

Hospital Municipal de Infecciosos de Barcelona.
Departamento de Investigación.
Sección de Inmunoquímica (Jefe: Dr. J. Gras)

Influencia de la metandrostenolona sobre la actividad glucosa-6-fosfatasa del hígado de ratón

por

C. Soler-Argilaga, M. Foz y M.^a T. Vidal

(Recibido para publicar el 5 de noviembre de 1965)

En torno a la influencia de los esteroides anabolizantes sobre el metabolismo hidrocarbonado, son relativamente escasos los trabajos que han aparecido, pero suficientes para afirmar que tales derivados androgénicos ejercen una evidente acción modificadora sobre el mismo. Movidos por nuestras propias observaciones de carácter clínico en este sentido (13, 14) y aprovechando los estudios llevados a cabo por uno de nosotros (3) acerca de la actividad glucosa-6-fosfatásica en suero humano, decidimos efectuar los trabajos pertinentes para detectar la glucosa-6-fosfatasa en el hígado de ratón (4) y tratar con ello de ensayar la posible influencia que la metandrostenolona ejerce sobre la referida enzima.

A propósito, pues, de la acción de la metandrostenolona sobre la actividad de una enzima de tanta importancia en la glucogenolisis hepática, intentaremos hacer una crítica de los mecanismos a través de los cuales pueden los esteroides anabolizantes dejar sentir su efecto sobre los glúcidos.

Los estudios sobre este tema conti-

buyen, por una parte, al conocimiento de los complejos procesos del metabolismo intermediario y, por otra, permiten vislumbrar el posible papel que tales fármacos pueden desarrollar en el tratamiento de la diabetes u otro trastorno del metabolismo de los carbohidratos.

Material y métodos

Animal de experimentación. Se utilizaron 48 ratones machos de la colonia de nuestro laboratorio, cuya edad estaba comprendida entre 24 y 31 días.

Técnica del ensayo. El total de ratones se distribuyó en 8 lotes. Tres ratones de cada lote formaron el grupo problema, y los tres restantes el grupo testigo. Ambos grupos fueron sometidos al mismo ambiente y alimentación. Durante el ensayo, el grupo problema disponía para beber de una mezcla de un preparado comercial de metandrostenolona * en

(*) Agradecemos a CIBA, S. A. de Productos Químicos las muestras de metandrostenolona y excipiente, utilizadas en esta experiencia

agua, a una concentración del 20 por 100. El líquido de bebida de los ratones testigo, durante igual período, era una mezcla acuosa del excipiente del referido preparado comercial, a la misma concentración. Transcurridos los 10 días que duró cada una de las experiencias, se procedió a sacrificar los animales y a efectuar una inmediata hepatectomía.

Determinación de la actividad glucosa-6-fosfatásica hepática. Se utilizó la técnica que con detalle referimos en otro lugar ⁴ y que seguidamente resumimos:

Obtenidos los correspondientes homogeneizados de hígado se procede a la incubación del sistema «problema» — con homogeneizado, substrato glucosa-6-fosfato (G-6-F) y buffer pH 6,6 — y del «blanco» — con los mismos substrato y buffer, sin homogeneizado—. Utilizamos como substrato la sal sódica de G-6-F, obtenida de la sal bárica; y como buffer el sistema TRIS-ácido maleico. La determinación del fósforo liberado se efectúa por el método de FISKE y SUBBAROW. Expresamos la actividad enzimática en μg de fósforo inorgánico por mg. de proteína del homogeneizado. Tomamos como unidad de actividad glucosa-6-fosfatásica la correspondiente a 1 mg. de proteína del homogeneizado que libera 1 μg de fósforo durante una hora de incubación a 37° C.

Todas las determinaciones de la actividad glucosa-6-fosfatásica se efectuaron por duplicado.

Estudio histológico. Se obtuvieron fragmentos de hígado, inmediatamente después del sacrificio de los animales. La fijación se efectuó en alcohol absoluto y en formol al 10 por 100. Seguidamente se procedió a su inclusión en parafina y a las tinciones con H. E. y P. A. S.

Resultados

Actividad glucosa-6-fosfatásica. En el cuadro I vienen consignados los resul-

tados de la actividad glucosa-6-fosfatásica hepática en los ratones pertenecientes a los grupos problema (tratados con metandrostenolona) y testigo. El valor promedio de la actividad glucosa-6-fosfatásica en los ratones del primer grupo es inferior ($0,05 < P < 0,10$) al registrado en el grupo testigo.

Estudio histológico. La estructura general de los distintos fragmentos de parénquima hepático se encuentra conservada.

El estudio comparativo de ambas series demuestra que no se aprecian diferencias valorables. No se observan lesiones de tipo vacuolar en las células hepáticas como las que describimos en el hígado humano tras un tratamiento con metandrostenolona ¹³. La cantidad de glucógeno hepático es sensiblemente igual en las series tratadas y en las de control. No hemos observado tampoco lesiones de edema, ni lipofuscina intracelular.

Discusión

Aun cuando la valoración estadística de nuestros resultados no nos permita excluir que el azar pueda haber influido en la diferencia entre la actividad glucosa-6-fosfatásica registrada en los ratones problema y testigo, creemos verosímil la posibilidad de que la metandrostenolona inhiba — probablemente en forma secundaria — la referida actividad enzimática.

No pretendemos con ello explicar la capacidad modificadora de la metandrostenolona — y en general de los anabólicos — sobre el metabolismo de los glúcidos, a través de la inactivación enzimática de la glucosa-6-fosfatasa, que, de ser cierta, vendría condicionada posiblemente por una disminución de la glucogénesis.

Haremos de nuevo referencia sobre este punto en el curso de la discusión

CUADRO I. -- Valores comparativos de la actividad glucosa-6-fosfatásica hepática en dos grupos de ratones: grupo problema (tratado con metandrostenolona) y grupo testigo.

Ratón n.º	Actividad glucosa-6-fosfatásica (U.)	
	Grupo testigo	Grupo problema
1	25,1	15,5
2	12,9	10,4
3	15,0	15,3
4	25,4	26,9
5	27,7	20,2
6	27,4	28,4
7	33,1	26,0
8	43,0	20,5
9	34,1	32,0
10	66,8	34,5
11	56,5	51,1
12	58,8	53,3
13	16,6	32,0
14	28,3	27,9
15	32,5	15,6
16	32,5	34,4
17	31,7	30,1
18	37,6	23,0
19	34,9	33,1
20	27,5	34,6
21	29,3	36,1
22	37,3	32,6
23	32,9	33,0
24	35,5	32,4
Promedio ($\pm \sigma$)	33,4 ($\pm 12,6$)	29,1 ($\pm 11,3$)
	0,5 < P < 0,10	

de una serie de datos, recogidos de la literatura y de nuestra propia experiencia, relacionados con el problema que nos ocupa; en ellos cimentamos la hipótesis para explicar, si no todos, la mayoría de los efectos que los esteroides anabolizantes ejercen sobre el metabolismo de los glúcidos.

Glucemia basal. La glucemia basal descende en el curso de un tratamiento anabolizante (10, 14). Ello pudiera obedecer a una inhibición de la glucogenolisis hepática o a un mayor consumo perifé-

rico de glucosa. En contra de la última posibilidad está la observación de que no existe diferencia significativa entre los niveles de glucosa registrados en sangre venosa y capilar (10). Es muy posible, por tanto que sea una menor liberación hepática de glucosa al torrente circulatorio la responsable de la tendencia a la hipoglucemia que presentan los pacientes sometidos a terapéutica anabólica. La inhibición de la glucosa-6-fosfatasa que ello supone podría ser en parte consecutiva a una menor neoglucogénesis — los esteroides anabolizantes dejarían al hígado en un estado carencial de aminoácidos que pueden seguir la vía neoglucogénica, al incrementar la síntesis proteica a nivel del músculo —. Apoya esta forma de pensar el hecho de que la actividad glucosa-6-fosfatásica está aumentada en los casos en que es mayor la neoglucogénesis — dieta pobre en glúcidos (6), administración de glucocorticoides (2, 18, 20), diabetes aloxánica (1, 7) — y disminuye cuando, como sucede tras la adrenalectomía (5, 19, 20, 23), la neoglucogénesis es menos intensa.

Por otra parte una inhibición primaria exclusiva de la glucosa-6-fosfatasa acarrearía un acúmulo de glucógeno en el hígado, cosa que está en desacuerdo con los resultados obtenidos por THOMAS (17) en el ratón y con la escasez de glucógeno que tuvimos ocasión de observar en las preparaciones histológicas correspondientes a las biopsias hepáticas practicadas a cuatro pacientes en el curso de un tratamiento con metandrostenolona (15).

Tolerancia a la glucosa. LANDON y cols. (10) pusieron de relieve que la metandrostenolona — lo mismo sucede, al parecer, con los restantes anabolizantes — disminuye la tolerancia a la glucosa, tanto por vía oral como parenteral. Por esta razón, tal fenómeno no puede depender de cambios en el ritmo de absorción entérica de la glucosa. La inalterabilidad de las curvas de piruvato

durante el tratamiento anabolizante excluye asimismo que este fármaco altere el consumo hístico de glucosa.

Creemos que la curva «diabetoide» que se registra durante el tratamiento anabolizante, análoga a la que puede observarse en ciertas hepatopatías y estados de inanición, puede imputarse a una deficiente capacidad glucogénica del hígado.

Test de glucagón. En un estudio clínico efectuado por uno de nosotros (14) para objetivar la influencia que los esteroides anabolizantes ejercen sobre algunos test relacionados con el metabolismo hidrocarbonado, llegábamos, entre otras, a la siguiente conclusión: «la metandrostenolona, y quizá también el decaonato de nandrolona, disminuye el efecto glucogenolítico hiperglucemiante del glucagón». Análogas observaciones han sido efectuadas por LANDON y cols. (11) (metandrostenolona), HAZELWOOD y O'BRIEN (8) (noretandrolona), WEISENFELD²¹ (noretandrolona), y WEISENFELD y GOLDNER (22) (testosterona, propionato de testosterona, metiltestosterona y noretandrolona). Creemos, como estos autores, que los esteroides anabolizantes inhiben la glucogénesis y, por ello, disminuyen las reservas de glucógeno hepático. A este empobrecimiento del contenido hepático de glucógeno estaría condicionada la menor respuesta hiperglucemiante que depara la inyección de glucagón en los pacientes sometidos a terapéutica anabólica.

Por las razones aludidas en los párrafos anteriores no parece probable que la modificada respuesta de un sujeto frente al glucagón, después de administrar un esteroide anabolizante, sea debida al bloqueo primario de la glucogenolisis o al aumento del consumo periférico de glucosa. Se opone también a esta última posibilidad la ausencia de la variación normal del fósforo inorgánico registrada en tales condiciones (11).

Test de insulina y test de tolbutamida. Según LANDON y cols. (11), la administración de metandrostenolona no dio lugar a alteración alguna de la sensibilidad a la insulina, o bien, en todo caso, una mayor resistencia frente a esta hormona. En contraste con estos resultados y los obtenidos por KOCHAKIAN y COSTA (9) están las aportaciones de TAALAT y cols. (16), quienes registraron una mayor respuesta a la insulina durante el tratamiento con propionato de testosterona. Personalmente¹¹ pusimos de manifiesto en pacientes diabéticos que, tras la administración de fenilpropionato de nandrolona, aumentaba la sensibilidad a la insulina, es decir, la inyección endovenosa de insulina (0,05 U. por kg de peso) producía un descenso más profundo y sostenido después de recibir el esteroide anabolizante, que antes de su administración.

Resulta difícil dar una explicación a las referidas observaciones, máxime teniendo en cuenta la contradicción de las mismas.

Encierra asimismo dificultad averiguar cuál es el mecanismo responsable del aumento de la respuesta insulínica a la inyección intravenosa de tolbutamida, sin afectarse la caída de glucemia, que LANDON y cols. (12) han registrado consecutivamente a un tratamiento con metandrostenolona.

En resumen, los esteroides anabolizantes, a nuestro juicio, ejercen una influencia sobre el metabolismo de los hidratos de carbono en el hígado, a través de una acción inhibitoria de la glucogénesis. Posiblemente la acción activadora de la síntesis proteica hística — en especial muscular — que ejercen los anabolizantes, coloque a la víscera hepática en un estadio carencial de aminoácidos, capaces de seguir la vía neoglucogénica. Atribuimos la posible disminución de la actividad glucosa-6-fosfatásica del hígado al déficit de la glucogénesis, que en último término constituye la causa primordial de las modificaciones del metabolismo

glucídico que se registran en el curso de la terapéutica anabólica.

La posible o posibles influencias que a otros niveles puedan desarrollar los anabolizantes sobre el metabolismo de los glúcidos serían, al parecer, de menor importancia; sin embargo, debemos esperar ulteriores estudios para conocer más y mejor tan interesante problema.

Agradecemos las acertadas indicaciones que amablemente nos ha facilitado el Dr. Gras.

Resumen

Se estudia la influencia de la metandrostenolona sobre la actividad glucosa-6-fosfática del hígado de ratón. En el lote de ratones tratados se registró un valor promedio de actividad enzimática inferior al del lote testigo ($0,05 < P < 0,10$). Finalmente se formula una hipótesis sobre el posible mecanismo de acción de los esteroides anabolizantes sobre el metabolismo hidrocarbonado.

Summary

Influence of metandrostenolone on the glucose-6-phosphatase activity of the liver of the mouse.

There are few works published about the action of the anabolic steroids upon the carbohydrate metabolism. Nevertheless, such an action has been proved. So, we thought it should be interesting to investigate how the glucose-6-phosphatase activity of the mouse liver is influenced by the metandrostenolone.

Forty-eight male mice were employed, whose age ranged from 24 to 31 days. They were distributed into 8 lots. Each lot consisted both of a problem-group and a control-group of three mice each. Both groups were held under the same ambient and food. The problem-group had to drink a 20 % concentration of a commercial preparation of metandrostenolone. The control-group had to drink, in turn, the same liquor without the hormone. After 10 days the animals were killed, and immediately hepatectomized.

After the corresponding liver homogenization, both systems were incubated, in each case with a test-system and a blank-system. The test-system consisting of a corresponding homogenate, G-6-P substrate (glucose-6-phosphate) and a pH 6,6 buffer, and the blank system consisting of the same substrate and buffer, but without homogenate. The substrate was G-6-P sodium salt obtained from barium salt. As a buffer the TRIS-malic acid was employed. The freed-phosphorus was determined by means of the Fiske & Subbarow method. As a unit of G-6-P activity we took that corresponding to the liberation of $1 \mu\text{g.P}/1$ hour at 37° /mg. protein in the homogenate. All determinations were carried out in duplicate. The liver fragments from both groups were submitted to an histological examination.

The hepatic glucose-6-phosphatase activity in the problem-group was inferior to that one in the control-group ($0,05 < P < 0,10$). No histological differences were noticed between the two groups. Although the statistic valuation of results does not allow to exclude the chance, there seems to be a probability that the hepatic glucose-6-phosphatase activity is reduced by the metandrostenolone.

The different alterations of the carbohydrate metabolism due to anabolizers, such as the diminution of the basal glucaemia, the diabetic glucaemia curve, and the diminution of the glycogenolytic effect of the glucagon, all of them verified by different workers, seem to have a common nexus, namely the decrease of the glycogenesis. It is possible that this decrease is worked on by a decline of the glyconeogenesis due to a diminution of a amino-acids pool produced by the increase of muscle protein synthesis. Whatever the bearings of diminution of the glycogenesis may be, it is to be seen that the probable decrease in glucose-6-phosphatase activity must be a

secondary fact, because a primary failure of this enzyme would not explain all of the alterations undergone by the carbohydrate metabolism, on one hand, and it would be followed by an increase of the hepatic glycogen, on the other hand, which is quite a fact to be rejected, such as some of our observations have shown.

Bibliografía

- (1) ASHMORE, J., HASTINGS, A. B. y NESBETT, F. B. : *Proc. nat. Acad. Sci.*, **40**, 673, 1954.
- (2) ASHMORE, J.; HASTING, A. B.; NESBETT, F. B. RENOLD, A. E. : *J. Biol. Chem.*, **218**, 77, 1956.
- (3) FOZ, M. : Pendiente publicación. Tesis doctoral, 1965.
- (4) FOZ, M. y SOLER-ARGILAGA, C. : *R. esp. Fisiol.* (en prensa).
- (5) FREEDLAND, R. A. y BARNES, J. K. : *J. Biol. Chem.*, **238**, 1915, 1963.
- (6) FREEDLAND, R. A. y HARPER, A. E. : *J. Biol. Chem.*, **228**, 743, 1957.
- (7) HARPER, A. E. : *Biochem. J.*, **71**, 702, 1959.
- (8) HAZELWOOD, R. L. y O'BRIEN, K. D. : *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **106**, 851, 1961.
- (9) KOCHAKIAN, C. D. y COSTA, G. : *Endocrinology*, **65**, 298, 1959.
- (10) LANDON, J., WYNN, V. y COOKE, J. C. : *Metabolism*, **11**, 501, 1962.
- (11) LANDON, J., WYNN, V. y COOKE, J. C. : *Metabolism*, **11**, 513, 1962.
- (12) LANDON, J., WYNN, V. y SAMOLS, E. : *Metabolism*, **12**, 924, 1963.
- (13) SOLER-ARGILAGA, C. : *Med. clin.*, **40**, 334, 1963.
- (14) SOLER-ARGILAGA, C. : *An. Med.*, **50**, 203, 1964.
- (15) SOLER-ARGILAGA, C., SANS-SABRAFEN, J., VIDAL, M.^a T., GRAS, J. BACARDI, R. y LLOMBART, D. : *Rev. clin. Esp.*, **87**, 212, 1962.
- (16) TAALAT, M., HABIB, Y. A. y HABIB, M. : *Arch. int. Pharmacodyn.*, **111**, 215, 1957.
- (17) THOMAS, J. A. : *Metabolism*, **13**, 63, 1964.
- (18) WEBER, G., ALLARD, C., DE LAMIRANDE, G. y CANTERO, A. : *Biochim. biophys. Acta Prev.*, **16**, 618, 1955.
- (19) WEBER, G., BANERJEE, G. y BRONSTEIN, S. B. : *J. Biol. Chem.*, **236**, 3106, 1961.
- (20) WEBER, G. y CANTERO, A. : *Endocrinology*, **61**, 701, 1957.
- (21) WEISENFELD, S. : *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **97**, 764, 1958.
- (22) WEISENFELD, S. y GOLDNER, M. G. : *J. clin. Endocr.*, **20**, 700, 1960.
- (23) WILLMER, J. S. : *Canad. J. Biochem.*, **38**, 1449, 1960.