediante difusión pasiva, que es facilitada por una proteína específica de membrana llamada transportador-2 de glucosa (Glut-2). Debido a la afinidad relativamente baja por la glucosa, esta proteína facilita más efectivamente el transporte de glucosa durante la hiperglucemia después de ingerir alimentos que a los valores bajos de glucosa durante el ayuno nocturno (Baxter JD, 1995).

Se ha demostrado que la liberación de insulina requiere calcio. Se ha propuesto que los gránulos maduros que contienen insulina en las células β , se unen y alinean con los microtúbulos que se contraen después de la exposición a concentraciones altas de calcio intracelular y por tanto arrojan los gránulos. Se han demostrado los efectos siguientes de la glucosa en el desplazamiento de calcio:

1) La captación de calcio se incrementa por estimulación de glucosa proveniente de la célula β .

2) La salida de calcio a partir de la célula se retrasa por alguna acción de la glucosa.

3) La movilización del calcio a partir de los compartimentos mitocondriales ocurre posterior a la inducción de AMPc por glucosa.

Se ha demostrado que la glucosa induce directamente la formación de AMPc, sin embargo, la elevación de AMPc no estimulan la liberación de insulina en ausencia de glucosa (Baxter JD, 1995).

El metabolismo de la glucosa y otros secretagogos nutrientes desemboca en la cierre de los canales de K^+ dependientes de ATP (K_{ATP}) en la membrana plasmática, originando la despolarización de la célula, posteriormente se genera flujo de Ca^{2+} extracelular a través de canales sensibles a voltaje. De igual forma elevan la concentración de AMPc intracelular y reguladores derivados de fosfolípidos de membrana, incluyendo inositol trifosfato (IP_3), diacilglicerol (DAG), ácido araquidónico (AA) y ácido fosfatídico. Secretagogos insulínicos no-nutrientes influyen el proceso secretor a través de los mismos reguladores intracelulares como lo hacen los secretagogos nutrientes.

El calcio se une a CaM (calmodulina) el complejo Ca^{2+} /CaM se une a la cinasa inactiva (CaMKi), la cual se transforma en enzimáticamente activa, posteriormente fosforila proteínas sustrato y éstos procesos de fosforilación estimulan el proceso de secreción (Jones PM *et. al.* 1998).

Los no-nutrientes se unen a receptores de membrana que están acoplados vía unión heterotrimérica a GTP y Fosfolipasa C (PLC). La ocupación del receptor activa a la PLC liberándose Inositoltrifosfato (IP_3) por la hidrólisis de fosfolípidos de inositol de membrana. IP_3 libera el calcio del retículo endoplásmico y la elevación del Ca^{2+} activa a la CaMK como se describió anteriormente (Jones PM *et. al.* 1998)

Regulación de la síntesis de insulina.

La biosíntesis y secreción de insulina es regulada por una gran variedad de factores incluyendo a la glucosa, algunos aminoácidos, neurotransmisores y hormonas. La más importante fisiológicamente es la glucosa cuyo metabolismo produce un incremento en la relación ATP/ADP, cambios en el estado redox, en el pH intracelular y un incremento en la concentración de malonil CoA y en el metabolismo de fosfolípidos, éstas señales tienen un efecto estimulatorio sobre la producción de insulina debido a un incremento en la transcripción del gen de insulina, así como un incremento en la vida media y la eficiencia de traducción del RNAm de insulina.

Entre las hormonas que participan en la regulación de la insulina se encuentran las hormonas esteroides, que actúan a través de la unión con su receptor. Los receptores a hormonas esteroides pertenecen a la superfamilia de factores de transcripción inducibles por su ligando, como son receptores para ácido retinoico, hormonas tiroideas y varios genes (Landers y Spelberg, 1992).

La estructura de estos genes consiste básicamente en un dominio amino terminal, que regula la transcripción; un dominio de unión al DNA de 66 a 68 aminoácidos; una región visagra y un dominio carboxi terminal de unión a la hormona. Dentro de la región terminal se han encontrado subdominios con actividad transcripcional, denominado por sus siglas en inglés como TAF (transcriptional activity factor) (Landers y Spelberg, 1992).

La unión en forma de dímero de la hormona a su receptor origina un cambio conformacional del receptor que da lugar a un incremento en su afinidad por el DNA, a una secuencia en especial ubicada muy proximal al gen regulado, denominada Elemento de Respuesta a Hormonas (ERH) cuya estimulación puede originar una respuesta transcripcional positiva o negativa. (Yamamoto, 1985; Landers y Spelberg, 1992).

Esteroides y biosíntesis de la insulina.

Se ha encontrado relación entre los esteroides gonadales y la homeostasis de la insulina.

El ejemplo clínico de la relación que existe entre los andrógenos, particularmente la testosterona, y la concentración de insulina son mujeres con el Síndrome de Ovarios poliquísticos (SOP), donde se ha observado una concentración de insulina inmunoreactiva mayor que en mujeres control. Así mismo se sabe que existe elevación en la sensibilidad a insulina, durante el ciclo menstrual en mujeres

normales, particularmente cuando el estradiol y la progesterona se encuentran elevados (fase lútea) en comparación con el resto del ciclo (Escalante y Alpizar, 1999).

Se piensa que la hiperinsulinemia presente en pacientes con SOP puede estar asociada en parte con defectos en el metabolismo de la insulina. Se tiene evidencia que sugiere que la testosterona puede ser un modulador de los niveles de insulina en estas mujeres vía su asociación negativa con el aclaramiento y la degradación de insulina, es decir que en concentraciones elevadas de testosterona se inhibe el aclaramiento de insulina circulante (Buffington CK y Kitabchi AE, 1994).

Las pacientes con SOP también desarrollan resistencia a la insulina, por tanto se incrementan los niveles plasmáticos de insulina lo que promueve la producción de andrógenos por el ovario, la relación entre la resistencia a insulina y el hiperandrogenismo es bien conocida lo que no está claro es el evento primario que da lugar a estas anomalías. Sin embargo cuando el hiperandrogenismo es eliminado en el paciente con SOP la resistencia a la insulina persiste en pacientes con hiperplasia adrenal congénita, por lo tanto la resistencia a insulina no puede ser explicada en muchos casos por la elevación de andrógenos. Otro punto de vista sugiere que la resistencia a la insulina y el hiperandrogenismo provienen de un factor común y que entonces la hiperinsulinemia y el hiperandrogenismo se perpetúan mutuamente (Poretsky L, 1991)

Se ha propuesto que la testosterona pudiera ser un modulador de los niveles de insulina interviniendo a nivel de procesamiento de la proinsulina (Burhem *et. al.*, 1980). También se ha reportado que la testosterona incrementa las concentraciones de Ca^{2+} intracelular en células de Sertoli y osteoclastos, básicamente por dos mecanismos:

- ∞ Flujo del ambiente extracelular
- ∞ Movilización del retículo endoplásmico.

El incremento de calcio intracelular implica la actividad de canales de K^+ dependientes de ATP presentes en células de Sertoli y osteoclastos, lo que se ha evidenciado por despolarización de la membrana. Se sabe que el flujo de calcio ocurre vía canales dependientes de voltaje. (Lyng FM *et. al.* 2000, Erben RG *et. al.* 2000, Estrada M *et. al.* 2000, Lieberherr M *et. al.* 1994, Mauras N, 1999).

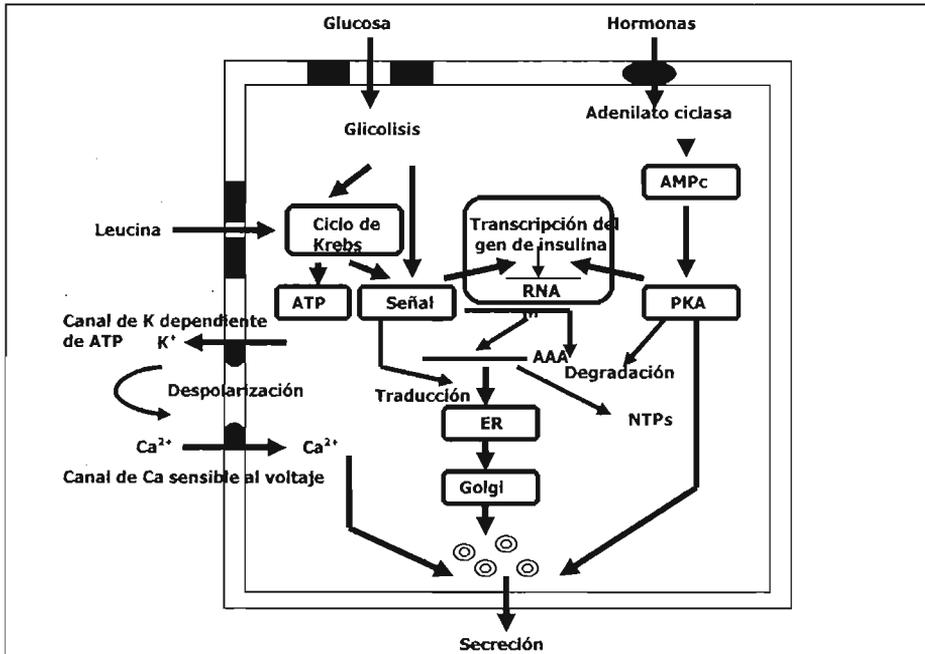


Figura 4. Secreción de insulina en el humano (Lieberherr M *et. al.*, 1994)

El tercer mecanismo por el cual la testosterona ejerce un efecto sobre la concentración de calcio intracelular es por la vía no-genómica también llamada epigenética consistente en la unión de testosterona a su receptor de membrana y la subsecuente activación de canales de calcio (Beguin P *et. al.*, 2001). Así mismo se tienen reportes de que la testosterona también eleva el contenido de IP₃ y DAG intracelular, es decir el incremento en la concentración de segundos mensajeros elevaría la secreción de insulina, mientras que el receptor de andrógenos (AR) cambia conformacionalmente al unirse a su ligando capaz de interactuar con un homodímero de nucleótidos en el promotor de genes inducibles para potenciar su actividad.

La secuencia consenso es 5'-GGTTCTTGGAGTACT-3'. Posteriormente el receptor interactúa con la maquinaria basal de transcripción, posiblemente por la unión directa con su N-terminal de 142 a 485 aminoácidos a los factores basales TFIIIF y TBP (Cato ACB y Peterziel H, 1998).

Los andrógenos actúan sobre receptores intracelulares que forman parte de la superfamilia de ligandos activadores de factores de transcripción. Cuando la hormona se une a su receptor adquiere una nueva conformación que es capaz de interactuar no sólo con el elemento de respuesta específico a andrógenos (ARE) localizado cerca o con la región promotora sino con otras proteínas reguladoras y cofactores de la transcripción (Aarnisalo P *et. al.*, 1998).

La activación de la transcripción por el AR es asistida por un número de coactivadores que se unen al receptor como TIF2 y la proteína de unión a CREB (CBP), ésta une a la Histona Acetil Transferasa (HAT) la cual se encarga de acetilar la cromatina y por tanto activa la transcripción (Aarnisalo P *et. al.*, 1998).

Existen reportes de otras hormonas esteroideas que tienen un efecto sobre la secreción de insulina, como 17β-estradiol que tiene un efecto rápido sobre la concentración de Ca²⁺ intracelular en el islote de Langerhans, particularmente en la célula β, mediante un mecanismo de unión a receptor de membrana, diferente de los receptores clásicos, en concentraciones fisiológicas. Este efecto se manifiesta

rápidamente, en un rango de minutos y de manera reversible (Ropero *et al.*, 2002).

En estudios con ratas se ha encontrado que la insulina circulante se incrementa debido a la administración de estradiol y progesterona (Ashby *et al.* 1978, Bailey y Ahmed-Sorour, 1980), mientras que por otro lado la privación de esteroides ováricos provoca una disminución en la insulina circulante en respuesta a glucosa (Bailey y Ahmed-Sorour, 1980)

Morimoto *et al.* (2001), han reportado que la testosterona es el andrógeno que más incrementa la síntesis y secreción de insulina en ratas macho gonadectomizadas y sustituidas con testosterona, encontrando incrementos en los niveles de RNAm de insulina, así como de insulina circulante.

En el presente trabajo se estudió el efecto de la testosterona en la síntesis y secreción de insulina en la rata prepúber.

JUSTIFICACION:

En una revisión de la literatura se encontraron datos controvertidos sobre el efecto de las hormonas esteroides sobre la secreción de insulina, y por tanto de su concentración circulante, en diferentes patologías, así como estudios de investigación básica sobre modelo animal (rata).

Algunos autores reportan que la hiperinsulinemia produce hiperandrogenismo y por otra parte otros autores encontraron que el hiperandrogenismo da lugar a hiperinsulinemia. La segunda hipótesis se ha visto favorecida por los resultados reportados por Morimoto *et. al.* en el 2001, al realizar estudios en animales intactos y gonadectomizados así como en islotes pancreáticos.

El presente trabajo pretende demostrar que el hiperandrogenismo produce hiperinsulinemia, utilizando un modelo de ratas prepúber para eliminar el efecto que pudiera tener la producción hormonal natural de un animal adulto.

MATERIALES Y METODOS.

Animales de estudio.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 7 días de edad, a las que se les administró por vía subcutánea una dosis de enantato de testosterona equivalente a la dosis terapéutica de sustitución en humanos 71.42 $\mu\text{g}/20$ g de peso, con el objeto de elevar los niveles circulantes de testosterona. El vehículo utilizado fue aceite de cacahuete. Las ratas se dividieron en dos grupos:

- ⌘ Control (30 animales)
- ⌘ Tratados (40 animales)

A los animales del grupo control sólo se les aplicó el vehículo en un volumen equivalente al que se administró a los tratados.

A los 21 días de edad (14 días después de la inyección) se extrajeron aproximadamente 10 mg de tejido pancreático para la extracción de RNAm por el método de Trizol (Gibco BRL, Life Technologies, Inc, Gaithersburg, MD) y posteriormente se tomó una muestra de sangre por punción cardíaca para la cuantificación por RIA de la insulina y la testosterona, finalmente se sacrificó a las ratas por dislocación cervical.

Extracción de RNA y northern blot.

Los procedimientos se obtuvieron de Maniatis T *et. al.*, 1987.

- ❖ Se extrajeron aproximadamente 10 mg de tejido, se adicionó 1mL de TRIZOL y se homogenizó con un politrón hasta pulverizar el tejido. En porcentaje p/v la muestra no excedió el 10%.

- ❖ Se adicionaron 200 μ L de cloroformo por cada mL de TRIZOL, se agitó en un vortex por 15 segundos, y posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm por 15 min a 4°C.

- ❖ Después de la centrifugación la muestra se separó en tres fases, la inferior (cloroformo) color rosa, la interfase blanca y la superior incolora (acuosa) donde se encuentra el RNA. El sobrenadante translucido se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 mL, nuevos y esteriles.

- ❖ Para precipitar el RNA se adicionaron 500 μ L de alcohol isopropilico por cada ml de TRIZOL.

- ❖ Se agitaron los tubos en un vortex y se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min, si esto no fue posible se almacenaron a 4°C.

- ❖ El RNA obtenido se lavó 2 veces con etanol al 15% mezclando en vortex y centrifugando a 7 500 rpm por 5 min a 4°C.

- ❖ Finalmente el RNA se secó (no completamente) y se resuspendió en agua de 10 a 100 μL dependiendo del tamaño del sedimento obtenido. Se hizo una dilución 1:500 para medir la absorbancia a 260 y 280 nm para calcular la cantidad de RNA obtenido, mediante un espectrofotómetro Beckman DU-600 éste calculó la cantidad de RNA presente en la alícuota en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y con este valor se calculó por regla de tres el volumen de suspensión necesario para procesar 20 μg de RNA por muestra.

Se corrieron 20 μg de cada muestra en geles desnaturalizantes de agarosa al 1% y 2.2 M de formaldehído (Sambrook *et. al.*, 1989). A cada muestra se le adicionó formamida (8 μL), hepes/EDTA 10X (2 μL), formaldehído (3.24 μL) y agua cbp 20 μL . Las muestras se colocaron en un baño maria a 80°C posteriormente se adicionó 1 μL de bromuro de etidio para teñir el RNA y 2 μL de azul de bromofenol como controles de corrida.

Se preparó un gel de agarosa al 1% que para 50 mL contiene 0.5 g de agarosa, 5 mL de amortiguador Hepes/EDTA 1X, 36.9 ml de agua y 8.1 ml de formaldehído. Esta mezcla se calentó para disolver la agarosa, sin permitir que llegue a ebullición posteriormente se colocó en el plato de la cámara de electroforesis y se posicionó el peine para crear los pozos donde se colocaron las muestras.

El amortiguador de corrida contiene 25 mL de Hepes/EDTA 10X

(Hepes 0.5M y EDTA 0.01M,pH 8.0), 40.54 ml de formaldehído y 184.46 mL de agua para 250 mL de buffer.

Por último las muestras se colocaron en los pozos y se encendió la cámara de electroforésis a 80 V por 1 hora.

Terminado el tiempo de corrida se procedió a transferir las muestras a la membrana de nitrocelulosa por capilaridad con SSC 10X (Citrato de sodio 0.15 M y Cloruro de sodio 1.5 M, pH 7.0) por toda la noche. Finalmente las membranas se fijaron a 80°C y al vacío por 2 horas (figura 5).

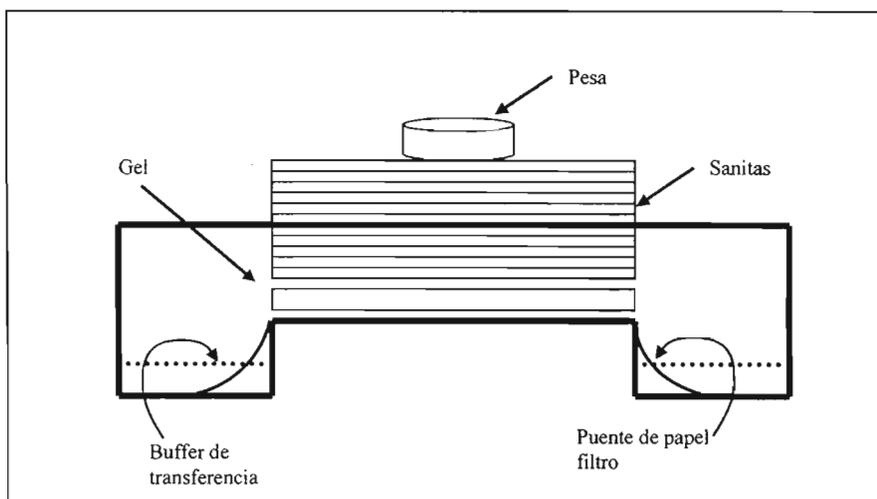


Figura 5. Transferencia a membrana de nitrocelulosa.

Prehibridación.

- ❖ Se preparó la solución de prehibridación de acuerdo al tamaño

de la membrana 0.2mL de solución por cada cm². Con las siguientes proporciones:

Formamida	50%
SDS	0.2%
EDTA	10 mM
Denhard*	4X
Fosfatos	120 mM
Agua cbp	

*Denhard 50X: 5g de ficoll 400, 5g de polivinilpirrolidona, 5g de albúmina sérica bovina (fracción V) y agua cbp 500 mL.

- ❖ Se preparó una solución de 50 µg/mL de espermatozoides de salmón. Se hirvió en baño de agua por 5 min, posteriormente se transfirió a un recipiente con hielo por 3 min y se adicionó a la solución anterior.
- ❖ Se hicieron una bolsa de plástico con suficiente espacio para colocar la membrana y eliminar burbujas de aire.
- ❖ Se adicionó la solución de prehibridación a la bolsa, se verificó que no tuviera fugas y se eliminaron las burbujas de aire. Finalmente se selló.
- ❖ Se incubó a 42°C por 24 horas en un baño de agua con agitación.

Marcaje de la sonda.

- ❖ Se desnaturalizó 1 μL de un fragmento Pst1 de 360 pares de bases del DNA complementario (DNAc) de la insulina humana en un tubo eppendorf en baño a ebullición por 5 minutos, inmediatamente después en hielo.
- ❖ Posteriormente se adicionaron 2 μL de dATP, 2 μL dGTP, 2 μL dTTP, 15 μL de solución amortiguadora Random Primers y 4 μL de dCTP marcado radioactivamente con P^{32} (3000Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$), agua destilada cbp 49 μL .
- ❖ Se adicionó 1 μL de Klenow fragment (fragmento de polimerasa I) y se incubó 3 horas a 25 °C.
- ❖ Posteriormente se adicionaron 5 μL de solución amortiguadora de EDTA, para detener la reacción y 100 μL de TE (TRIS 10mM, EDTA 1mM).
- ❖ Se preparó una microcolumna de cromatografía en una jeringa de insulina colocando una cama de fibra de vidrio en la punta de la jeringa y empacada con sephadex G50, se centrifugo por 5 minutos a 1500 rpm para compactar la columna.
- ❖ Se aplicó la sonda marcada en la columna y se colocó un

tubo eppendorf de 0.5 mL en la punta de la jeringa para recibir la sonda marcada purificada. Se centrifugo a 1500 rpm por 5 min.

- ❖ Posteriormente se recuperó la sonda marcada y se aplicó a la membrana contenida en la bolsa de hibridación de manera homogénea, se eliminaron las burbujas y se selló nuevamente para hibridarla por toda la noche a 42°C en un baño maría con agitación (Feinberg y Vogelstein, 1983).
- ❖ Después de la hibridación, las membranas se lavaron en condiciones de alta astringencia 2 veces a temperatura ambiente en una solución de SSC 2X y 2 veces a 50°C en una solución de SSC 0.1X, SDS (dodecilsulfato de sodio) 0.1% y se expusieron a placas autorradiográficas Kodak X-OMAT por 24 horas a -70°C, usando pantallas intensificadoras. Las autorradiografías fueron analizadas con un densitómetro de imagen (Eagle Eye II, Stratagene).

Determinación de las concentraciones hormonales en sangre periférica.

Después de la extracción del páncreas se obtuvo una muestra de sangre por punción cardíaca al momento del sacrificio del animal, las cuales fueron centrifugadas para separar el suero. Se cuantificaron los niveles de testosterona (T), estradiol (E₂) por el método de radioinmunoanálisis (RIA) empleando tritio como trazador (Sufi SB *et al.*, 1986). Los anticuerpos fueron proporcionados por la OMS (Ginebra, Suiza) y la hormona marcada de Amersham International, Buckinghamshire U.K.

De igual forma se cuantificó la insulina circulante por RIA en fase sólida (ICN Biomedicals, Inc, Costa Mesa, CA; Diagnostic Products Corp, Los Angeles, CA).

Análisis estadístico.

Los niveles de expresión del gen de insulina y las concentraciones de insulina se analizaron estadísticamente por medio del programa Sigma Stat del paquete Jandel Scientific,

RESULTADOS.

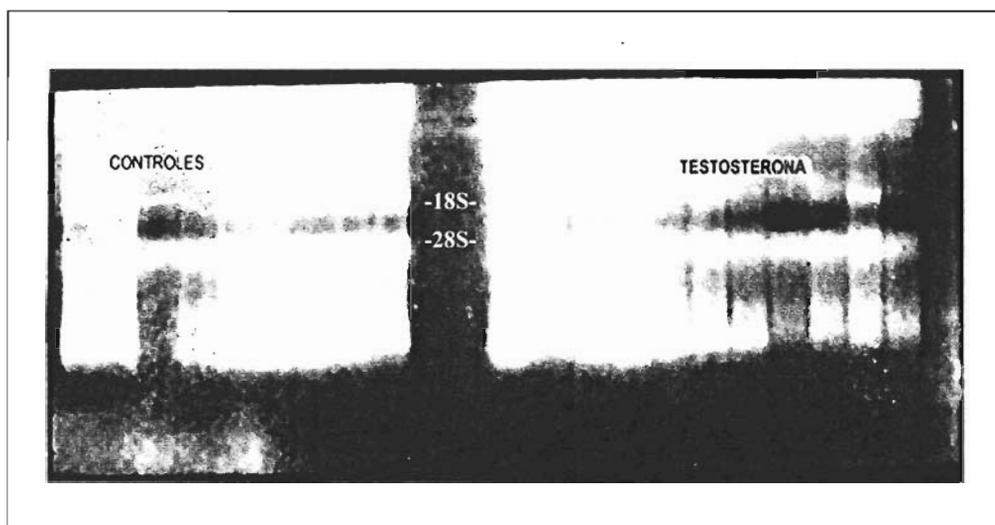


Figura 6. Análisis de las muestras en gel de agarosa al 1% para verificar la integridad del RNA.

Integridad del RNA ribosomal.

En la figura 6 se muestra un ejemplo de los geles de agarosa donde se corrieron las muestras de RNA del páncreas de las ratas, a la izquierda los grupos control y a la derecha los tratados con testosterona. En estos geles se observa la integridad de los RNAs ribosomales, pues se observan dos bandas bien definidas correspondientes a las subunidades 18S y 28S.

Curva estándar de insulina.

Los niveles de insulina se calcularon mediante la siguiente curva estándar con 0.5, 5.5, 15, 35, 70, 175 y 310 $\mu\text{UI}/\text{mL}$ de insulina. B/Bo se define como las cuentas por minuto (cpm) de cada estándar sobre las cpm de 0 $\mu\text{UI}/\text{mL}$, es decir de la unión máxima del anticuerpo, posteriormente se interpolaron los valores obtenidos de las muestras en la curva (figura 7).

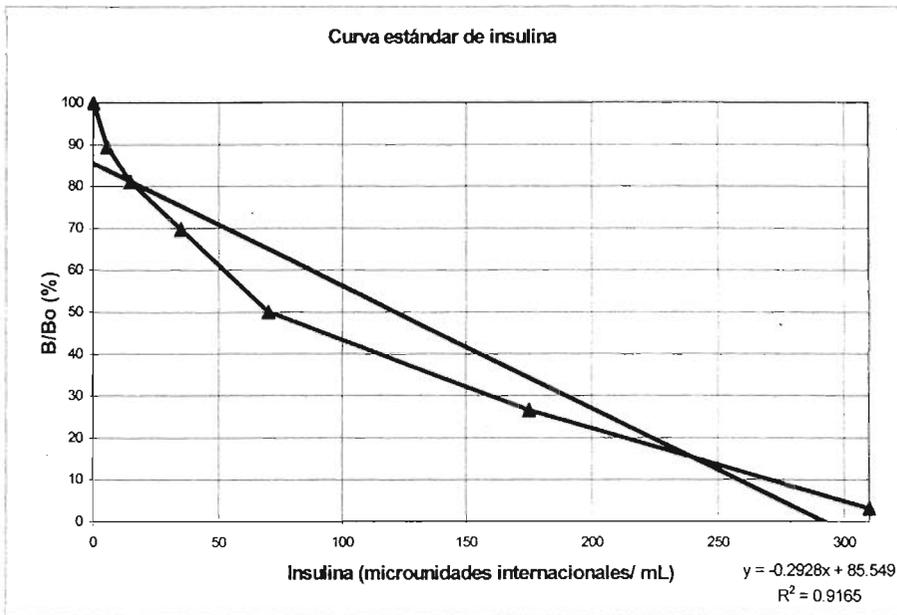


Figura 7. Curva estándar de insulina

Efecto de la testosterona en los niveles de insulina.

En promedio los valores de insulina encontrados en el suero de los animales fue mayor en el grupo tratado con testosterona 222.675 ± 1.468 en comparación con el grupo control 123.992 ± 10.444 . Los resultados se expresan en $\mu\text{UI}/\text{mL}$ más menos el error estándar.

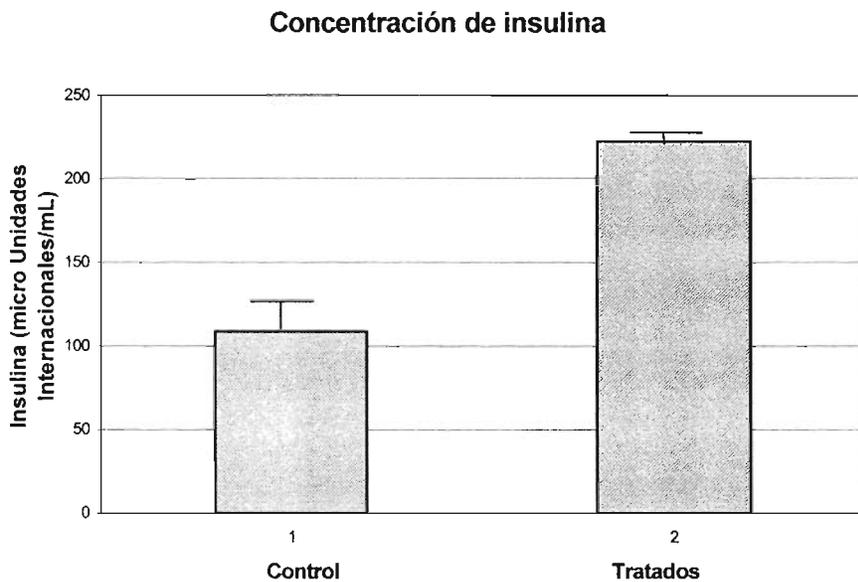


Figura 8. Concentraciones de insulina en los grupos de estudio

Las diferencias entre los resultados fueron estadísticamente significativas con una $p < 0.001$.

Concentración de testosterona en el suero.

El promedio de la concentración de testosterona detectada fue mayor en el suero de las ratas tratadas 2.34 ± 0.05 , que es mayor que en el un adulto (1.5 ± 0.4), mientras que en el grupo control la concentración de testosterona encontrada que fue de 0.38 ± 0.2 . Los valores se expresan en ng/mL más menos el error estándar. La diferencia entre ellos fue estadísticamente significativa con una $p < 0.01$.

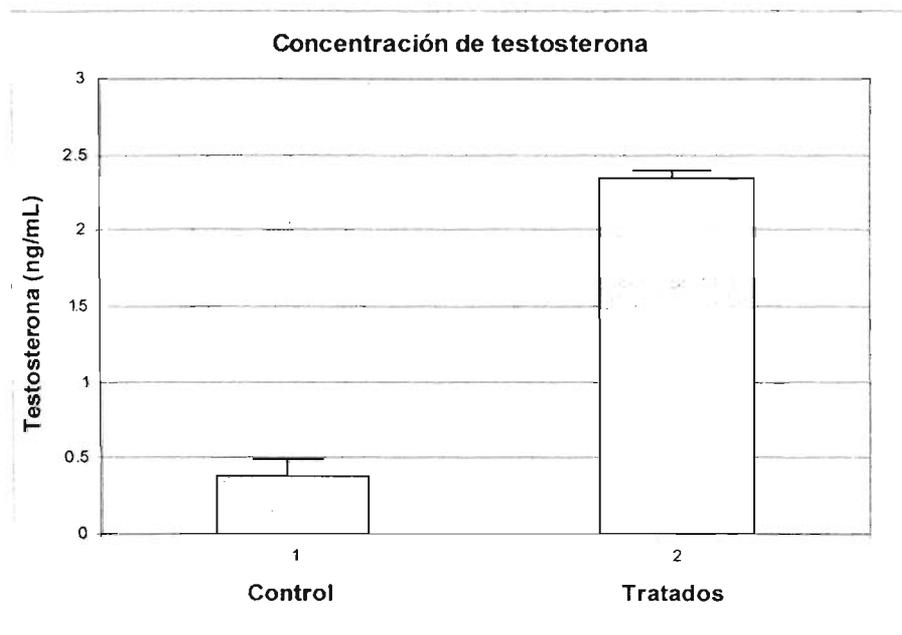


Figura 9. Concentración de testosterona en el suero de los grupos en estudio

Expresión del gen de insulina.

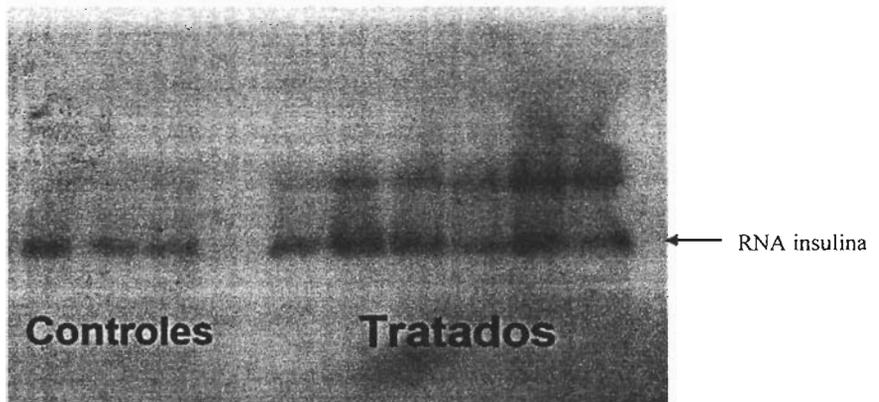


Figura 10. Radiografía de una membrana de nitrocelulosa después de la hibridación.

La expresión del gen de insulina se analizó tanto en el páncreas de la rata prepúber no tratada como en la sustituida con testosterona. En la figura 10 se muestra la radiografía de una membrana de nitrocelulosa después de hibridarla con la sonda marcada con P^{32} . Para el análisis de las placas se empleó un analizador de imagen por densitometría (pág 33).

Los valores promedios para el grupo control ($n=30$) fueron de 20267 ± 1237.43 unidades arbitrarias, mientras que para el grupo tratado ($n=40$) fue de 34337 ± 2216.33 . El análisis de los datos por la prueba de t de student muestra que la diferencia es estadísticamente significativa con una $p < 0.001$.

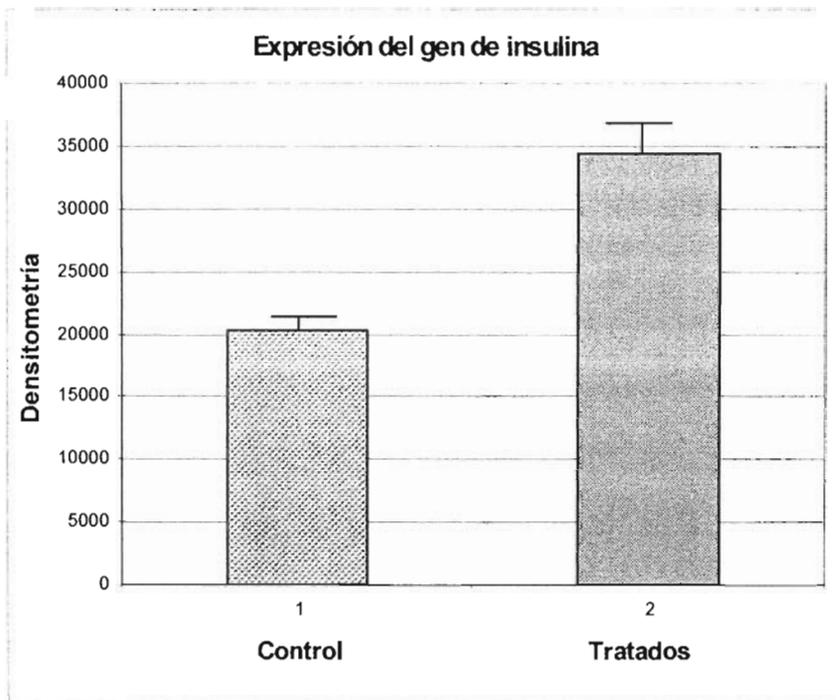


Figura 11. Niveles de expresión del RNAm de insulina. $p < 0.001$

Al cuantificar los niveles de estradiol circulantes por RIA resultaron no detectables en ambos grupos.

DISCUSION.

La experimentación se llevó a cabo en rata prepúber con la finalidad de evitar el efecto positivo o negativo que pudiera tener la secreción hormonal de las gónadas del adulto en la síntesis y secreción de insulina. De ésta manera sólo se evidencia el efecto de la testosterona en dosis de terapia sustitutiva en el animal prepúber.

El incremento en los niveles de expresión del gen de insulina nos muestra un efecto a nivel genómico de la testosterona, estos datos apoyan y amplían los reportados por Morimoto *et. al.* (2001) quienes encontraron que en machos adulto castrados y sustituidos con testosterona y dihidrotestosterona se recuperan los niveles de insulina. Este incremento en la expresión del gen de la insulina, además del aumento en los niveles de insulina circulante pueden hablarnos de un incremento en la síntesis de insulina y por tanto un incremento en la transcripción de éste gen como respuesta a un estímulo externo, que en éste caso es la administración de testosterona, como único factor de evaluación, ya que las condiciones de alimentación, ciclos de luz/oscuridad, etc fueron las mismas para ambos grupos. Incluso se trató de controlar la variabilidad interfamiliar al comparar sólo los grupos control y tratados provenientes de la misma madre, es decir que los hijos de una misma madre se dividieron en dos grupos a uno se le administró el vehículo (control) y al otro la dosis de sustitución de testosterona (tratado).

En el reporte de Morimoto *et. al.* (2000) se realizaron estudios *in vivo* con ratas castradas y sustituidas con hormonas esteroides, en donde se utilizó dihidrotestosterona (DHT) un andrógeno no aromatizable para descartar que el efecto encontrado se debiera a la transformación de la testosterona en estradiol. El resultado fue que el patrón de expresión fue muy similar en el grupo sustituido con testosterona y con DHT.

La regulación que ejerce la testosterona sobre el gen de insulina se puede atribuir a la interacción de la hormona con su receptor, el cual ha sido identificado en el páncreas (Díaz-Sánchez *et. al.*, 1995), ésta hipótesis ha sido apoyada por estudios *in vivo* e *in vitro* (Morimoto *et. al.*, 2001) y por el presente trabajo.

Por otra parte se conocen mecanismos no-genómicos por los cuales los andrógenos podrían producir un incremento en la expresión del gen de insulina a través del incremento en el influjo de calcio desde el exterior y una movilización de los depósitos internos como se observa en osteoclastos y células de Sertoli (Lieberherr *et. al.*, 1994)

El incremento en los niveles de insulina nos dice que no sólo se está sintetizando más insulina, sino que además ésta insulina es secretada probablemente por el mismo mecanismo que opera en las células de Sertoli y en los osteoclastos descrito anteriormente, aunque no se tiene evidencia de que suceda así, ésta posibilidad abre nuevas brechas de investigación en la descripción de este mecanismo

epigenético en el tejido que nos ocupa.

Para terminar podemos decir que esta investigación muestra que la testosterona incrementa los niveles del RNAm de la insulina y por tanto la expresión del gen incrementando la síntesis de la insulina en la rata prepúber.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de Burhem *et. al.* (1980) quienes sugieren que el hiperandrogenismo induce la hiperinsulinemia observada en el síndrome de ovarios poliquísticos.

CONCLUSIONES.

- ↳ La testosterona en dosis equivalentes a la terapia de sustitución hormonal incrementa de manera estadísticamente significativa la expresión del gen de insulina en la rata prepúber.

- ↳ La terapia de sustitución con la testosterona incrementa de manera estadísticamente significativa los niveles de insulina circulante en la rata prepúber.

REFERENCIAS.

Aarnisalo P, Palvimo J, Jänne OA. (1998). CREB-binding protein in androgen receptor-mediated signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:2122-27.

Ashby CJ, Shirling D, Baird JD (1978). Effects of progesterone on insulin secretion in the rat. *J. Endocrinol.* 76:476-86.

Bailey CJ y Ahmed-Sorour H (1980). Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis: effects on insulin secretion. *Diabetologia.* 19:475-81.

Baxter JD (1995). *Endocrinología básica y clínica 3ª. Edición. El manual moderno, México, D.F. Capítulo 15, pp 661-670.*

Beguín P, Nagashima K, Gonoï T, Shibasaki T, Takahashi K, Kashima Y, Ozaki N, Geering K, Iwanaga T, Seino S (2001). Regulation of Ca²⁺ channel expression at the cell surface by the small G-protein kir/Gem. *Nature.* 411:701-6.

Bell GI, Pictet RL, Rutter WJ, Cordel B, Tischer E y Goodman HM (1980). Sequence of the human insulin gene. *Nature.* 284:26-32.

Bohman D (1990). Transcription factor phosphorylation: a link between signal transduction and the regulation of gene expression. *Cancer Cells.* 2:337-44.

Buffington CK y Kitabchi AE (1994) Evidence for a defect in insulin metabolism in hyperandrogenic women with polycystic ovarian syndrome. *Metabolism* 43. 11:1367-72.

Burhem GA, Givens JR, Kitabchi AE (1980). Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50:113-16.

Cato ACB y Peterziel H.(1998). The androgen receptor as mediator of gene expression and signal transduction pathways. *Trends Endo. Metab. (TEM)*. 9:150-54.

Díaz-Sánchez V, Morimoto S, Morales A, Robles-Díaz G, Cerbón M. (1995). Androgen receptor in the rat pancreas: genetic expression and steroid regulation. *Pancreas*. 11: 241-245.

Docherty K y Clark AR.(1994). Nutrient regulation of insulin gene expression. *FASEB J.* 8:20-27.

Eckert B, Schwaninger M, Knepel W (1996). Calcium-mobilizing insulin secretagogues stimulate transcription that is directed by the cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate/calcium response element in a pancreatic islet beta-cell line. *Endocrinology*. 137:225-33.

Erben RG, Erberle J, Stahr K, Goldberg M. (2000). Androgen deficiency induces high turnover osteopenia in aged male rats: a

sequential histomorphometric study. *J Bone Miner Res.* 15:1085-98.

Escalante PJM y Alpizar SM (1999). Changes in insulin sensitivity, secretion and glucose effectiveness during menstrual cycle. *Arch. Med. Res.* 30:19-22.

Estrada M, Liberona JL, Miranda M, Jaimovich E. (2000). Aldosterone and Testosterone mediated intracellular calcium response in skeletal muscle cell cultures. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 279:E132-9

Fawcett DW (1988). *Tratado de Histología* 12ª. edición. McGraw-Hill, Madrid. Capitulo 28, pp 749-763.

Feinberg A y Vogelstein B (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochemistry.* 137:6-13.

Feling P y Bergman M (1995). The endocrine pancreas: Diabetes mellitus. In: Feling P Baxter JD y Frohman A (Eds). *Endocrinology and Metabolism*. 3th edn. McGraw Hill. New York. pp 1107-1250.

Ham AW (1984). *Tratado de Histología* 8a. edición. Nueva editorial interamericana, México, D.F. Capitulo 22, pp 779-933.

Hamsey M (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbio. Mol.Biol. Rev.* 62:465-503.

Harper ME, Ullrich A y Saunders GF (1981). Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:4458-60.

Johnson PF y McKnight SL (1989). Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 58:799-839.

Jones PM, y Persaud SJ.(1998). Protein kinases, protein phosphorylation and the regulation of insulin secretion from pancreatic cells. *Endocrine Review.* 19:429-61.

Landers JP y Spelberg TC (1992). New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene. Express.* 2:19-63.

Lieberherr M, Grosse B. (1994) Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-triphosphate and diacylglycerol formation via pertussis toxin-sensitive-G protein. *J. Biol. Chem.* 269:7217-7223.

Lomedico P, Rosenthal N, Efstradiatis A, Guilbert W, Kolodner R y Tizard R (1979). The structure and evolution of two non allelic rat preproinsulin genes. *Cell.* 18:545-558.

Lyng FM, Jones GR, Rommerts FF.(2000). Rapid androgen actions on calcium signaling in rat Sertoli cells and two human prostatic cell lines: similar biphasic responses between 1 picomolar and 100 nanomolar concentrations. *Biol Reprod.*63:736-47.

Maniatis T, Goodbourn S y Fisher JA (1987). Regulation of inducible and tissue-specific expression. *Science.* 236:1237-1245.

Mauras N (1999). Growth hormone, insulin-like growth factor I and sex hormones; effects on protein and calcium metabolism. *Acta Pediatr. Suppl.* 88:81-3.

Mitchel PJ y Tjian R (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science.* 245:371-78.

Morimoto Martínez LS. (1999). Efecto de los esteroides sexuales sobre la síntesis y liberación de insulina en la rata: estudios *in vivo* e *in vitro*. Tesis de maestría. UNAM.

Morimoto S, Fernández-Mejía C, Romero-Navarro G, Morales-Peza N y Díaz V. (2001). Testosterone effect on insulin content, messenger ribonucleic acid levels, promoter activity and secretion in the rat. *Endocrinology.* 142;1442-47.

Müller HP, Sogo JM y Schaffner W (1988). An enhancer stimulates transcription in trans when attached to the promoter via a protein bridge. *Cell.*58:766-77.

Poretsky L (1991). On the paradox of insulin-induced hiperandrogenism in insulin-resistant states. *Endocrine Reviews*. 12:3-13.

Ptashne M (1998). How to eucaryotic transcriptional activators work. *Nature*. 333:683-89.

Ropero AB, Bernat S y Nadal A (2002). A nonclassical estrogen membrane receptor triggers rapid differential actions in the endocrine pancreas. *Mol Endocrinol*. 16: 497-505.

Saltzman AG y Weinmann R (1989). Promoter especificity and modulation of RNA polimerase II transcription. *FASEB J*.3:1723-33.

Sambrook J, Fritsch T, Maniatis T (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbord Lab. New York. Vol I, pp 7.3-7.83.

Sufi SB, Donaldson A, Jeffcoate SL (1986). Special Program of Research, Development and Research training in Human Reproduction. Program for the Provision of Matched Assay. Reagents for the Radioimmunoassay of Hormones in Reproductive Phisiology. *Method Manual*. 10th ed.WHO.Geneve.

Wenworth BM, Schaefer IM, Villa-Komaroff L y Chirgwin JM (1986). Characterization of the two nonallelic genes encoding mouse preproinsulin. *J. Mol. Evol*. 23:305-312.

Yamamoto KR (1985). Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Ann. Rev. Genet.* 19:209-52.