

TRABAJO ORIGINAL

Efecto de esteroides sexuales sobre la función endocrina adipocitaria e insulinosensibilidad periférica

Effect of sexual steroids over the adipocyte and outlying insulin sensitivity

Giovambattista, A.; Castrogiovami, D. y Spinedi, E.

Unidad de Neuroendocrinología, IMBICE (CONICET-CICPBA), 1900 La Plata

Resumen

Es conocido que las hormonas esteroideas sexuales modulan la composición corporal y otras funciones endocrinas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el impacto de la administración de esteroides sexuales sobre la insulinosensibilidad periférica y la función secretora adipocitaria. Grupos de ratas hembra recibieron vehículo (C) o valerato de E2 o propionato de T. Se monitoreó el peso corporal y la ingesta de alimento hasta el día experimental, que fueron sacrificados en condición basal o sometidos a un test de sobrecarga con glucosa. Se evaluaron las concentraciones de leptina, E2, T, glucosa, triglicéridos e insulina (INS). Se ponderó el tejido adiposo parametrial y se aislaron los adipocitos e incubaron con o sin INS. E2 indujo una temprana ($p < 0,05$) hipofagia, contrariamente, T indujo una moderada ($p < 0,05$) hiperfagia. Los animales E2 resultaron con menor peso y masa adiposa parametrial que los C ($p < 0,05$). Los niveles plasmáticos no se modificaron en los animales E2 ni T, salvo el desarrollo de hiperleptinemia en el grupo E2 ($p < 0,05$). El test de tolerancia a la glucosa mostró ($p < 0,05$) aumento y disminución en la insulinosensibilidad en los animales E2 y T, respectivamente. Finalmente, los adipocitos aislados de animales E2 como los T desarrollaron una disminuida ($p < 0,05$ vs. C) respuesta a INS. Nuestro estudio pone en evidencia los efectos de E2 y T sobre la sensibilidad a insulina y la función adipocitaria.

Abstract

Sex hormones are known to modulate body composition and endocrine functions. The aim of the present study was to analyze the impact of sexual steroids administration on the outlying insulin-sensitivity and adipocyte secretory function. Groups of female rats received either vehicle (C), E2 valerate, or T propionate. Daily food intake and body weight were recorded until sacrifice under basal conditions or after high glucose load test. Plasma concentrations of leptin, E2, T, glucose, triglycerides, and insulin (INS) were evaluated. The parametrial adipose tissue was pondered and adipocytes were isolated and then incubated

Dirección Postal: Casilla de Correo 403. La Plata (1900)

Correspondencia a: neuroendo@imbice.org.ar

Palabras clave: leptina, testosterona, estradiol, adipocitos, insulina.

Key Words: leptin, testosterone, estradiol, adipocyte, insulin.

with or without INS. E2 induced early hypophagia ($p < 0,05$); contrarily, T induced moderate hyperphagia ($p < 0,05$). Weight and fatty parametrial mass values were lower for E2- than C-treated animals ($p < 0,05$). Plasma levels remained unmodified either for E2 or T groups, though E2 animals developed hyperleptinemia ($p < 0,05$). The high glucose load test showed increased and decreased insulin-sensitivity ($p < 0,05$) in E2 and T groups, respectively. Finally, E2 and T isolated adipocytes were less sensitive to insulin-induced leptin secretion than C cells ($p < 0,05$ vs. C). Our study reveals that E2 and T hormones affect sensibility to insulin as well as adipocyte functions.

Introducción

Son conocidas las acciones de las hormonas sexuales, a través de sus efectos hipotalámicos, sobre el control de la ingesta alimentaria y del balance de energía⁽¹⁾. El estradiol ha sido directamente implicado en la regulación de la ingesta de alimento⁽²⁾, y el mecanismo involucrado en este efecto pareciera ser debido a la presencia de receptores específicos en el núcleo arcuato hipotalámico (AN), donde están presentes neuronas productoras de neuropéptido Y (NPY), reconocido factor orexigénico⁽³⁾. Aunque el papel exacto del estradiol sobre el control de apetito es contradictorio, dependiendo de si es analizado después de la administración aguda⁽⁴⁾ o crónica⁽⁵⁾ del esteroide, resultando orexigénico o anorexigénico, respectivamente.

La distribución del tejido graso corporal depende del sexo, y esta característica está directamente relacionada con las hormonas sexuales⁽⁶⁾. La adipogénesis, proceso que involucra la diferenciación de precursores adipocitarios a adipocitos maduros, implica la activación de genes específicos de las células adiposas^(7,8), y está regulado por diversos factores^(9,10), entre ellos el sistema endocrino⁽¹¹⁻¹³⁾. Ha sido propuesto que los andrógenos bloquean la adipogénesis⁽¹⁴⁾ y los estrógenos la estimulan⁽¹⁵⁾. Este hecho está respaldado por la presencia de receptores específicos para esteroides sexuales en preadipocitos y adipocitos de mamíferos^(16,17), demostrando que estas células son blanco para hormonas de esteroides sexuales y que regulan el crecimiento del tejido adiposo⁽⁶⁾. Dentro de los efectos mencionados de esteroides sobre adipogénesis, se encuentra la actividad moduladora en la producción de leptina (producto del gen *ob*), mientras los estrógenos estimulan, los andrógenos inhiben la expresión y secreción de leptina^(18,19).

Recíprocamente, la leptina regula la producción de esteroides sexuales en ambos sexos. Actuando a través de su receptor específico (Ob-Rb), la leptina inhibe la producción de estradiol por las células de la zona granulosa ovárica⁽¹⁵⁾ y la secreción de testosterona testicular⁽²¹⁾. Por lo tanto, estos datos demuestran, claramente, la importancia de la interacción entre las células adiposas y los esteroides gonadales. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el impacto de la administración de esteroides sexuales sobre la ingesta de alimento, la insulinosensibilidad periférica y la función secretora adipocitaria.

Materiales y Métodos

Animales utilizados

Se utilizaron ratas adultas, de sexo femenino, de la cepa Sprague-Dawley a los 60 días de edad. Los animales fueron alimentados ad libitum, bajo ciclo de luz/oscuridad de 12 hs, y a $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

Diseño experimental 1.

Diferentes grupos de animales, de 60 días de vida, fueron inyectados (via intra-muscular, i.m.) con 100 μl de aceite de maíz sólo (control, C; $n = 18$) o conteniendo 2 mg de Valerato de Estradiol (E2; $n=18$). Se registró diariamente el consumo de alimento y el peso corporal de las ratas de ambos grupos hasta el día experimental (61 días postratamiento). Los animales fueron sacrificados por decapitación (08:00 hs.) y el plasma recolectado y almacenado a -20°C para la posterior determinación de glucosa, triglicéridos, insulina y leptina. Además, se procedió a diseccionar el tejido graso parametrial de animales de ambos grupos experimentales. A partir de éste se aislaron

las células adiposas y fueron cultivadas con o sin la presencia de insulina (0,1-2,0 nM) durante 30 minutos. Al final de este período, el medio de incubación separado y almacenado (a -20 °C) hasta la posterior determinación de leptina liberada.

Animales adicionales de ambos grupos experimentales (C y E2), fueron implantados, bajo ligera anestesia 48 hs. antes de la experimentación con un catéter i.v. (vena yugular derecha). El día experimental, las ratas fueron sangradas antes (tiempo cero) y a diferentes tiempos (30, 60 y 90 minutos) después de la administración de glucosa i.p. (3 g/kg de peso corporal)⁽²²⁾. El plasma recolectado fue almacenado a -20 °C para la posterior determinación de los niveles circulantes de glucosa e insulina.

Diseño Experimental 2.

Diferentes grupos de animales, de 60 días de vida, fueron tratados (i.m.) con 100 µl de aceite de maíz sólo (C; n = 18) o conteniendo 2 mg de Propionato de Testosterona (T; n=18). Se registraron diariamente el consumo de alimento y el peso corporal de las ratas de ambos grupos hasta el día experimental (61 días postratamiento). Los animales fueron sacrificados por decapitación (08:00 hs.) y el plasma recolectado y almacenado a -20 °C para la posterior determinación de glucosa, triglicéridos, insulina y leptina. Además, se procedió a diseccionar el tejido graso parametrial de los animales de ambos grupos experimentales. A partir de éste se aislaron las células adiposas y fueron cultivadas con o sin la presencia de insulina (0,1-10 nM) durante 6 horas. Al final de este período, el medio de incubación fue almacenado (a -20 °C) para la posterior determinación de la leptina liberada.

Grupos experimentales adicionales, fueron implantados, bajo ligera anestesia 48 hs. antes de la experimentación con un catéter i.v. (vena yugular derecha). El día experimental, las ratas fueron sangradas antes (tiempo cero) y a diferentes tiempos (5, 15, 30, 60 y 90 minutos) después de la administración de glucosa i.v. (2 g/kg de peso corporal)⁽²³⁾. El plasma recolectado fue almacenado (a -20 °C) hasta la posterior determinación de los niveles circulantes de glucosa e insulina.

Aislamiento e incubado de células adiposas.

El aislamiento y cultivo de las células adiposas se realizó como fue descrito previamente⁽²⁴⁾. Brevemente, el tejido graso parametrial fue transferido a tubos 50 ml plásticos estériles con 4 ml/g de grasa en medio Krebs-Ringer-Mops suplementado con 1 % de BSA, antibióticos, 1 % colagenasa tipo 1 (Sigma Chem., Mo) (7.4 de pH), y se incubó a 37°C con agitación suave, durante 40 minutos. La suspensión obtenida fue filtrada a través de una malla de nylon y centrifugada (30 seg, a 400 rpm) a temperatura ambiente. El infranadante fue aspirado, y fueron aislados los adipocitos, los cuales fueron lavados con 10 ml de Krebs-Ringer-Mops, luego se centrifugó como se describió anteriormente. Las células fueron diluidas con medio estéril Dulbecco's Modified Eagle's (Sigma) suplementado con 1 % BSA (Sigma), 1 % SFB y antibióticos, 7,4 de pH; para obtener (aproximadamente) 200,000 adipocitos cada 800 µl de medio. Los adipocitos fueron sembrados (200,000 células por pozo) en placas de cultivo de 24 pozos y se les adicionó 200 µl de medio de cultivo sólo o conteniendo insulina (Novo Nordisk Pharma AG, Suiza). Luego, las células fueron cultivadas (37°C) en atmósfera (CO₂ 95 % de aire - 5 %, humedad de 85 - 87 %) durante el tiempo estipulado en cada protocolo experimental.

Determinación de parámetros plasmáticos.

Los niveles plasmáticos de glucosa y triglicéridos fueron determinados mediante ensayos enzimáticos del laboratorio Wiener de Argentina⁽²⁵⁾. Los niveles circulantes de estradiol y testosterona fueron medidos por radioinmunoensayos específicos (RIAs). La insulina circulante fue determinada por RIA específico desarrollado en nuestro laboratorio⁽²⁶⁾. Por último, la concentración de leptina plasmática fue medida por un RIA específico como se describiera oportunamente⁽²⁴⁾.

Análisis de los datos

Los resultados se expresaron como los valores medios (\pm ESM). Los valores medios fueron comparados por ANOVA o ANOVA para determinaciones múltiples, seguido por comparaciones post-

hoc con prueba Fisher⁽²⁷⁾. $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

Impacto del tratamiento con E2 sobre la ingesta de comida y el peso corporal

Los animales tratados con E2 presentaron una disminución del consumo de alimento entre los días 4 y 12 postratamiento con respecto al grupo control (Figura N 1A). Este efecto fue observado cuando los niveles de E2 en circulación alcanzaron sus valores máximos ($4.120,21 \pm 188,48$ a $338,95 \pm 31,56$ pg / ml, entre los días 4 y 12 postratamiento, respectivamente). El peso corporal en el grupo E2 disminuyó inicialmente, recuperando el peso inicial a las tres semanas postratamiento con E2. A pesar de la recuperación del peso corporal (Figura N 1B) de los animales tratados con E2, nunca consiguieron alcanzar el respectivo de los animales C.

De hecho, el día experimental, los animales C fueron ($241,18 \pm 6,52$ g, $n = 18$) significativamente ($P < 0,05$) más pesados que los animales E2 ($217,23 \pm 4,17$, $n = 18$). Es importante resaltar que los niveles de E2, al momento del sacrificio, eran significativamente ($P < 0,05$) más elevados en el grupo E2 con respecto al grupo C ($155,75 \pm 13,99$ versus $65,89 \pm 7,08$ pg/ml, respectivamente).

Efectos de la administración de E2 sobre parámetros metabólicos.

No se encontraron diferencias entre ambos grupo experimentales en los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos e insulina en condiciones basales respecto a los valores del grupo C al día 61 postratamiento con E2. Sin embargo el grupo E2 presentó mayor leptinemia ($2,57 \pm 0,28$ ng/ml/100 g PC) con respecto al grupo C ($0,59 \pm 0,06$ ng/ml/100 g PC; $P < 0,05$).

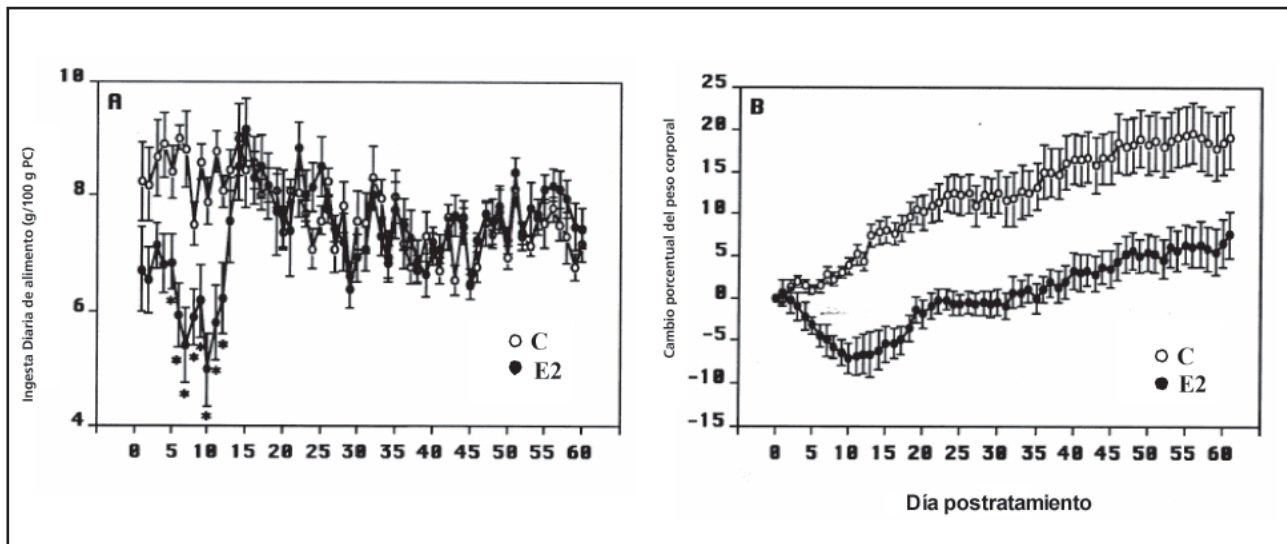


Figura 1: Impacto de la administración i.m. de vehículo sólo (100 µl de aceite de maíz; C) o conteniendo valerato de E2 (E2; 2 mg por animal) sobre la ingesta de alimento (panel A) y el peso corporal (panel B) en ratas hembra adultas. Los valores representan la media + ES (n = 24 ratas por grupo).

*, $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo C del mismo día.

Prueba de sobrecarga glucosada en animales E2 y C.

La figura N 2 muestra los resultados de la prueba de sobrecarga con glucosa antes (tiempo de muestra cero) y luego de la administración intraperitoneal (intraperitoneal i.p.) del carbohidrato. Mientras que los niveles de glucosa plasmática (Figura N° 2A) fueron equivalentes en ambos grupos experimentales a los 30 minutos, a los 60 minutos los animales E2 presentaron niveles de glucosa significativamente menores ($P < 0,05$) que los del grupo C. Se observó que a 120 minutos posgluco-

sa el grupo E2, pero no el C, recuperó los valores de glucosa circulantes iniciales. Las concentraciones de insulina circulante (Figura N° 2B) fueron similares, en ambos grupos experimentales, a los 30 y 60 minutos postadministración de glucosa. Sin embargo, a 120 minutos posglucosa, mientras que los animales del grupo E2 recuperaron la insulinemia basal, los animales C mostraron niveles de insulinemia más elevado que los respectivos valores basales ($P < 0,05$).

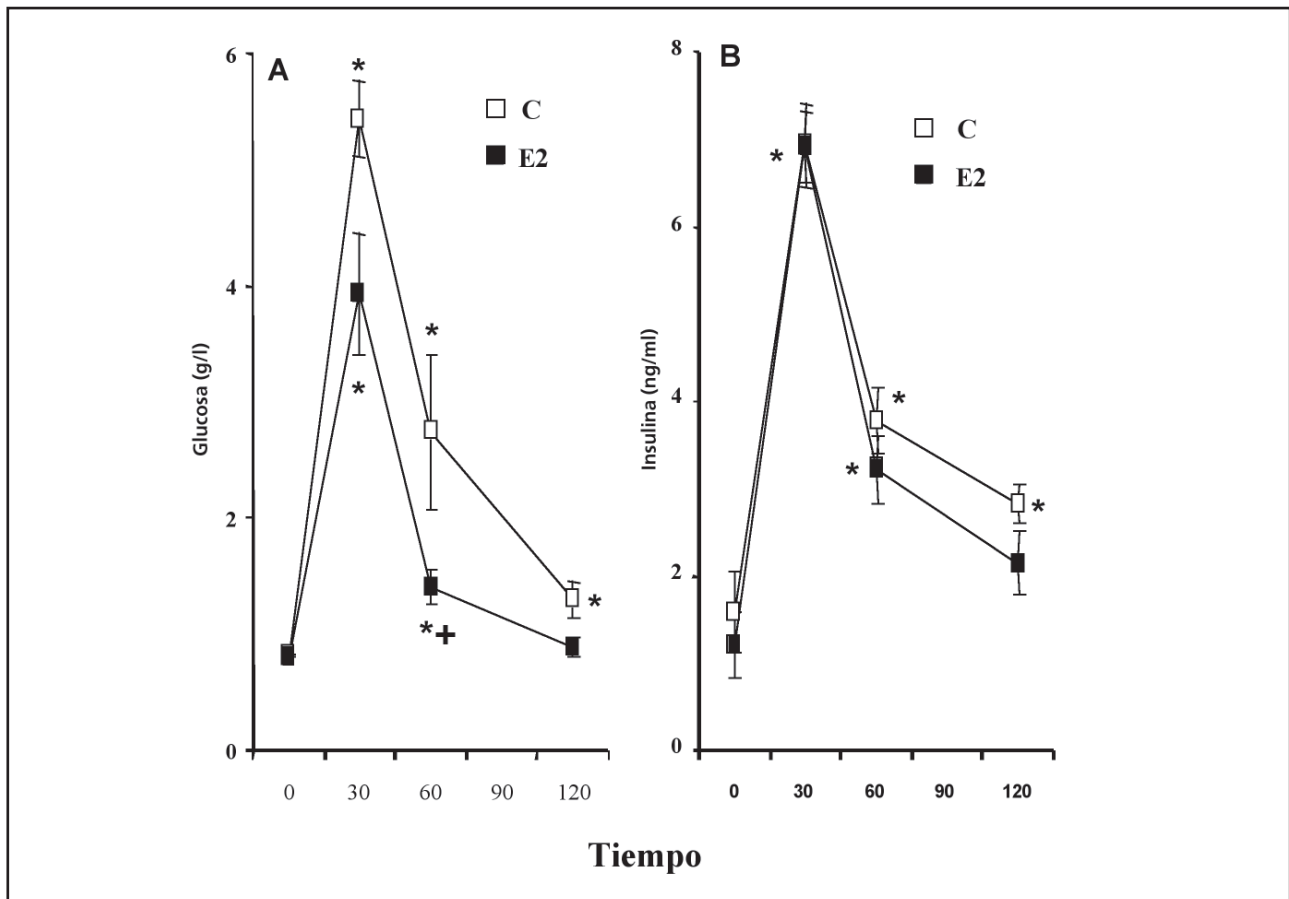


Figura 2: Niveles plasmáticos de glucosa (panel A) e insulina (panel B) antes (tiempo 0 minutos) y a diferentes tiempos (30, 60 y 120 minutos) postadministración i.p. de glucosa en animales C y E2. Los valores representan valores medios + ES (n = 8 ratas por grupo).

*, $P < 0,05$ con respecto a valores de tiempo cero del mismo grupo.

+, $P < 0,05$ con respecto a valores del grupo C del mismo tiempo.

Impacto del tratamiento con E2 sobre la masa y la función del tejido adiposo parametrial.

El grupo E2 presentó una disminución significativa de la masa de grasa parametrial total (Figura 3A) con respecto a los C. Sin embargo, la cantidad de adipocitos obtenidos después del aislamiento enzimático de la grasa parametrial, fue significativamente ($P < 0,05$) mayor en el grupo E2 ($3,42 \pm 0,49 \times 10^6$ cél.) con respecto al C ($2,01 \pm 0,34 \times 10^6$ cél.; $n = 8$ por Grupo). La Figura N° 3B, muestra los resultados de la secreción de leptina durante la incubación de adipocitos en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de insulina (0,1-2,0 nM). La liberación espontánea (basal) *in vitro* de leptina al medio de incubado, fue significativamente ($P < 0,05$) mayor en los incubados de adipocitos del grupo E2 vs. el grupo C. La presencia de distintas concentraciones de insulina en el medio de incubado indujo un incremento (sobre los valores de secreción basal) de la liberación de

leptina que resulto dependiente de la concentración de insulina utilizada. Sin embargo, este efecto se observo cuando se utilizaron células adiposas del grupo C, dado que la respuesta al estímulo con insulina estuvo ausente al utilizarse células provenientes del grupo E2.

Impacto del tratamiento con T sobre la ingesta alimentaria y el peso corporal.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con T aumentó significativamente ($P < 0,05$) el consumo de alimento entre los días 6 y 10 postandrogenización (Figura N° 4A). Este aumento en la ingesta se vio reflejado en el incremento significativo ($P < 0,05$ vs. respectivos valores del grupo C) en el peso corporal (entre los días 8 y 20 posttratamiento) (Figura N° 4B). Posteriormente, no se observaron diferencias significativas en ambos parámetros al comparar ambos grupos.

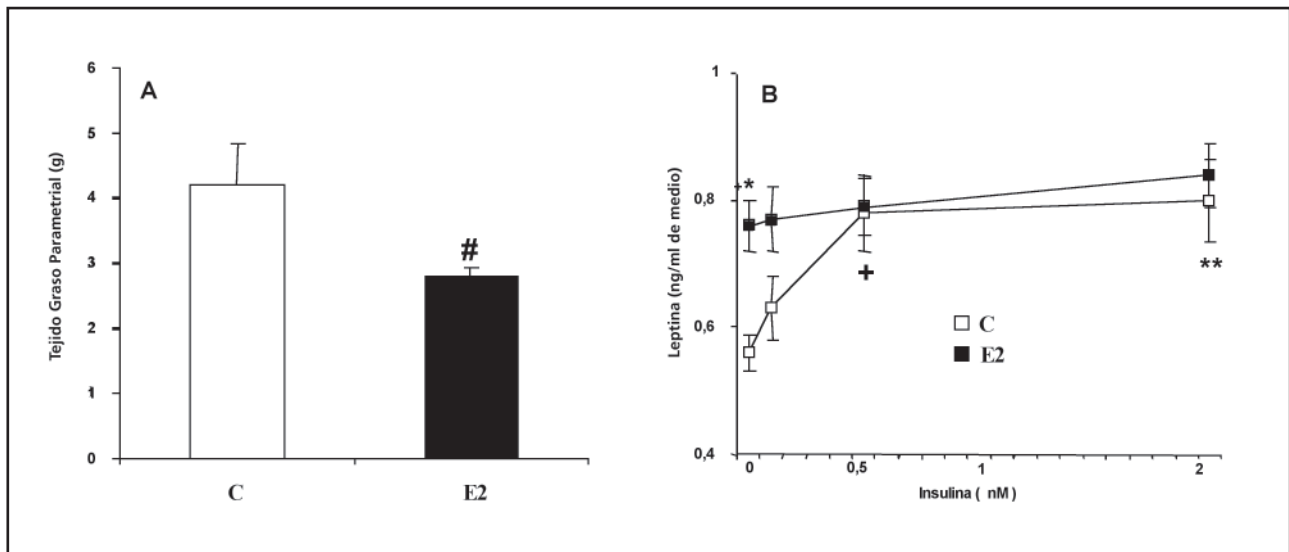


Figura 3: Masa adiposa parametrial en los grupos C y E2 (panel A). Secreción de leptina, basal y estimulada por insulina, por células adiposas aisladas de tejido graso parametrial de animales C y E2 (panel B). Los valores representan la media + ES ($n = 3$ experimentos diferentes, con 6 tubos por punto por experimento).

#, $P < 0,05$ vs. grupo C.

*, $P < 0,05$ vs. valores C a igual condición.

+, $P < 0,05$ v. valores basales del grupo C.

**., $P < 0,05$ vs. valores de insulina 0,1 nM del grupo C.

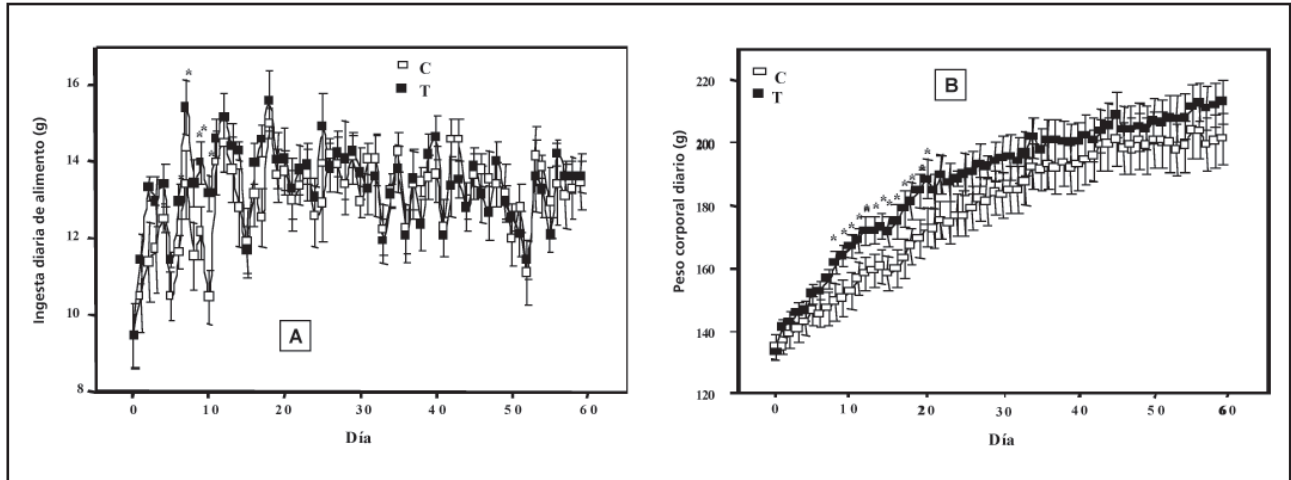


Figura 4: Impacto de la administración i.m. de vehículo sólo (100 µl de aceite de maíz; C) o conteniendo propionato de testosterona (T; 2 mg por animal) sobre la ingesta de alimento (panel A) y el peso corporal (panel B) en ratas hembra adultas. Los valores representan la media + ES (n = 24 ratas por grupo).

*, P < 0,05 vs. valores del grupo C al mismo día.

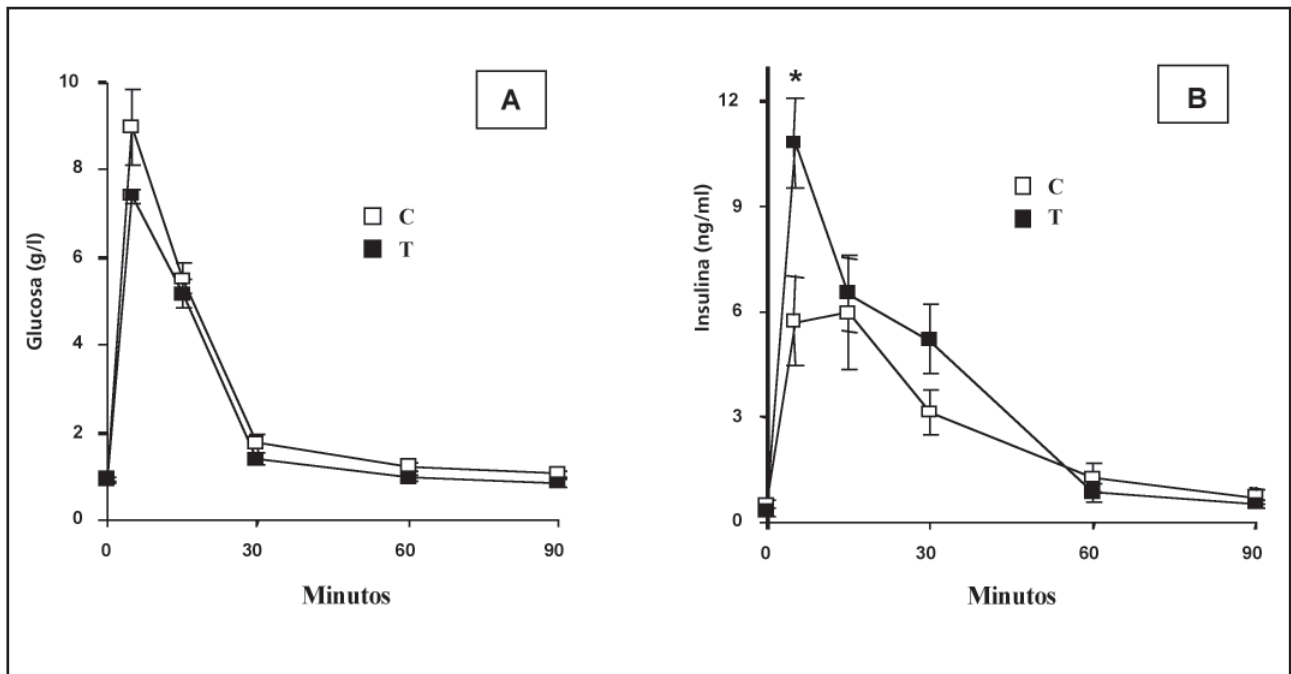


Figura 5: Resultado de los niveles plasmáticos de glucosa (panel A) e insulina (panel B) a diferentes tiempos (0, 5, 15, 30, 60 y 120 minutos) durante la prueba de sobrecarga con glucosa en los grupos C y T. Los valores representan valores medios + ES (n = 8 ratas por grupo).

*, P < 0,05 vs. valores C a igual tiempo.

Efectos de la administración de T sobre marcadores metabólicos.

Los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos, insulina y leptina en condiciones basales fueron similares en los grupos C y T (resultados no mostrados).

Prueba de sobrecarga glucosada en animales C y T.

Los resultados de la prueba de sobrecarga con glucosa muestran que los animales T desarrollaron glucemias, posglucosa, similares a las alcanzadas por los animales C (Figura 5A). Sin embargo, la respuesta normal en glucemias en el grupo T fue a expensas de un incremento significativamente

($P < 0,05$) mayor de insulina a los 5 minutos posglucosa (Figura 5B).

Impacto del tratamiento con T sobre la función del tejido graso parametrial.

La administración de T no modificó el contenido de tejido graso parametrial con respecto a los animales C a los 60 días postratamiento ($4,31 \pm 0,56$ y $5,18 \pm 0,47$ g en los grupos C y T, respectivamente). Los resultados demuestran que las células adiposas aisladas de ratas androgenizadas (grupo T) presentaron una menor respuesta a la estimulación con insulina al analizarse la concentración leptina liberada. Estos resultados se observan en la Figura N° 6, no se observaron cambios significativos en la liberación basal de leptina; sin embargo, la respuesta postestímulo con insulina fue diferente entre los dos grupos experimentales. Las tres concentraciones de insulina usadas (0,1-10 nM) indujeron un incremento significativo en la liberación de leptina al medio de cultivo de las células adiposas de animales C. En cambio, sólo la mayor concentración de insulina (10 nM) provocó un incremento significativo (vs. basal) en la secreción de leptina por los adipocitos de ratas T. Indicando que el tratamiento con el andrógeno indujo, a largo plazo, una disminución de la sensibilidad a la insulina en las células adiposas.

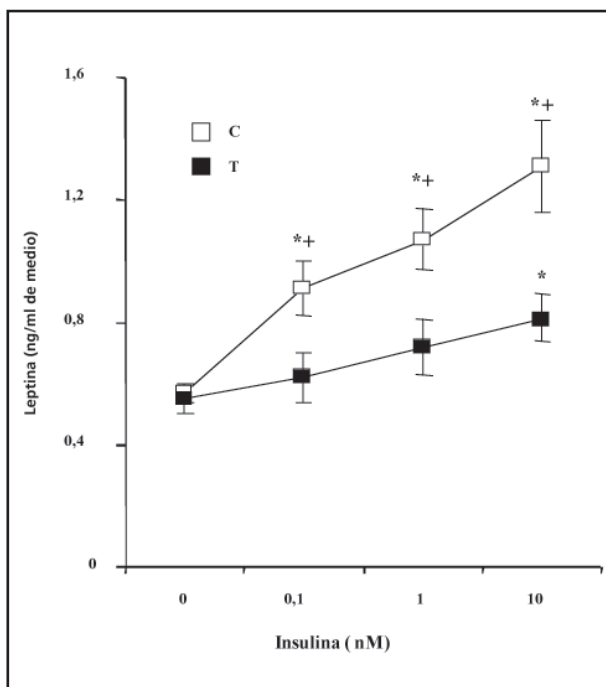


Figura 6: Secreción basal y en presencia de insulina de leptina por células adiposas de tejido graso parametrial de animales C y T. Los valores representan la media + ES (n = 3 experimentos diferentes, con 6 tubos por punto por experimento)

^{*}, $p < 0,05$ comparada con liberación basal del mismo grupo experimental.

⁺, $P < 0,05$ versus C condición similar.

Panel B; Contenido de tejido graso parametrial de los grupos C y E2

Discusión

Nuestros resultados muestran claramente la importancia del efecto de las hormonas esteroideas sexuales sobre: la ingesta alimentaria, la función endocrina del tejido adiposo y la sensibilidad periférica a la insulina. De hecho, la administración E2 resultó un potente efecto anorexígeno en los animales así tratados, en concordancia con la significativa pérdida de peso corporal, hecho ocurrido en los primeros días postratamiento, y coincidiendo con los máximos niveles de E2 alcanzados. Luego de ese período, el efecto anoréxico de E2 desaparece, y los animales normalizaron la ingesta de alimento y su peso corporal inicial. Sin embargo, el día experimental, las ratas estrogenizadas tuvieron un menor peso corporal y mayor leptinemia relativa

que los animales C. Contrariamente, el tratamiento con T corroboró el efecto orexigénico agudo de esta hormona⁽²⁸⁾, aumentando transitoriamente y en forma significativa el peso corporal. Los niveles de leptina en circulación el día experimental, fueron equivalentes en los grupos T y C, coincidiendo con el peso corporal y el tejido graso.

Es aceptado que el estradiol tiene efectos estimulantes de la adipogénesis⁽¹⁵⁾; sin embargo, también han sido descritos efectos contrarios, como incrementar la lipólisis en tejido graso parametrial⁽²⁹⁾. Los efectos positivos como negativos del E2 sobre la lipólisis y la lipogénesis, respectivamente, han sido publicados⁽³⁰⁾. Sin embargo, el efecto antilipogénico del E2 es avalado por estudios en ratones *knock-out* para el receptor de E2 que muestran hipertrofia e hiperplasia adipocitaria⁽³¹⁾, y estudios en cultivos en línea celular murina indican que el E2 inhibe la adipogénesis^(32,33), disminuyendo la expresión del ARNm del Peroxisome proliferator-activated receptor γ ⁽³²⁾. Nuestros resultados indican que el tratamiento con E2 induce un incremento de leptina plasmática como de la producción *in vitro* de esta hormona, por adipocitos parametriales. Estos resultados concuerdan con el efecto estimulador descrito de los estrógenos sobre la secreción de leptina por tejido adiposo parametrial en cultivo⁽¹⁸⁾.

Curiosamente, en nuestro modelo de estrogenización, encontramos una disminución en la masa grasa parametrial, con incremento en el número de adipocitos y la producción de leptina *in vitro*, sin alteración en el tamaño de los adipocitos, lo que podría estar indicando un aumento de la lipólisis⁽¹⁷⁾. Es posible que el incremento de leptina tuviera un papel cooperativo en el incremento de la lipólisis a través de un mecanismo autocrino⁽³⁴⁾.

Demostramos que las ratas estrogenizadas, como ocurre en otros modelos animales^(35,36), desarrollan cambios tejidos-específicos en la sensibilidad a la insulina. Los animales tratados con E2 desarrollaron *in vivo* un incremento en la sensibilidad a insulina durante la prueba de sobrecarga de glucosa; sin embargo, los estudios *in vitro* con células adiposas mostraron una paradójica disminución en la sensibilidad a insulina. Es importante resaltar que los adipocitos tuvieron una mayor

secreción basal de leptina, inhibidor de la unión de insulina a su receptor en adipocito⁽³⁷⁾. Estudios recientes en células adiposas muestran que el E2 presenta acciones duales de acuerdo a la concentración en que se encuentre en la circulación. Altas concentraciones de E2 disminuyen la sensibilidad a insulina, mientras que bajas concentraciones facilita el metabolismo glucídico en estas células⁽³⁸⁾. Aunque no podemos precisar los mecanismos exactos por los cuales se pueden explicar los cambios de sensibilidad a insulina encontrados en ratas tratadas con E2, se conoce que el incremento en la expresión de leptina⁽³⁹⁾ y la administración de estradiol⁽⁴⁰⁾ mejoran la sensibilidad a la insulina. Adicionalmente, debido a los cambios funcionales encontrados en el tejido adiposo parametrial, no podemos descartar la contribución de otras adipocinas. El factor de necrosis tumoral (TNF) podría ser uno de estos factores pues es conocido su acción inhibitoria sobre las acciones de insulina⁽⁴¹⁾ y estimulante de la secreción de leptina⁽⁴²⁾. La adiponectina⁽⁴³⁾ adipocitaria reduce los niveles de glucosa⁽⁴³⁾ e incrementa la sensibilidad a la insulina⁽⁴⁴⁾ y la oxidación de triglicéridos⁽⁴⁵⁾; y tanto adiponectina⁽⁴⁶⁾ como estradiol⁽⁴⁷⁾ suprimen la producción de TNF. Los niveles plasmáticos de adiponectina están inversamente correlacionados con el peso corporal y el contenido graso⁽⁴⁸⁾. Los animales estrogenizados presentan disminución del peso corporal y del tejido graso parametrial, por lo tanto, un posible incremento de adiponectina plasmática podría, en parte, contribuir al aumento de sensibilidad insulínica periférica.

Nuestro estudio respalda la hipótesis que sustenta el hecho que el desarrollo de insulinoresistencia en el sexo femenino depende, entre otros factores, del previo establecimiento de hiperandrogenemia; lo que a la postre resulta en severas disfunciones endocrinometabólicas.

El Síndrome de Ovario Poliquístico es un trastorno endocrino común caracterizado por anovulación, oligomenorrea, esterilidad, hiperandrogenismo, cambios en la composición corporal e insulinoresistencia en mujeres a la edad reproductiva^(49,50,51). Nuestro estudio demuestra que una androgenización transitoria induce, en ratas de sexo femenino postpuberal, 60 días después, una dismi-

nución en la sensibilidad periférica a la insulina e insulinoresistencia adipocitaria. Es importante resaltar que los niveles de testosterona plasmática a los 60 días postratamiento se encontraban normalizados.

Curiosamente, aunque los animales T presentaron insulinemia normal, luego de la prueba de sobrecarga de glucosa liberaron más insulina que las ratas normales para mantener los niveles normales de glucosa periférico. Este fenómeno es compatible con la característica encontrada en músculo^(52,53) y adipocitos (datos de este trabajo). Efectivamente, los adipocitos de animales androgenizados liberaron significativamente menos leptina, postinsulina, que los de animales normales. Estudios previos indicaban que la androgenización temprana, incluso en la edad neonatal, en ratas hembra induce resistencia insulínica en células adiposas^(54,26). Además, nuestro estudio aporta pruebas acerca del efecto perjudicial de los andrógenos sobre la sensibilidad de insulina durante la edad reproductiva, y por lo tanto un riesgo potencial para desarrollo de la diabetes tipo 2.

Compatible con nuestros datos, ratones *knock-out* para aromatasa presentan, entre otras características, hiperandrogenismo e insulinoresistencia⁽⁵⁵⁾. Niveles suprafisiológicos de testosterona circulante han sido asociados en mujeres^(56,57), aunque no en hombres⁽⁵⁸⁾, con resistencia a insulina.

Nuestros datos sobre la disfunción adipocitaria, provocado por la exposición a un ambiente elevado en testosterona, es avalado por estudios que demuestran que la función de los adipocitos es regulada por los andrógenos a través de la presencia de sus receptores específicos⁽⁵⁹⁾.

Debido a los cambios encontrados en la función del tejido de adiposo en los animales androgenizados, no podemos descartar cambios en la producción de otras adipoquinas^(60,61,62). De hecho, aunque estas moléculas no fueron medidas en el presente trabajo, se conoce que algunas de estas adipoquinas modulan la sensibilidad a la insulina^(63,64).

En resumen, nuestro trabajo muestra la importancia de las hormonas sexuales sobre las funciones adipocitaria endocrina y metabólica. Los resultados indican que aumentos transitorios de E2 o T serían suficientes para inducir cambios en la

función de las células adiposas y sensibilidad a la insulina, que se mantienen aún cuando los niveles circulantes de estas hormonas se normalizan.

Bibliografía

- 1 Hamann, A.; Matthaei, S. Regulation of energy balance by leptin. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 104:293-300, 1996.
- 2 Kalra, S. P.; Dube, M. G.; Pu, S. y col. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr. Rev.* 20:68-100, 1999.
- 3 Sar, M.; Sahu, A.; Crowley, W. R. y col. Localization of neuropeptide-Y immunoreactivity in estradiol-concentrating cells in the hypothalamus. *Endocrinology* 127:2752-2756, 1990.
- 4 Sahu, A.; Crowley, W. R.; Kalra, S. P. Evidence that hypothalamic neuropeptide Y gene expression increases before the onset of the preovulatory LH surge. *J. Neuroendocrinol.* 7:291-296, 1995.
- 5 Bonavera, J. J.; Dube, M. G.; Kalra, P. S. y col. Anorectic effects of estrogen may be mediated by decreased neuropeptide-Y release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 134:2367-2370, 1994.
- 6 Rebuffe-Scrive M.; Enk, L.; Crona, N. y col. Fat cell metabolism in different regions in women. Effect of menstrual cycle, pregnancy, and lactation. *J. Clin. Invest.* 75:1973-1976, 1985.
- 7 MacDougald, O. A.; Lane, M. D. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu. Rev. Biochem.* 64:345-373, 1995.
- 8 Butterwith, S. C. Molecular events in adipocyte development. *Pharmacol. Ther.* 6:399-411, 1994.
- 9 Hu, E.; Tontonoz, P.; Spiegelman, B. M. Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:9856-9860, 1995.
- 10 Tontonoz, P.; Hu, E.; Graves, R. A. y col. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 8:1224-1234, 1994.

- 11 Ailhaud, G.; Grimaldi, P.; Negrel, R. Trends Endocrinol. 5:132-136, 1994.
- 12 Cornelius, P.; MacDougald, O.A.; Lane, M.D. Regulation of adipocyte development Annu. Rev. Nutr. 14:99-129, 1994.
- 13 Smas, C.M.; Sul, H.S. Control of adipocyte differentiation. Biochem. J. 309:697-710, 1995.
- 14 Singh R.; Artaza J. N.; Taylor W. E. y col. Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells: nuclear translocation of androgen receptor complex with β -catenin and T-cell factor 4 may bypass canonical Wnt signaling to down-regulate adipogenic transcription factor. Endocrinology 147:141-154, 2006.
- 15 Roncari, D. A.; Van, R. L. Promotion of human adipocyte precursor replication by 17 β -estradiol in culture. J. Clin. Invest. 62:503-508, 1978.
- 16 Wade G. N.; Gray J. M. Cytoplasmic 17 beta-[3H]estradiol binding in rat adipose tissues. Endocrinology 103:1695-1701, 1978.
- 17 Dieudonne M. N.; Pecquery R.; Boumediene A. y col. Androgen receptors in human preadipocytes and adipocytes: regional specificities and regulation by sex steroids. Am. J. Physiol. 274:C1645-C1652, 1998.
- 18 Machinal, F.; Dieudonne, M. N.; Leneuve, M. C. y col. In vivo and in vitro ob gene expression and leptin secretion in rat adipocytes: evidence for a regional specific regulation by sex steroid hormones. Endocrinology 140:1567-1574, 1999.
- 19 Wiesner, G.; Vaz, M.; Collier, G. y col. Leptin is released from the human brain: influence of adiposity and gender. J. Clin. Endocrinol. Metab. 84:2270-2274, 1999.
- 20 Ghizzoni, L.; Barreca, A.; Mastorakos, G. y col. Leptin inhibits steroid biosynthesis by human granulosa-lutein cells. Horm. Metab. Res. 33:323-328, 2001.
- 21 Tena-Sempere, M., Manna, P. R., Zhang, F. P. y col. Molecular mechanisms of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptin-induced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression. J. Endocrinol. 170:413-423, 2001.
- 22 Kastin, A. J.; Akerstrom, V. Glucose and insulin increase the transport of leptin through the blood-brain barrier in normal mice but not in streptozotocin-diabetic mice. Neuroendocrinology 73:237-242, 2001.
- 23 Widdup, G.; Bryson, J. M.; Pawlak, D. y col. In vivo and in vitro suppression by leptin of glucose-stimulated insulin hypersecretion in high glucose-fed rats. European Journal of Endocrinology. 143:431-437, 2000.
- 24 Giovambattista, A.; Piermaria, J.; Suescun, M. O. y col. Direct effect of ghrelin on leptin production by cultured rat white adipocytes. Obesity 14:19-27, 2006.
- 25 Moreno, G.; Perello, M.; Camihort, G. y col. Impact of transient correction of increased adrenocortical activity in, hypothalamo-damaged, hyperadipose female rats. International Journal of Obesity 30:73-82, 2006.
- 26 Perello, M.; Castrogiovanni, D.; Moreno, G. y col. Neonatal hypothalamic androgenization in the female rat induces changes in peripheral insulin sensitivity and adiposity function at adulthood. Neuroendocrinology Letters 3/4:91-98, 2003.
- 27 Zar, J. H., 1974. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall-Englewood Cliffs, New Jersey.
- 28 Kalra, S. P.; Dube, M. G.; Pu, S. y col. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. Endocrine Reviews 20:68-100, 1999.
- 29 Darimont, C.; Delansorne, R.; Paris, J. y col. Influence of estrogenic status on the lipolytic activity of parametrial adipose tissue in vivo: an in situ microdialysis study. Endocrinology 138:1092-1096, 1997.
- 30 Bennett, P. A.; Lindell, K.; Karlsson, C. y col. Differential expression and regulation of leptin receptor isoforms in the rat brain: effects of fasting and oestrogen. Neuroendocrinology 67:29-36, 1998.
- 31 Heine, P. A.; Taylor, J. A.; Iwamoto, G. A. y col. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:12729-12734, 2000.
- 32 Dang, Z. C.; van Bezooijen, R. L.; Karperien, M. y col. Exposure of KS483 cells to estrogen enhances osteogenesis and inhibits adipogenesis. J. Bone Miner. Res. 17:394-405, 2002.

- 33 **Okazaki, R.; Inoue, D.; Shibata, M. y col.** Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinology* 143:2349-2356, 2002.
- 34 **Fruhbeck, G.; Gomez-Ambrosi, J.; Salvador, J.** Leptin-induced lipolysis opposes the tonic inhibition of endogenous adenosine in white adipocytes. *FASEB J.* 15:333-340, 2001.
- 35 **Strommer, L.; Abou El-Ella, G.; Kamel, A. y col.** Upregulation of uncoupling protein homologues in skeletal muscle but not adipose tissue in posttraumatic insulin resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281:334-340, 2001.
- 36 **Klaman, L. D.; Boss, O.; Peroni, O. D. y col.** Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* 20:5479-5489, 2000.
- 37 **Walder, K.; Filippis, A.; Clark, S. y col.** Leptin inhibits insulin binding in isolated rat adipocytes. *J. Endocrinol.* 155:R5-R7, 1997.
- 38 **Nagira K., Sasaoka T., Wada T. y col.** Altered subcellular distribution of estrogen receptor alpha is implicated in estradiol-induced dual regulation of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 147:1020-1028, 2006
- 39 **Ogawa, Y.; Masuzaki, H.; Hosoda, K. y col.** *Diabetes* 48:1822-1829, 1999.
- 40 **Escobar-Morreale, H. F.; Lasuncion, M. A.; Sancho, J.** *Fertil. Steril.* 74:816-819, 2000.
- 41 **Hotamisligil, G. S.; Shargill, N. S.; Spiegelman, B. M.** Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91, 1993.
- 42 **Zhang, H.H.; Kumar, S.; Barnett, A.H. y col.** Tumour necrosis factor-alpha exerts dual effects on human adipose leptin synthesis and release *Mol. Cell. Endocrinol.* 159:79-88, 2000.
- 43 **Scherer, P.E.; Williams, S.; Fogliano, M. y col.** A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 270:26746-26749, 1995.
- 44 **Berg, A.H.; Combs, T.P.; Du, X. y col.** The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nature Medicine* 7:947-953, 2001.
- 45 **Fruebis, J.; Tsao, T. S.; Javorschi, S. y col.** Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:2005-2010, 2001.
- 46 **Ouchi, N.; Kihara, S.; Arita, Y. y col.** Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 102:1296-1301, 2000.
- 47 **Spinedi, E., Suescun, M. O., Hadid, R. y col.** Effects of gonadectomy and sex hormone therapy on the endotoxin-stimulated hypothalamo-pituitary-adrenal axis: evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. *Endocrinology* 131:2430-2436, 1992.
- 48 **Okamoto Y.; Kihara S., Funahashi T. y col.** Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome. *Clinical Science* 110:267-278, 2006.
- 49 **Dunaif, A.** Hyperandrogenic anovulation (PCOS): a unique disorder of insulin action associated with increased risk of non-insulin dependent diabetes mellitus. *American Journal of Medicine* 98:33S-39S, 1995.
- 50 **Dunaif, A.** Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocrine Reviews* 18:774-800, 1997.
- 51 **Mantzoros, C. S.; Flier, J. S.** Insulin resistance: the clinical spectrum. *Advances in Endocrinology and Metabolism* 6:193-232, 1995.
- 52 **Holmång, A.; Svedberg, J.; Jennische, E. y col.** Effects of testosterone on muscle insulin sensitivity and morphology in female rats. *American Journal of Physiology* 259:E-55-E560, 1990.
- 53 **Holmång, A.; Larsson, B.M.; Brzezinska, Z. y col.** Effects of short-term testosterone exposure on insulin sensitivity muscles in female rats. *American Journal of Physiology* 262:E-51-E855, 1992.
- 54 **Nilsson, C.; Niklasson, M. ; Eriksson, E. y col.** Imprinting of female offspring with testosterone results in insulin resistance and changes in

- body fat distribution at adult age in rats. *Journal of Clinical Investigation* 101:74-78, 1998.
- 55 **Takeda, K.; Toda, K.; Saibara, T. y col.** Progressive development of insulin resistance phenotype in male mice with complete aromatase (CYP19) deficiency. *Journal of Endocrinology* 176:237-246, 2003
- 56 **Peiris, A. N.; Aiman, E. J.; Drucker, W. D. y col.** The relative contributions of hepatic and peripheral tissues to insulin resistance in hyperandrogenic women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 68:715-720, 1989
- 57 **Polderman, K. H.; Govren, L. I.; Asscheman, H. y col.** Induction of insulin resistance by androgens and estrogens. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 79:265-291, 1994
- 58 **Marin, P.; Oden, B.; Bjorntorp, P.** Assimilation and mobilization of triglycerides in subcutaneous abdominal and femoral adipose tissue in vivo in men: effects of androgens. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80:239-243, 1995
- 59 **Sjogren, J.; Li, M.; Bjorntorp, P.** Androgen hormone binding to adipose tissue in rats. *Biochimica et Biophysica Acta* 1244:117-120, 1995
- 60 **Monzillo, L. U.; Hamdy, O.; Horton, E. S. y col.** Effect of lifestyle modification on adipokine levels in obese subjects with insulin resistance. *Obesity Research* 11:1048-1054, 2003
- 61 **Nishizawa, H.; Shimomura, I.; Kishida, K. y col.** Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* 51:2734-2741, 2002
- 62 **Xu, A.; Chan, K. W.; Hoo, R. L. y col.** Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 280:18073-18080, 2005
- 63 **Hotamisligil, G. S.; Shargill, N. S.; Spiegelman, B. M.** Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91, 1993.
- 64 **Steppan, C. M.; Lazar, M.A.** Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 13:18-23, 2002