

© 2023 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 26: 1-11, 2023.

<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2023.618>

El tratamiento con testosterona regula positivamente los niveles de proteína y ARNm de la enzima superóxido dismutasa dependiente de Mn en los islotes pancreáticos de ratas macho (*Rattus norvegicus*)

Tonantzin Citlali Sosa-Larios¹, Angélica Morales-Miranda¹,
Martín Palomar-Morales², Alberto Rojas-Ochoa³,
Nelly Rodríguez-Peña⁴ y Sumiko Morimoto^{1*}

¹Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, Vasco de Quiroga #15, Belisario Domínguez-Sección XVI, Alcaldía Tlalpan, 14080, Ciudad de México, México. ²UMF, ⁴UBIPRO Facultad de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM, Ciudad de México, México. ³Laboratorio de Oncología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México, México. E-mail: *sumiko.morimoto@incmnsz.mx

RESUMEN

El aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno daña a los islotes pancreáticos por estrés oxidativo y apoptosis en algunos modelos de diabetes en roedores. Se ha observado que la testosterona los protege contra este daño, sin embargo, no se conoce el mecanismo por el cual esta hormona ejerce su protección. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la administración de testosterona a ratas macho gonadectomizadas sobre la expresión de las enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa dependiente de Mn (MnSOD) y catalasa. La expresión de las enzimas a nivel de la proteína, se estudió por inmunohistoquímica en ratas macho intactas, gonadectomizadas y gonadectomizadas tratadas con testosterona. La expresión del ARNm se analizó por retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, en islotes pancreáticos cultivados con testosterona, dihidrotestosterona (DHT) o vehículo. En el caso de la catalasa, el tratamiento con testosterona solamente aumentó la expresión del ARNm. La testosterona indujo la sobreexpresión de la proteína de MnSOD y del ARNm en los islotes pancreáticos a través de un mecanismo no relacionado con la aromatización androgénica, en el que muy probablemente intervienen los receptores de andrógenos, lo que demuestra la participación de la testosterona en la prevención de los daños causados por el estrés oxidativo en las células productoras de insulina.

Palabras clave: andrógenos, enzimas antioxidantes, estrés oxidativo, células beta pancreáticas, *Rattus norvegicus*.

Testosterone treatment positively regulates protein and mRNA levels of Mn-dependent superoxide dismutase enzyme in pancreatic islets of male rats (*Rattus norvegicus*)

ABSTRACT

The androgenic hormone testosterone protects against pharmacological-induced damage to pancreatic islets in rodent models of diabetes. The increased production of reactive oxygen species damage the pancreatic islets through oxidative stress and apoptosis. The precise protective mechanism of testosterone has yet to be determined. The aim of this study was to evaluate the effect of post-gonadectomy testosterone substitution on the expression of two key antioxidant enzymes, Mn-dependent superoxide dismutase and catalase. The protein expression of the enzymes was examined by immunohistochemistry in male rats: intact, gonadectomized, and gonadectomized followed by testosterone substitution. mRNA expression was analyzed by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction on pancreatic islets cultured with testosterone, dihydrotestosterone (DHT) or the vehicle. Testosterone increased the protein level of MnSOD in pancreatic tissue and its mRNA expression in cultured pancreatic islets. DHT (a non-aromatizing androgen) had similar effects. For catalase, only the mRNA expression increased by testosterone treatment. Testosterone induced overexpression of MnSOD protein and mRNA in pancreatic islets through a mechanism unrelated to androgen aromatization, most likely involving androgen receptors, demonstrating the implications of testosterone in preventing damage to insulin-producing cells by oxidative stress.

Key Words: androgens, antioxidant enzymes, oxidative stress, pancreatic beta cells, *Rattus norvegicus*.

Artículo recibido el 25 de abril del 2023.

Artículo aceptado el 13 de diciembre del 2023.

INTRODUCCIÓN

Los islotes pancreáticos tienen una capacidad antioxidante reducida comparada con otros tejidos (Wang *et al.*, 2017; Lenzen, 2017), es por esto que la disfunción y apoptosis de las células beta se han asociado a los efectos del estrés oxidativo (Eguchi, Vaziri, Dafoe & Ichii, 2021; Drews & Düffer, 2012) en modelos animales de diabetes (Salazar-García & Corona 2021; Lee *et al.*, 2012) y en pacientes diabéticos (Mizukami *et al.*, 2014; Yaribeygi, Sathyapalan, Atkin & Sahebkar, 2020).

El tratamiento con estreptozotocina (STZ) en roedores incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que resulta en estrés oxidativo que afecta a las células beta pancreáticas (Sasikumar, Jyoti Das & Chandra Deka, 2021; Zhang *et al.*, 2016) además de favorecer su muerte por apoptosis (King, 2012). Nuestro grupo de trabajo demostró el efecto protector de los andrógenos en contra del daño por apoptosis temprana producido en las células beta pancreáticas (Morimoto *et al.*, 2005). En este estudio se encontró que la testosterona protegía directamente a las células beta en contra del daño producido por el tratamiento con STZ (50 mg/kg de peso); dado que este efecto fue totalmente bloqueado por la flutamida (antagonista del receptor de andrógenos) se demostró que el receptor de andrógenos tiene un papel central en este efecto protector (Morimoto *et al.*, 2005). La participación de los receptores de andrógenos en el efecto protector inducido por la testosterona está respaldada por evidencias previas de su expresión y regulación en el páncreas de rata (Pousette, 1976; Díaz-Sánchez, Morimoto, Morales, Robles-Díaz & Cerbón, 1995). Además, recientemente se ha demostrado la localización de los receptores de andrógenos en el núcleo de las células beta pancreáticas de ratas macho, así como en la línea celular INS-1 de las células beta pancreáticas (Harada *et al.*, 2015, 2018). Como prueba adicional de la participación de los receptores de andrógenos, la citoprotección proporcionada por la testosterona es específica del género y parece estar vinculada a los niveles diferenciales de las enzimas antioxidantes presentes en ratas hembra y macho (Palomar-Morales, Morimoto, Mendoza-Rodríguez & Cerbón, 2010).

Aunque se sabe que la testosterona reduce el daño por apoptosis en las células beta pancreáticas (Morimoto *et al.*, 2005; Harada *et al.*, 2015, 2018), el mecanismo a través del cual se da la protección no está del todo claro. Una posibilidad es que la testosterona ejerza su efecto protector a través de la inducción de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD) y la catalasa. La MnSOD está en la primera línea de defensa antioxidante, neutraliza el oxígeno singulete y convierte espontáneamente los radicales superóxido en peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Posteriormente, la catalasa promueve la descomposición del H₂O₂ (Wang *et al.*, 2017). El objetivo del presente estudio fue explorar el posible papel de la testosterona en la regulación

de los niveles de proteína y de la expresión génica de dos enzimas antioxidantes, la MnSOD y la catalasa, en los islotes pancreáticos de ratas macho.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Todos los procedimientos realizados fueron llevados a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Se trabajó con ratas Wistar machos de 200 a 250 g de peso, procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, “Salvador Zubirán” (INCMNSZ). Los animales se alojaron en cajas de acrílico (Macrolon, Tipo III, México) a razón de 5 animales por caja y se mantuvieron bajo condiciones de 12/12 horas luz/obscuridad a una temperatura de 22 ± 1 °C y a una humedad relativa de 50-80%. La comida que se les proporcionó fue alimento estándar para roedores y agua *ad libitum*. Se plantearon dos aproximaciones experimentales, *in vivo* e *in vitro*, en el modelo *in vivo* se estudió el nivel de la proteína de las enzimas MnSOD y catalasa. En el modelo *in vitro* se estudió la expresión del ARNm de estas dos enzimas antioxidantes.

Modelo *in vivo*

Grupos experimentales

Para estudiar el efecto de la testosterona en la expresión de la proteína de las enzimas MnSOD y catalasa en el páncreas de ratas macho adultas, se hicieron 3 grupos (5 ratas por grupo) a los cuales se asignaron las ratas aleatoriamente. El grupo 1, fueron las ratas control; el grupo 2, las ratas gonadectomizadas e inyectadas con el vehículo; y el grupo 3, las ratas gonadectomizadas y tratadas con testosterona (enantato de testosterona; Shering Mexicana, Ciudad de México, México).

Tratamientos

Las ratas de los grupos 2 y 3 se gonadectomizaron bajo anestesia con ketamina-xilazina (Ritschl *et al.*, 2015). La cirugía inició con una incisión a través del saco escrotal para abrir la cavidad peritoneal y exponer los testículos. El paquete testicular se ligó con sutura de seda 4-0 antes de suturar la incisión. A las 72 horas posteriores a la gonadectomía, las ratas del grupo 2 recibieron una inyección intramuscular del vehículo (500 µL de aceite de maíz) y las del grupo 3 recibieron una inyección de enantato de testosterona (5 mg/kg de peso) en una dosis única. Para determinar el tiempo ideal de la administración de testosterona post-gonadectomía, se realizó una curva de concentraciones de testosterona en suero contra los días después del tratamiento (datos no mostrados). Tres días después del tratamiento con testosterona, se procedió a la eutanasia de las ratas, al aplicarles una sobredosis de anestesia y tomarles muestras de sangre por punción cardíaca (Parasuraman, Raveendran & Kesavan, 2010). Las muestras sanguíneas se centrifugaron para obtener el suero, que se almacenó a -20°C hasta su análisis.

Cuantificaci3n de glucosa y diversas hormonas

Las concentraciones de glucosa, insulina, estradiol y testosterona se midieron en el suero de las ratas. Las hormonas se cuantificaron por radioinmunoanálisis (RIA) especí­fico, usando estuches comerciales (Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, USA) y con base en las instrucciones del protocolo incluido en el estuche. La sensibilidad del RIA fue de 0.05 ng/mL para insulina, 5 pg/mL para estradiol y 2.47 pg/mL para testosterona. Los coeficientes de variaci3n intra- e inter-ensayo fueron de 3.6% y 6%, 5.3% y 8%, 4.9 y 8.2%, respectivamente. La concentraci3n de glucosa fue cuantificada con un gluc3metro portátil (Prestige Smart System, Home Diagnostics, Ft Lauderdale, FL, USA).

Análisis de la proteína por inmunohistoquímica

El tejido pancreático fue disecado y fijado en paraformaldehído al 4% (p/v) en soluci3n salina de fosfatos (PBS, 100 mM, pH 7.4). El tejido se deshidrat3 sumergiéndolo en una soluci3n de etanol en concentraciones crecientes (25, 50, 70, 80, 96%, absoluto), se enjuag3 con xileno y se incluy3 en parafina (Paraplast Plus, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Se hicieron cortes histol3gicos de 5 µm de grosor de los bloques de páncreas y se montaron en laminillas recubiertas con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Los cortes fueron desparafinados sumergiéndolos en xileno (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) y despu3s rehidratados en etanol en concentraciones decrecientes. La actividad end3gena de la peroxidasa se bloque3 con 3% de H₂O₂/ metanol (v/v) a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Para prevenir la uni3n no especí­fica del anticuerpo, los cortes de tejido se incubaron en 10% de suero normal diluido en soluci3n salina de fosfatos (PBS) con albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) al 1% (p/v), durante 60 minutos. Despu3s de lavar las preparaciones con PBS, se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario, para la detecci3n de MnSOD (E-10 sc-137254; diluci3n, 1:150) o de catalasa (H-9, sc-271803; diluci3n, 1:100). Al final de la incubaci3n las preparaciones se enjuagaron con PBS por 10 minutos. La detecci3n del anticuerpo primario, se llev3 a cabo con el uso de un anticuerpo secundario (Goat-anti-Mouse IgG-HRP) a una diluci3n 1:100 por 2 horas a 37 °C. Todos los anticuerpos utilizados se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA). Al finalizar este tiempo, las preparaciones se enjuagaron en agua destilada y posteriormente se incubaron con el substrato 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Zymed®/ Invitrogen Inc., CA, USA). Despu3s de la tinci3n nuclear con hematoxilina de Mayer's (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), las laminillas se enjuagaron con agua destilada y se montaron con medio de montaje (Entellan; Merck, Darmstadt, Germany; OB046327) y se cubrieron con un cubreobjetos. Los controles negativos se procesaron con el procedimiento descrito previamente, pero no se les agreg3 el anticuerpo primario (datos no mostrados). Las preparaciones se analizaron usando un microscopio de luz y se tomaron fotografías de ellas. La seña

de inmunomarcaje se evalu3 con un software de análisis para obtener el valor promedio de la seña convertida en tonos de gris (Zeiss KS 300 Carl Zeiss IMT Corporation, Oberkochen, Germany). La intensidad del gris se convirti3 a valores numéricos en una escala de 0 (blanco) a 255 (negro), mientras más cercano a 255 sea este valor de gris, habrá una mayor abundancia de la expresi3n de la enzima que se está analizando.

Modelo *in vitro*

Obtenci3n de islotes pancreáticos

La expresi3n de los genes de las enzimas antioxidantes MnSOD y catalasa, se estudiaron en islotes pancreáticos en cultivo. La eutanasia de las ratas se realiz3 con una sobredosis de pentobarbital (120 mg/kg BW) (Zatroch, Knight, Reimer & Pang, 2017). El páncreas fue canulado a trav3s del ducto pancreático y distendido con una inyecci3n de 10 mL de soluci3n salina de Hank's y se disec3, posteriormente se digiri3 con 10 mg de colagenasa V (Merck, México). Los islotes se separaron de entre el tejido acinar, usando un gradiente discontinuo de ficol, como se describi3 previamente (Morimoto, Fernandez-Mejia, Romero-Navarro, Morales-Peza & Díaz-Sánchez, 2001). Los islotes fueron colectados manualmente bajo un microscopio estereoscópico y transferidos a una caja de cultivo de 6 pozos con medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal y 100 U/mL de penicilina más 100 mg/mL de estreptomycin (Invitrogen Inc. CA, USA) para mantenerlos en una incubadora de cultivo a 37 °C en una atm3sfera humidificada con 5% de CO₂ y 95% de aire. Los islotes pancreáticos, se incubaron por toda la noche para su recuperaci3n.

Incubaci3n de los cultivos

Los islotes en cultivo se lavaron y se incubaron en soluci3n salina de Krebs modificada (Alonso-Magdalena, Morimoto, Ripoll, Fuentes & Nadal, 2006), se trataron con vehí­culo (etanol al 0.01%), testosterona disuelta en etanol absoluto (0.01, 0.1 y 1 µg/mL) o dihidrotestosterona (DHT), un andrógeno no aromatizable, también disuelto en etanol absoluto (0.01, 0.1 y 1 µg/mL) durante 1 hora. Despu3s de la incubaci3n se transfirieron a tubos de microcentrifuga de 1.5 mL donde se almacenaron a -70 °C hasta su procesamiento para la obtenci3n de ARN.

Extracci3n de ARN y análisis por retrotranscripci3n y reacci3n en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)

El ARN fue extraído de los islotes pancreáticos usando un estuche comercial (RNeasy plus Mini Kit Qiagen, Valencia, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentraci3n de ARN fue determinada por espectrofotometría usando un equipo Biodrop duo (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). La retrotranscripci3n del ARN se realiz3 con el estuche SuperScript II (Invitrogen Inc., CA, USA) usando oligo dT como cebador. La expresi3n de los genes correspondientes a la MnSOD y a la catalasa fue analizada por PCR en tiempo real en un termociclador Light Cycler 2.0 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) usando el estuche Light Cycler

Taqman Master de Roche, de acuerdo con el siguiente protocolo: activación de la Taq ADN polimerasa y desnaturalización del ADN a 95 °C por 10 minutos, después 40 ciclos de amplificación a 95 °C por 10 segundos, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 10 segundos. Los datos fueron normalizados contra un control de expresión constitutiva que en este caso fue la β-actina. La expresión relativa de los genes de interés se calculó con el valor del Ct, y el método del 2^{-ΔΔCt}.

Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos específicos para los genes que codifican a MnSOD, catalasa y β-actina fueron diseñados en la página www.oligo.net. Para prevenir falsos positivos debido a la amplificación de ADN genómico contaminante, todos los oligonucleótidos fueron diseñados para alinearse a secuencias de exones separadas por un intrón. Las secuencias fueron obtenidas del GenBank y son los siguientes: para MnSOD, sentido, 5'- TGGACAAACCTGAGCCCTAA-3' y contrasentido, 5'-GACCCAAAGTCACGCTTGATA-3', número de acceso NM_017051.2. Para catalasa oligonucleótido sentido, 5'-CAGCGACCAGATGAAGCA-3' y contrasentido, 5'-GGTCAGGACATCGGGTTTC-3', número de acceso NM_012520.1. Para β-actina oligonucleótido sentido, 5'- CCCGCGAGTACAACCTTCT-3' y contrasentido 5'-CGTCATCCATGGCGAACT-3', número de acceso NM_031144.3. Los tamaños de los amplicones resultantes fueron 77, 61 y 72 nucleótidos respectivamente. Las sondas que se utilizaron para hibridar y detectar a los productos de PCR de cada gen estudiado, fueron la 67, 12 y 69 respectivamente, de la Biblioteca universal de sondas de Roche Applied Science (Indianápolis, IN, USA).

Análisis estadístico

Los datos de inmunohistoquímica, expresión de genes y concentraciones de glucosa, insulina, estradiol y testosterona fueron analizados con la prueba de ANOVA, seguida por el método de Tukey de comparación múltiple de medias como prueba *post-hoc*. Se consideró significancia estadística cuando P<0.05.

RESULTADOS

Modelo *in vivo*

Concentraciones de glucosa y de hormonas en respuesta al tratamiento con testosterona

No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de glucosa, insulina o estradiol en el suero de las ratas entre los tres grupos experimentales (Tabla I). La concentración de testosterona en las ratas gonadectomizadas, disminuyó a una quinta parte del valor observado en las ratas control e incrementó seis veces el valor en las ratas gonadectomizadas cuando fueron tratadas con testosterona. Estos resultados muestran que la gonadectomía y la substitución con una fuente exógena fueron efectivas.

Inmunohistoquímica

Para conocer el posible efecto de los andrógenos (testosterona y DHT) sobre el contenido de proteína de las enzimas antioxidantes MnSOD y catalasa, se obtuvieron cortes de tejido pancreático de ratas macho adultas de los tres grupos de estudio (intactas, gonadectomizadas inyectadas con el vehículo y gonadectomizadas e inyectadas con testosterona) que se procesaron por la técnica de inmunohistoquímica. Para las dos enzimas antioxidantes se observó una tinción positiva en la porción endocrina del páncreas, pero no en la región acinar. La tinción se localizó en el núcleo y citoplasma (Figura 1) de las células de los islotes pancreáticos.

Se encontró una señal reducida para MnSOD en los islotes de las ratas gonadectomizadas y tratadas con el vehículo (1B) comparadas con los islotes de las ratas control (1A). En las ratas gonadectomizadas y tratadas con testosterona (1C), se observó un aumento significativo de la tinción comparado con los islotes de las ratas control y gonadectomizadas y tratadas con el vehículo. Estos datos pueden ser observados numéricamente en la Figura 2 donde se muestra la inmunoreactividad expresada como la intensidad en tonos de grises, donde 0 es blanco y 255 es negro, mientras más alto sea el valor, habrá una mayor abundancia de la enzima en cuestión. La inmunoreactividad para la catalasa, fue similar en los tres grupos, no encontrándose

Tabla I. Concentraciones de insulina, estradiol y testosterona en el suero sanguíneo de ratas macho control, gonadectomizadas y tratadas con el vehículo, y gonadectomizadas y tratadas con testosterona.

Tratamiento	Glucosa (mmol/L)	Insulina (pmol/L)	Estradiol (pmol/L)	Testosterona (nmol/L)
Control	6.6 ± 0.30	75 ± 45	49.9 ± 6.0	3.8 ± 2.6 ^a
Gonadectomizados + vehículo	6.3 ± 0.21	75 ± 43	55.8 ± 11.0	0.7 ± 0.2 ^b
Gonadectomizados + testosterona	6.8 ± 0.22	45 ± 28	57.6 ± 6.2	21.2 ± 5.6 ^c

Las concentraciones de testosterona fueron las únicas que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos estudiados. Los datos se presentan como la media ± EE, n= 5 ratas por tratamiento. Las letras diferentes refieren diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

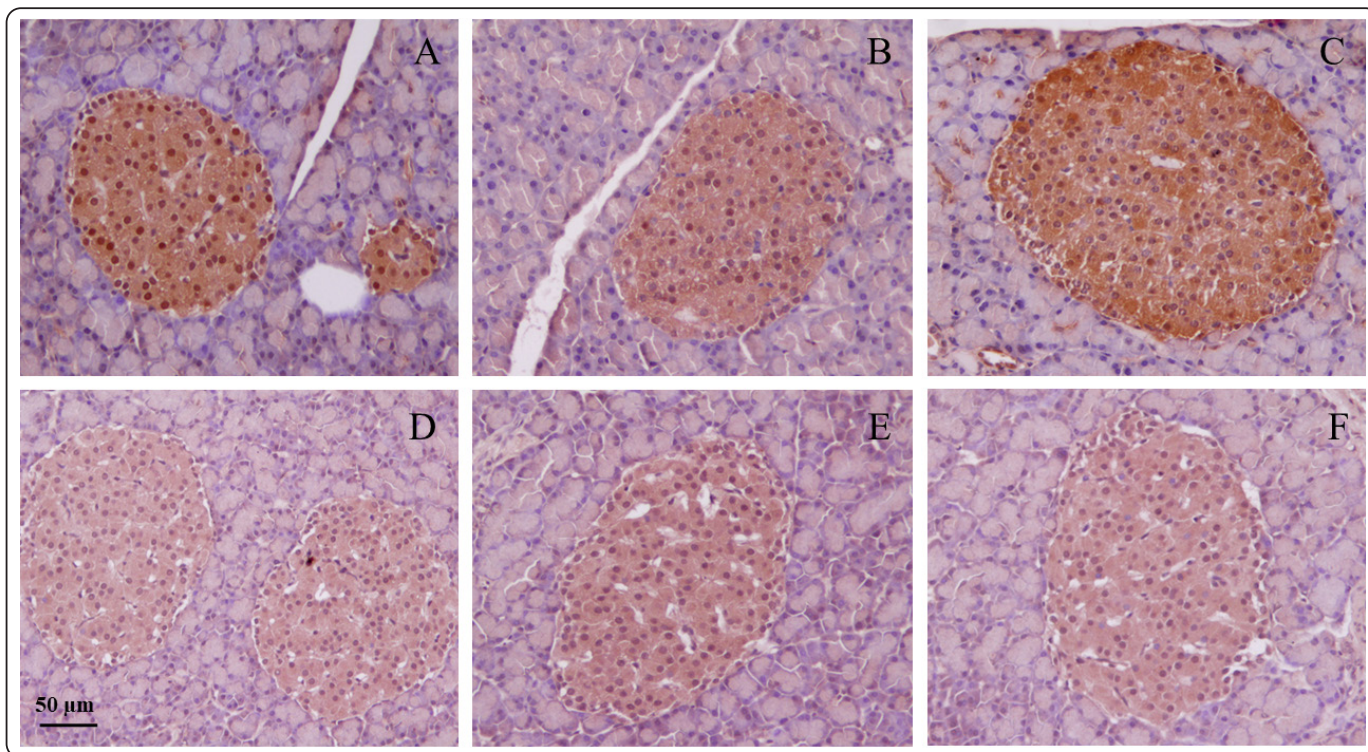


Figura 1. Im6genes representativas de los estudios por inmunohistoqu6mica de MnSOD (A, B y C) y catalasa (D, E y F). Ratas intactas (control), A y D; ratas macho gonadectomizadas y tratadas con el veh6culo (aceite de ma6z), B y E; y ratas gonadectomizadas y tratadas con testosterona C y F. n=5 ratas por tratamiento. Escala de la barra = 50 μm.

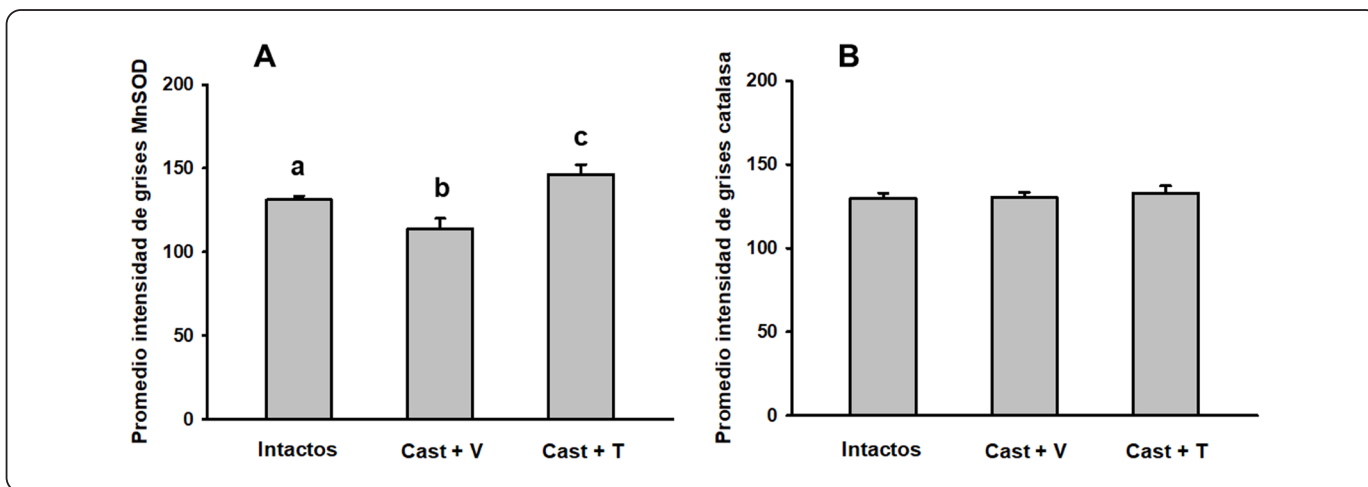


Figura 2. Expresi6n de la prote6na de la MnSOD (A) y catalasa (B). La determinaci6n de la intensidad del marcaje en cada laminilla se realiz6 con un programa de an6lisis de imagen por computadora, se graficaron los valores promedio de la intensidad de marcaje de la inmunohistoqu6mica, convertidos a valores num6ricos de intensidad de grises, en una escala del 0 (blanco) al 255 (negro), y entre m6s alto sea este valor, mayor abundancia de la enzima que se est6 analizando. Promedio de la intensidad de grises \pm EE (n=5 ratas por tratamiento, 10-20 islotes por rata). Ratas gonadectomizadas (castradas) tratadas con el veh6culo (Cast + V); ratas gonadectomizadas (castradas) tratadas con testosterona (Cast + T). Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias estad6sticamente significativas (P < 0.05).

diferencia en términos de la señal con el anticuerpo ni en la conversión a intensidad de los tonos de grises (Figuras 1D, E y F y Figura 2).

Modelo *in vitro*

Efecto de la testosterona sobre la expresión del ARNm de las enzimas MnSOD y catalasa

Para explorar si el aumento de la cantidad de las proteínas era acompañado de cambios en la expresión del ARNm, se realizó una RT-qPCR para los genes que codifican a la MnSOD y a la catalasa en los islotes pancreáticos de rata tratadas con testosterona y DHT. Tanto la testosterona como

la DHT aumentaron la expresión de ARNm de la MnSOD (Figura 3). La testosterona en concentraciones de 0.1 y 1 µg/mL y la DHT a 1 µg/mL indujeron una expresión de entre 1.5 a 5 veces mayor que la expresión en los islotes tratados con el vehículo, en el caso de la catalasa, sólo la testosterona en concentraciones de 0.1 y 1 µg/mL produjo un incremento de entre 2 a 7 veces en la expresión del ARNm comparado con el control, en el caso de la DHT no se observaron resultados concluyentes, pues aunque se observa una tendencia al aumento en la expresión dependiente de la dosis, la dispersión en todos los casos anula la significancia (Figura 4).

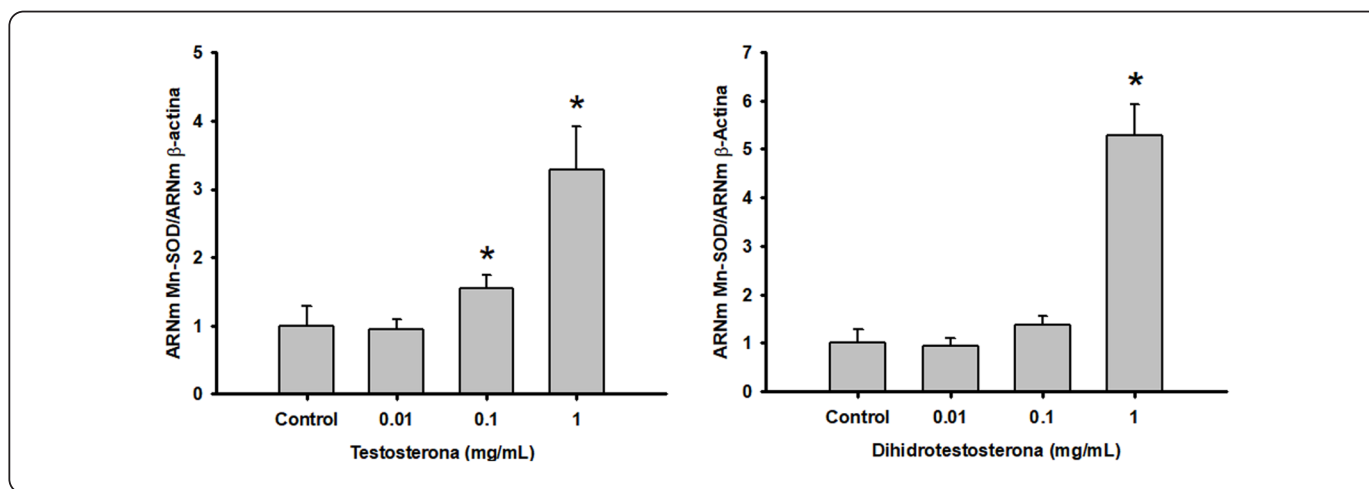


Figura 3. Expresión del ARNm de la MnSOD en los islotes pancreáticos de ratas macho, después de 1 h de incubación con diferentes concentraciones de testosterona y DHT. Los resultados se normalizaron frente al ARNm de la β-actina. Los datos se expresan como la media ± EE (n=6-10 experimentos independientes). *P<0.05 comparado con el grupo de control.

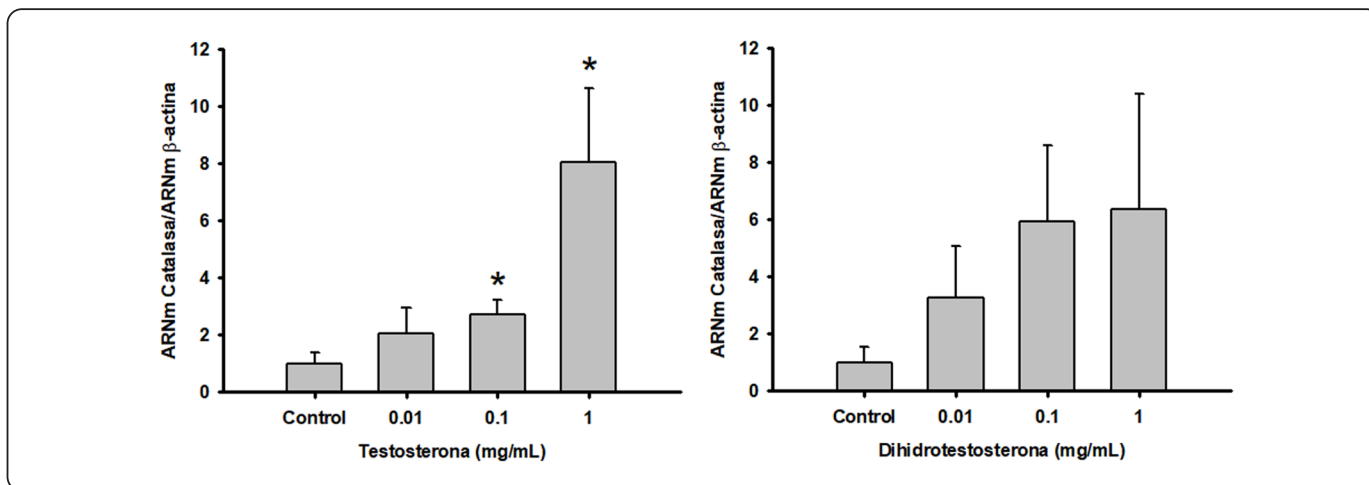


Figura 4. Expresión del ARNm de la catalasa en los islotes pancreáticos de ratas macho, después de 1 h de incubación con diferentes concentraciones de testosterona y DHT. Los resultados se normalizaron frente al ARNm de la β-actina. Los datos se expresan como la media ± EE (n=6-10 experimentos independientes). *P<0.05 comparado con el grupo de control.

DISCUSIÓN

Los radicales libres de oxígeno son producidos naturalmente en las células y juegan un papel muy importante como intermediarios reguladores de diferentes procesos celulares (Sies & Jones, 2020). Cuando ocurre un desbalance en el estado redox de la célula, entran en acción diferentes actores para restablecer la homeostasis, entre ellos las enzimas antioxidantes.

Se dice que un órgano es susceptible al estrés oxidativo cuando los mecanismos de defensa en contra de las especies reactivas de oxígeno (ROS) son inadecuados, o existe una incapacidad de reparar los daños al ADN causados por la oxidación. Los islotes pancreáticos son más sensibles al estrés oxidativo que otros tejidos, debido a una elevada producción endógena de ROS, una baja expresión de enzimas antioxidantes en las células beta y la relativa ineficacia de estas células en la reparación del ADN con daño oxidativo (Lenzen, 2017). Se ha propuesto que el estrés oxidativo es un elemento clave implicado en el deterioro de la función de las células beta durante el desarrollo de la diabetes tipo 1 y tipo 2 (Domingueti *et al.*, 2016). La pérdida de la función de las células beta, causada por un aumento de la apoptosis y manifestada como una capacidad secretora reducida, es un evento clave en el desarrollo de ambos tipos de diabetes (Drews & Düfer, 2012).

Los resultados del presente estudio demuestran que las dos enzimas estudiadas (MnSOD y catalasa), consideradas como la primera línea de defensa antioxidante (Wang *et al.*, 2017), son reguladas al menos parcialmente de forma positiva, por la testosterona en los islotes pancreáticos de ratas macho adultas. Como lo reportó previamente nuestro grupo de trabajo (Morimoto *et al.*, 2005), la testosterona tiene un efecto protector sobre la apoptosis temprana producida por la STZ en las células beta pancreáticas. En las ratas intactas, la STZ produjo un 20% de apoptosis de las células beta comparada con el 60% observado en las células beta pancreáticas de las ratas gonadectomizadas. Además, en las ratas gonadectomizadas y tratadas con testosterona, el porcentaje de apoptosis disminuyó al 30%, similar a lo observado en las ratas intactas. Esta protección provista por la testosterona fue bloqueada con el uso de un antiandrógeno, la flutamida, lo que indica una asociación del efecto protector con el receptor de andrógenos (Morimoto *et al.*, 2005). Además de lo anterior, se sabe que la testosterona protege a las células beta en contra de la muerte por glucotoxicidad (Hanchang, Semprasert, Limjindaporn, Yenchitsomanus & Kooptiwut, 2013) y de la apoptosis inducida por dexametasona (Harada *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que la testosterona y la DHT (un andrógeno no aromatizable) incrementan la expresión del ARNm además de los niveles de la enzima MnSOD en las células beta de los islotes pancreáticos en ratas macho. La catalasa se vio modificada en términos de

expresión de ARNm, únicamente por efecto de la testosterona. Si bien los resultados producidos por la DHT sobre la expresión de ARNm de la catalasa, no son estadísticamente significativos, tampoco son concluyentes, pues se observa una tendencia al aumento en la expresión dependiente de la dosis, pero la dispersión anula su significancia.

Los resultados aquí reportados concuerdan con los de varios estudios anteriores, como el de Pang y colaboradores (2002), quienes reportaron que la expresión de la tiorredoxina, glutatión peroxidasa 1 y superóxido dismutasa 2, disminuía con la castración y aumentaba con la sustitución por testosterona. De forma similar, Hanchang y colaboradores (2013) describieron la capacidad de la testosterona para reducir los marcadores de estrés oxidativo y los marcadores de estrés del retículo endoplásmico. Según un reporte de Sadowska-Krepa *et al.* (2017), la suplementación con testosterona favoreció también una actividad elevada de la SOD en el hígado. Adicionalmente, una investigación reciente, reporta que tanto la testosterona como la DHT incrementan significativamente la actividad de la SOD, y reducen la de la catalasa en células endoteliales, estos efectos fueron revertidos por el antiandrógeno flutamida (Koukoulis *et al.*, 2022).

El efecto protector de la testosterona ha sido comprobado en otros órganos y tejidos incluyendo, células neuronales en cultivo (Hammond *et al.*, 2001), la línea celular PC3 de cáncer de próstata (Lin *et al.*, 2009) y las células granulares del cerebelo de rata (Ahlbom, Prins & Ceccatelli, 2001), además de tejidos como la próstata (Pang *et al.*, 2002), cerebro (Guzmán *et al.*, 2005; Son *et al.*, 2016), corazón (Kłapcińska *et al.*, 2008), hipocampo (Meydan *et al.*, 2010) e hígado (Xu *et al.*, 2017). Así mismo, estudios epidemiológicos han descrito el papel benéfico de la testosterona en la función del páncreas endocrino, por ejemplo, se ha demostrado una asociación positiva entre bajos niveles de testosterona con estados de resistencia a la insulina (Rao *et al.*, 2013). Adicionalmente, este andrógeno ha sido propuesto, como un factor protector contra la diabetes mellitus tipo 2 en pacientes del sexo masculino. En esta investigación se incluyeron 16,709 participantes y se mostró que a mayores concentraciones de testosterona, se reducía significativamente el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2 en hombres sanos (Yao, Wang, An, Zhang & Ding, 2018). La suplementación con testosterona en hombres con una función gonadal disminuida y diabetes mellitus tipo 2, mejoró la resistencia a la insulina y el control de la glicemia (Kapoor, Goodwin, Channer & Jones, 2006).

Los estudios experimentales que apoyan el beneficio de los andrógenos en la protección contra del estrés oxidativo destacan la importancia del receptor de andrógenos (Hammond *et al.*, 2001; Morimoto *et al.*, 2005; Hanchang *et al.*, 2013; Harada *et al.*, 2015).

La expresión del receptor de andrógenos fue recientemente descrita en el núcleo de las células beta del páncreas de la rata (Harada *et al.*, 2018). Su relevancia para la salud de las células beta fue establecida previamente por Xu *et al.* (2017), quienes detectaron una disfunción e inflamación de estas células en ratones con deficiencia de receptores de andrógenos.

Los receptores nucleares de andrógenos actúan como factores de transcripción dependientes de ligando (Figura 5). Cuando un andrógeno se une a su receptor, el complejo hormona-receptor interactúa con los elementos de respuesta correspondientes, localizados en el promotor de los genes regulados, para ejercer efectos positivos o negativos en la expresión de dichos genes (Beato & Klug, 2000).

La presente investigación demuestra un aumento inducido por la testosterona en la expresión del ARNm de los genes codificantes para MnSOD y catalasa (en islotes pancreáticos de rata, cultivados), así como en el nivel de la proteína antioxidante MnSOD en ratas macho (utilizando tejido pancreático).

Es interesante saber que existe un dimorfismo sexual con relación al estrés oxidativo (Alonso-Alvarez, Bertrand, Faivre, Chastel & Sorci, 2007) y la actividad de los andrógenos sobre las células de los islotes pancreáticos. En ratas hembra, los andrógenos producen estrés oxidativo sistémico y predisponen a las células

beta a la disfunción (Navarro *et al.*, 2018), diferente en ratas macho, la testosterona protege frente a la apoptosis inducida por STZ (Palomar-Morales *et al.*, 2010). En este mismo sentido, la sensibilidad al daño por STZ y la protección por hormonas esteroideas sexuales también se relaciona con el género en modelos de diabetes en ratones, se encontró que los estrógenos y sus receptores son los protagonistas de esta protección (Paik, S. G., Michelis, M. A., Kim, Y. T. & Shin, S. 1982; Le May *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008). En el presente estudio, la deficiencia de testosterona en ratas macho gonadectomizadas condujo a una disminución en los niveles de la MnSOD comparada con la observada en las ratas control. En cambio, la sustitución con testosterona exógena revirtió este efecto, al permitir que los niveles de la MnSOD se aproximaran al nivel del grupo de control. Además, la testosterona y la DHT aumentaron la expresión del ARNm del gen que codifica a la MnSOD. Los resultados del tratamiento con DHT sugieren que el efecto protector no se debió a los estrógenos, que pueden generarse por aromatización de andrógenos (Figura 6). El tratamiento de ratas gonadectomizadas con testosterona no modificó las concentraciones séricas de insulina, glucosa o estradiol, cada una de las cuales se encontró en niveles equiparables en los tres grupos experimentales. Las concentraciones similares de estradiol en todos los grupos permiten suponer que no hubo aromatización periférica de los andrógenos.

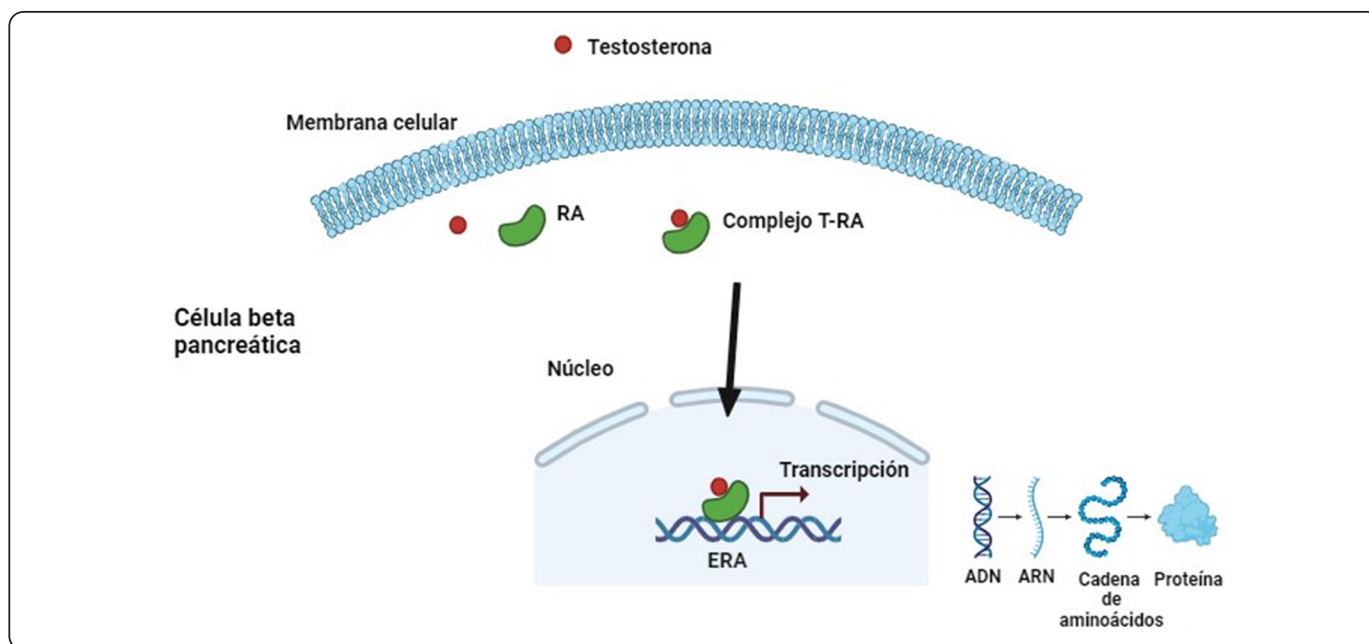


Figura 5. Mecanismo de acción clásico de la testosterona (T). La T se difunde a través de la membrana plasmática y se une a su receptor (RA) formando el complejo T-RA el cual se transloca al núcleo donde se une a secuencias específicas en el ADN (ERA) en los genes regulados por andrógenos modulando su transcripción. En la parte inferior derecha de la Figura se observa de manera simplificada, como se da la síntesis de proteínas a partir del ADN. RA: receptor de andrógenos, T: testosterona, ERA: elementos de respuesta a andrógenos. Imagen creada con BioRender.com

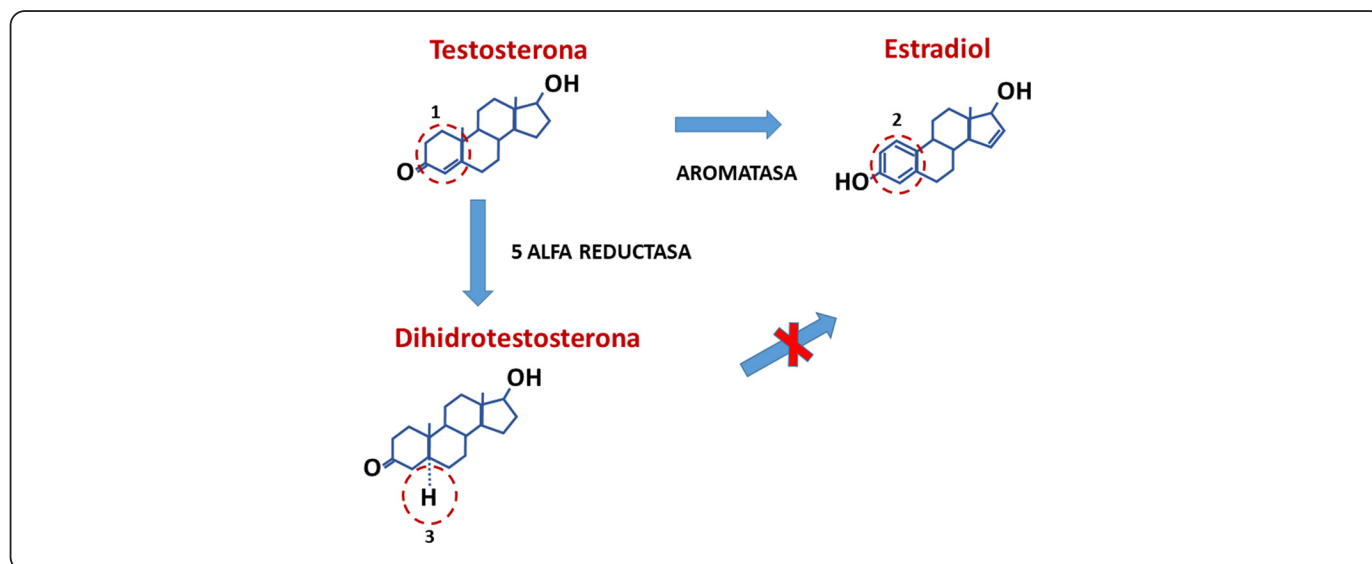


Figura 6. Conversi6n de la testosterona (T) a estradiol (E₂), por efecto de la enzima aromatasa y conversi6n de T a dihidrotestosterona (DHT) por la acci6n de la enzima 5 α reductasa. La aromatasa elimina hidr6genos del anillo A (1) e introduce dobles ligaduras alternadas (2). La 5 α reductasa reduce el doble enlace del anillo A (adici6n de un H (3)), esta reducci6n impide que la DHT pueda metabolizarse a estradiol.

CONCLUSIONES

El tratamiento con testosterona en ratas macho gonadectomizadas, induce una sobre-expresi6n del ARNm correspondiente al gen, as6 como un aumento de los niveles de la enzima MnSOD en los islotes pancreáticos, a trav6s de un mecanismo que no se relaciona con la aromatizaci6n de andr6genos, en el que muy probablemente intervienen los receptores de estos, lo que demuestra las implicaciones de la testosterona en la prevenci6n del daño a las c6lulas productoras de insulina como un importante factor protector frente a la *diabetes mellitus* tipo 2.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue parcialmente financiado con el apoyo de CONAHCYT al proyecto 52155-Q. Los autores agradecen la invaluable asistencia t6cnica de Ver6nica Rodr6guez de la Facultad de Medicina de la UNAM.

REFERENCIAS

Ahlbom, E., Prins, G. S. & Ceccatelli, S. (2001). Testosterone protects cerebellar granule cells from oxidative stress-induced cell death through a receptor mediated mechanism. *Brain Research*, **892**(2), 255–262. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)03155-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)03155-3)

Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Faivre, B., Chastel, O. & Sorci, G. (2007). Testosterone and oxidative stress: the oxidation handicap hypothesis. *Proceedings. Biological Sciences*, **274**(1611), 819–825. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3764>

Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E. & Nadal, A. (2006). The estrogenic effect of bisphenol A

disrupts pancreatic beta-cell function *in vivo* and induces insulin resistance. *Environmental Health Perspectives*, **114**(1), 106–112. <https://doi.org/10.1289/ehp.8451>

Beato, M. & Klug, J. (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Human Reproduction Update*, **6**(3), 225–236. <https://doi.org/10.1093/humupd/6.3.225>

D6az-S6nchez, V., Morimoto, S., Morales, A., Robles-D6az, G. & Cerb6n, M. (1995). Androgen receptor in the rat pancreas: genetic expression and steroid regulation. *Pancreas*, **11**(3), 241–245. <https://doi.org/10.1097/00006676-199510000-00005>

Domingueti, C. P., Dusse, L. M., Carvalho, M. d, de Sousa, L. P., Gomes, K. B. & Fernandes, A. P. (2016). Diabetes mellitus: The linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. *Journal of Diabetes and its Complications*, **30**(4), 738–745. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2015.12.018>

Drews, G. & D6ifer, M. (2012). Role of K(ATP) channels in β -cell resistance to oxidative stress. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, **14**Suppl3, 120–128. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2012.01644.x>

Eguchi, N., Vaziri, N. D., Dafoe, D. C. & Ichii, H. (2021). The Role of Oxidative Stress in Pancreatic β Cell Dysfunction in Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**(4), 1509. <https://doi.org/10.3390/ijms22041509>

Guzm6n, D. C., Mej6a, G. B., V6zquez, I. E., Garc6a, E. H., del Angel, D. S. & Olgu6n, H. J. (2005). Effect of testosterone and steroids homologues on indolamines and lipid peroxidation in rat brain. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **94**(4), 369–373.

- <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.11.006>
- Hammond, J., Le, Q., Goodyer, C., Gelfand, M., Trifiro, M. & LeBlanc, A. (2001). Testosterone-mediated neuroprotection through the androgen receptor in human primary neurons. *Journal of Neurochemistry*, **77**(5), 1319–1326. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00345.x>
- Hanchang, W., Semprasert, N., Limjindaporn, T., Yenichitsomanus, P. T. & Kooptiwut, S. (2013). Testosterone protects against glucotoxicity-induced apoptosis of pancreatic β -cells (INS-1) and male mouse pancreatic islets. *Endocrinology*, **154**(11), 4058–4067. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1351>
- Harada, N., Katsuki, T., Takahashi, Y., Masuda, T., Yoshinaga, M., Adachi, T., Izawa, T., Kuwamura, M., Nakano, Y., Yamaji, R. & Inui, H. (2015). Androgen receptor silences thioredoxin-interacting protein and competitively inhibits glucocorticoid receptor-mediated apoptosis in pancreatic β -Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, **116**(6), 998–1006. <https://doi.org/10.1002/jcb.25054>
- Harada, N., Yoda, Y., Yotsumoto, Y., Masuda, T., Takahashi, Y., Katsuki, T., Kai, K., Shiraki, N., Inui, H. & Yamaji, R. (2018). Androgen signaling expands β -cell mass in male rats and β -cell androgen receptor is degraded under high-glucose conditions. *American journal of physiology. Endocrinology and Metabolism*, **314**(3), E274–E286. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00211.2017>
- Kapoor, D., Goodwin, E., Channer, K. S. & Jones, T. H. (2006). Testosterone replacement therapy improves insulin resistance, glycaemic control, visceral adiposity and hypercholesterolaemia in hypogonadal men with type 2 diabetes. *European Journal of Endocrinology*, **154**(6), 899–906. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1530/eje.1.02166>
- King A. J. (2012). The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*, **166**(3), 877–894. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x>
- Kłapcińska, B., Jagsz, S., Sadowska-Krepa, E., Górski, J., Kempa, K. & Langfort, J. (2008). Effects of castration and testosterone replacement on the antioxidant defense system in rat left ventricle. *The Journal of Physiological Sciences: JPS*, **58**(3), 173–177. <https://doi.org/10.2170/physiolsci.RP002208>
- Koukoulis, G. N., Filiponi, M., Gougoura, S., Befani, C., Liakos, P. & Bargiota, A. (2022). Testosterone and dihydrotestosterone modulate the redox homeostasis of endothelium. *Cell Biology International*, **46**(4), 660–670. <https://doi.org/10.1002/cbin.11768>
- Lee, Y. E., Kim, J. W., Lee, E. M., Ahn, Y. B., Song, K. H., Yoon, K. H., Kim, H. W., Park, C. W., Li, G., Liu, Z. & Ko, S. H. (2012). Chronic resveratrol treatment protects pancreatic islets against oxidative stress in db/db mice. *PLOS ONE*, **7**(11), e50412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050412>
- Lenzen S. (2017). Chemistry and biology of reactive species with special reference to the antioxidative defence status in pancreatic β -cells. *Biochimica et Biophysica Acta. General Subjects*, **1861**(8), 1929–1942. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.05.013>
- Le May, C., Chu, K., Hu, M., Ortega, C. S., Simpson, E. R., Korach, K. S., Tsai, M. J. & Mauvais-Jarvis, F. (2006). Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(24), 9232–9237. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602956103>
- Li, R. J., Qiu, S. D., Wang, H. X., Tian, H., Wang, L. R. & Huo, Y. W. (2008). Androgen receptor: a new player associated with apoptosis and proliferation of pancreatic beta-cell in type 1 diabetes mellitus. *Apoptosis: an International Journal on Programmed Cell Death*, **13**(8), 959–971. <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0230-9>
- Lin, B., Wang, J., Hong, X., Yan, X., Hwang, D., Cho, J. H., Yi, D., Utleg, A. G., Fang, X., Schones, D. E., Zhao, K., Omenn, G. S. & Hood, L. (2009). Integrated expression profiling and ChIP-seq analyses of the growth inhibition response program of the androgen receptor. *PLOS ONE*, **4**(8), e6589. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006589>
- Meydan, S., Kus, I., Tas, U., Ogeturk, M., Sancakdar, E., Dabak, D. O., Zararsiz, I. & Sarsilmaz, M. (2010). Effects of testosterone on orchietomy-induced oxidative damage in the rat hippocampus. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, **40**(4), 281–285. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2010.07.006>
- Mizukami, H., Takahashi, K., Inaba, W., Tsuboi, K., Osonoi, S., Yoshida, T. & Yagihashi, S. (2014). Involvement of oxidative stress-induced DNA damage, endoplasmic reticulum stress, and autophagy deficits in the decline of β -cell mass in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, **37**(7), 1966–1974. <https://doi.org/10.2337/dc13-2018>
- Morimoto, S., Fernandez-Mejia, C., Romero-Navarro, G., Morales-Peza, N. & Díaz-Sánchez, V. (2001). Testosterone effect on insulin content, messenger ribonucleic acid levels, promoter activity, and secretion in the rat. *Endocrinology*, **142**(4), 1442–1447. <https://doi.org/10.1210/endo.142.4.8069>
- Morimoto, S., Mendoza-Rodríguez, C. A., Hiriart, M., Larrieta, M. E., Vital, P. & Cerbón, M. A. (2005). Protective effect of testosterone on early apoptotic damage induced by streptozotocin in rat pancreas. *The Journal of Endocrinology*, **187**(2), 217–224. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06357>
- Navarro, G., Allard, C., Morford, J. J., Xu, W., Liu, S., Molinas, A. J., Butcher, S. M., Fine, N. H., Blandino-Rosano, M., Sure, V. N., Yu, S., Zhang, R., Münzberg, H., Jacobson, D. A., Katakam, P. V., Hodson, D. J., Bernal-Mizrachi, E., Zsombok, A. & Mauvais-Jarvis, F. (2018). Androgen excess in pancreatic β cells and neurons predisposes female mice to type 2 diabetes. *JCI Insight*, **3**(12), e98607. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.98607>
- Paik, S. G., Michelis, M. A., Kim, Y. T. & Shin, S. (1982).

- Induction of insulin-dependent diabetes by streptozotocin. Inhibition by estrogens and potentiation by androgens. *Diabetes*, **31(8 Pt 1)**, 724–729. <https://doi.org/10.2337/diab.31.8.724>
- Palomar-Morales, M., Morimoto, S., Mendoza-Rodríguez, C. A. & Cerb6n, M. A. (2010). The protective effect of testosterone on streptozotocin-induced apoptosis in beta cells is sex specific. *Pancreas*, **39(2)**, 193–200. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3181c156d9>
- Pang, S. T., Dillner, K., Wu, X., Pousette, A., Norstedt, G. & Flores-Morales, A. (2002). Gene expression profiling of androgen deficiency predicts a pathway of prostate apoptosis that involves genes related to oxidative stress. *Endocrinology*, **143(12)**, 4897–4906. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220327>
- Parasuraman, S., Raveendran, R. & Kesavan, R. (2010). Blood sample collection in small laboratory animals. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, **1(2)**, 87–93. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.72350>
- Pousette A. (1976). Demonstration of an androgen receptor in rat pancreas. *The Biochemical Journal*, **157(1)**, 229–232. <https://doi.org/10.1042/bj1570229>
- Rao, P. M., Kelly, D. M. & Jones, T. H. (2013). Testosterone and insulin resistance in the metabolic syndrome and T2DM in men. *Nature Reviews. Endocrinology*, **9(8)**, 479–493. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.122>
- Ritschl, L. M., Fichter, A. M., Haberle, S., von Bomhard, A., Mitchell, D. A., Wolff, K. D. & Mucke, T. (2015). Ketamine-Xylazine Anesthesia in Rats: Intraperitoneal versus Intravenous Administration Using a Microsurgical Femoral Vein Access. *Journal of Reconstructive Microsurgery*, **31(5)**, 343–347. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1546291>
- Sadowska-Krępa, E., Kłapcińska, B., Jagsz, S., Nowara, A., Szoltysek-Boldys, I., Chalimoniuk, M., Langfort, J. & Chrapusta, S. J. (2017). High-dose testosterone enanthate supplementation boosts oxidative stress, but exerts little effect on the antioxidant barrier in sedentary adolescent male rat liver. *Pharmacological Reports: PR*, **69(4)**, 673–678. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.02.023>
- Salazar-García, M. & Corona, J. C. (2021). The use of natural compounds as a strategy to counteract oxidative stress in animal models of diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, **22(13)**, 7009. <https://doi.org/10.3390/ijms22137009>
- Sasikumar, R., Jyoti Das, A. & Chandra Deka, S. (2021). In vitro cytoprotective activity of cyanidin 3-glucoside extracts from *Haematocarpus validus* pomace on streptozotocin induced oxidative damage in pancreatic β -cells. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **28(9)**, 5338–5348. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.05.065>
- Sies, H. & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, **21(7)**, 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Son, S. W., Lee, J. S., Kim, H. G., Kim, D. W., Ahn, Y. C. & Son, C. G. (2016). Testosterone depletion increases the susceptibility of brain tissue to oxidative damage in a restraint stress mouse model. *Journal of Neurochemistry*, **136(1)**, 106–117. <https://doi.org/10.1111/jnc.13371>
- Wang, N., Yi, W. J., Tan, L., Zhang, J. H., Xu, J., Chen, Y., Qin, M., Yu, S., Guan, J. & Zhang, R. (2017). Apigenin attenuates streptozotocin-induced pancreatic β cell damage by its protective effects on cellular antioxidant defense. *In vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, **53(6)**, 554–563. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0135-4>
- Xu, W., Niu, T., Xu, B., Navarro, G., Schipma, M. J. & Mauvais-Jarvis, F. (2017). Androgen receptor-deficient islet β -cells exhibit alteration in genetic markers of insulin secretion and inflammation. A transcriptome analysis in the male mouse. *Journal of Diabetes and its Complications*, **31(5)**, 787–795. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2017.03.002>
- Yao, Q. M., Wang, B., An, X. F., Zhang, J. A. & Ding, L. (2018). Testosterone level and risk of type 2 diabetes in men: a systematic review and meta-analysis. *Endocrine Connections*, **7(1)**, 220–231. <https://doi.org/10.1530/EC-17-0253>
- Yaribeygi, H., Sathyapalan, T., Atkin, S. L. & Sahebkar, A. (2020). Molecular Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2020**, 8609213. <https://doi.org/10.1155/2020/8609213>
- Zhang, Y., Mei, H., Shan, W., Shi, L., Chang, X., Zhu, Y., Chen, F. & Han, X. (2016). Lentinan protects pancreatic β cells from STZ-induced damage. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **20(10)**, 1803–1812. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12865>
- Zatroch, K. K., Knight, C. G., Reimer, J. N. & Pang, D. S. (2017). Refinement of intraperitoneal injection of sodium pentobarbital for euthanasia in laboratory rats (*Rattus norvegicus*). *BMC Veterinary Research*, **13(1)**, 60. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0982-y>