Trabajos Originales

EFECTO *IN VITRO* DE LA INSULINA SOBRE LA CAPACIDAD CONTRACTIL UTERINA INDUCIDA POR OXITOCINA*

Drs. Horacio Figueroa D.¹, Elisa T. Marusic B.², Magdalena González N.^{2*}, Francisca Barcos M.^{**}, Paola Yungue V.^{**}

¹Servicio de Obstetricia y Ginecología. Hospital Parroquial de San Bernardo. ²Laboratorio de Fisiología Molecular y Celular, Universidad de los Andes

*Licenciada en Biología

**Interna de Medicina

RESUMEN

La capacidad contráctil del útero puede ser evaluada *in vitro* por medio del método isométrico. El objetivo de este estudio fue comparar la efectividad de la administración simultánea de oxitocina e insulina en la contractilidad uterina. La comparación entre ambas hormonas se realizó en úteros aislados de dos modelos experimentales: ratas hembras adultas en diferentes fases del ciclo estral y ratas preñadas en fase final de preñez. Los úteros de estos animales fueron sometidos, *in vitro*, a la acción de dosis acumulativas de oxitocina (10^{-10} M a 10^{-8} M), insulina (200 mU/ml), y oxitocina más insulina.

Los resultados obtenidos indican que *in vitro* la insulina no modificó significativamente la respuesta oxitócica. Sin embargo, la insulina aumentó la entrada de potasio al miometrio, medida como actividad de la Na-K ATPasa sensible a ouabaína. Este hallazgo indica efectividad de la insulina en el tejido uterino. Además es la primera demostración que insulina actúa en el miometrio en forma similar a lo descrito para el músculo esquelético. El efecto de insulina sobre la bomba de sodio indicaría que insulina no actuaría sinérgicamente con oxitocina.

PALABRAS CLAVES: **Insulina, oxitocina, contractilidad uterina**

SUMMARY

Uterine contractility can be measured quantitatively *in vitro* by the isometric method. The aim of the present work was to assess if insulin could modify uterotonic effect of oxytocin. The uterine response to oxytocin alone and in the presence of insulin was studied in two different groups of rats: normal rats in different estral periods and pregnant rats at the end of pregnancy. The uterus of each group were compared in parallel bathing solutions with accumulative doses of oxytocin (10^{-10} M a 10^{-8} M) with or without insulin (200 mU/ml).

As shown in the results, insulin was not able to modify oxytocin responses. However, under the same experimental conditions, insulin increased potassium uptake by the myometrium, as measured as Na-K ATPase activity ouabain sensible. The last finding is an indication of the effectiveness of the hormone in the uterus; also, it is the first time that is shown that insulin behaves in the myometrium as shown previously for skeletal muscle. The effect of insulin on the sodium pump is a further evidence that insulin has not a synergistic effect on the oxytocic responses.

KEY WORDS: **Insulin, oxytocin and contraction**

*Trabajo de ingreso del Dr. HORACIO FIGUEROA D., leído en la sesión del 16 de julio de 2002 de la Sociedad Chilena de Obstetricia y Ginecología.

INTRODUCCION

La oxitocina es una hormona conocida por su potente efecto uterotónico y ha sido utilizada en clínica para inducir el parto. Esta inducción del parto de término, es en algunas pacientes totalmente ineficaz, aún en altas dosis mientras que en otros embarazos de término basta una mínima dosis de oxitocina para inducir la contractilidad uterina (1-3). Los receptores de oxitocina están acoplados a proteínas G y activan la vía de los inositoles, lo que conduce a un aumento de la concentración intracelular de calcio (4). El mecanismo de la repentina, y en algunos casos impredecible respuesta del miometrio a la oxitocina es aún un problema sin aclarar (5).

La hemorragia postparto, especialmente la producida por inercia uterina, representa una pérdida importante de sangre proveniente del útero. En nuestro país la hemorragia es la cuarta causa de muerte materna (6). Para revertir la inercia uterina se debe realizar, después de una revisión manual que descarte una rotura, inversión uterina y restos ovulares, una estimulación mecánica mediante un masaje bimanual enérgico seguido de legrado uterino. Esto junto con el tratamiento médico revertirá esta situación en la mayoría de los casos (7-9). Si a pesar de estas medidas la inercia persiste, se debe recurrir a procedimientos quirúrgicos (10-14).

Dentro de las medidas médicas que habitualmente se utiliza en algunos Centros de Salud para producir la contracción uterina durante una inercia uterina figura el uso de insulina cristalina en combinación con oxitocina. Esta medida es francamente controvertida, ya que no existe evidencia científica en la literatura que la respalde.

El útero tiene una respuesta muy variable al efecto de la oxitocina durante el embarazo ya que la respuesta se incrementa a medida que el embarazo transcurre (2, 15). Se sabe que los receptores a oxitocina tienen un efecto estimulador en el miometrio y un efecto a nivel decidual que produciría un incremento en la producción de prostaglandinas (16-18). La unión de la oxitocina a su receptor uterino activa la fosfolipasa C con la formación de un segundo mensajero inositol trifosfato (Ip3) que es el que libera al ion calcio en el interior de las células del músculo liso uterino (19). La principal fuente de entrada de calcio es a través de los canales voltaje dependientes tipo L (20). No existen evidencias de que esta respuesta contráctil fuese afectada por el uso concomitante de insulina; esta hormona es capaz de aumentar la entrada de

potasio a las células del músculo esquelético (21). El objetivo de este trabajo fue determinar si la insulina favorece el efecto contráctil de la oxitocina sobre el músculo uterino aislado de rata.

MATERIAL Y METODO

Se obtuvieron úteros de ratas Sprague Dawley, entre 150 y 200 gramos de peso, en estro y diestro, y ratas embarazadas entre los días 18 y 25 de gestación. El período estral se determinó por citología vaginal. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical según método clásico, y se extrajo el útero a través de laparotomía media. Se obtuvieron cuernos uterinos de 0,4 por 1,5 cm aproximadamente, los que fueron rápidamente puestos en solución Tyrode MOPS a una temperatura de 37° C y pH de 7,4. La composición de la Solución Tyrode en mM es la siguiente: NaCl 137; KCl 5,7; CaCl₂ 0,6; MgSO₄ 2,1; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 6; Glucosa 5; MOPS 10.

El registro de tensión se efectuó con transductor de tensión isométrica de acuerdo a trabajo de Muñoz y Marusic (20), instalado en cámara termoestable de doble flujo. El registro de contracción se efectuó utilizando polígrafo Grass, con un gramo de tensión inicial.

Los experimentos se realizaron utilizando un ensayo de droga de tipo acumulativo con dosis crecientes de oxitocina (0,01; 0,1; 1; 10 nM) cada cinco minutos. Una vez completado este ensayo, se lavó el útero, se estabilizó y se ensayaron las mismas dosis de oxitocina pero en un medio con o sin insulina cristalina (200 mUI por ml).

En algunos experimentos se ensayó el efecto de insulina sola o añadiendo oxitocina post 30 minutos de la acción de insulina.

Los resultados se expresaron como porcentaje del área de la contracción máxima obtenida con la oxitocina. El área se calculó digitalizando la imagen obtenida en el polígrafo y a través de un programa computacional se calculó el área bajo la curva.

Medición actividad de la NaK-ATPasa

La actividad de la enzima se midió por la captación de ⁸⁶Rb/K sensible a ouabaína. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, los úteros removidos y trozos de 1 a 10 mg fueron incubados en viales separados para medir la entrada de ⁸⁶Rb/K, divididos en controles y los con insulina, 200 mU/ml; en ambos casos muestras paralelas contenían ouabaína, de acuerdo a técnica descrita por Bonilla y cols. (22). El tejido fue preincubado 40

minutos en 2 ml de KRB conteniendo en mM: KCl 4,2; KH_2PO_4 1, 19, NaCl 120; NaHCO_3 25; MgSO_4 1,2; CaCl_2 1,3; Glucosa 5 (pH 7,4), 95% O_2 y 5% CO_2 a 37°C , en presencia o ausencia de ouabaina 10^{-3} M. La incubación con $^{86}\text{Rb}/\text{K}$ duró 10 minutos y la reacción se detuvo transfiriendo los tejidos a una solución KRB fría mantenida en hielo. La radioactividad intracelular se midió en un contador de centelleo líquido. La actividad de la bomba de sodio se obtuvo sustrayendo a la captación total del radioisótopo las cpm obtenidas en presencia de ouabaina.

Análisis estadístico

Se utilizó test de ANOVA y la prueba T de Student para determinar la significancia de los resultados. Los resultados se expresaron como el promedio obtenido $\pm$ el error estándar.

RESULTADOS

Efecto de insulina en la contractilidad uterina mediada por oxitocina en ratas controles en diferentes fases del ciclo estral

Los úteros de rata en fase estro se montaron en el sistema de registro según se señaló en métodos. Se logró la estabilización de la contractilidad basal con un período de equilibrio, con lo cual se disminuyen las contracciones espontáneas del útero. Una vez finalizado este período se estimularon los úteros con dosis creciente de oxitocina (0,01 a 10 nM). En la Figura 1 A, se muestran los resultados del efecto contráctil al estimular el mismo útero por segunda vez con dosis crecientes de oxitocina.

El repetir las mismas dosis de oxitocina, tuvo por objeto determinar si la sensibilidad del útero permanecía constante o bien ocurría una disminución de ésta por una eventual internalización de receptores. Los resultados (Figura 1 A) demuestran que no ocurren cambios significativos en la capacidad contráctil del útero al repetir dosis acumulativas crecientes de oxitocina, después de un período de equilibrio de 30 minutos entre el primer y segundo ensayo; (n= 7). Estos resultados nos permitieron repetir un protocolo similar en presencia de insulina y válida utilizar un mismo útero como su propio control.

La adición de insulina en conjunto con oxitocina en la segunda aplicación no modificó el efecto contráctil observado con dosis crecientes de oxitocina sola como se señala en Figura 1 B (n= 14). Resultados similares se obtuvieron en úteros de ratas en diestro.

Figura 1. Efecto de dosis acumulativas de oxitocina, en ausencia; (A) presencia de insulina. (B) Incluye la contracción uterina en respuesta a dosis crecientes de oxitocina. Barras blancas: primera aplicación de oxitocina. Barras grises: segunda aplicación al mismo cuerno uterino (n= 19). (B) Incluye resultados obtenidos en condiciones similares al gráfico A, en ausencia (barras blancas) o presencia de insulina (barras negras); (n= 13).

La falta de acción de insulina, en la respuesta a oxitocina fue independiente del tiempo que la insulina estuvo presente, el que varió entre 5 y 30 minutos. La presencia de insulina durante 30 minutos previo a la acción de oxitocina, no fue capaz de producir variaciones significativas como se muestra en la Tabla I. Por otra parte la insulina sola no modificó la capacidad contráctil espontánea del útero (datos no mostrados).

Tabla I
EFFECTO DE LA ACCION DE INSULINA DURANTE 30 MINUTOS SOBRE LA ACTIVIDAD OXITOCICA DEL UTERO DE RATAS

Hormona	Ratas en estro	n	Ratas embarazadas	n
Oxitocina (10 nM)	143,4 ± 33,0	7	276,3 ± 56,0	5
Oxitocina (10 nM) + Insulina (200 mU)	100,1 ± 11,9	13	313,7 ± 65,8	8

*Los resultados están expresados en mm²/g tejido calculados por el área bajo la curva de la respuesta obtenida. Los valores corresponden al promedio ± error estándar.

Adición de insulina en la respuesta oxitócica de útero de ratas preñadas

Estudios similares a los realizados en ratas controles se efectuaron en ratas embarazadas, en fase final de preñez pero sin alcanzar el día de parto con el objeto de evitar el gran aumento de sensibilidad a la oxitocina que ocurre en dicha condición. Las ratas utilizadas se encontraban en los días 18 a 25 de gestación siendo para esta cepa de ratas el día 27 el término del embarazo. En las ratas preñadas se realizó idéntico control de respuesta a dosis creciente de oxitocina señalado para las ratas controles (Figura 1 A). Los resultados obtenidos con úteros de las ratas preñadas demostraron igual respuesta entre la primera y segunda aplicación de dosis acumulativas de oxitocina (n= 5). La adición de insulina en las ratas preñadas al igual que en las controles no produjo un aumento en la contractilidad uterina (n= 8). En la Figura 2, se incluyen los resultados de un experimento tipo del registro de tensión en ausencia de insulina (Figura 2 A) o presencia de ambas hormonas (Figura 2 B).

Efecto de insulina en la actividad de la bomba de sodio en útero de ratas

El hecho de no observar ningún cambio con la adición de insulina en la respuesta oxitócica podría inferir que, la insulina no ejerce efecto alguno, en las condiciones experimentales, sobre las células del músculo liso uterino. En otros tejidos la insulina favorece la entrada de glucosa y potasio a la célula.

Con el fin de determinar si las dosis de insulina utilizadas eran adecuadas, se midió la entrada de potasio al tejido miometrial utilizando concentraciones similares a las descritas para el músculo esquelético de rata (22). Es sabido que el ion rubidio se comporta igual que el potasio en los tejidos biológicos, lo que permite utilizar rubidio radioactivo, obtenido de la Comisión Chilena de Energía Nuclear para la medición del transporte del potasio al tejido (21).

Como se muestra en la Figura 3 la insulina activó la entrada de potasio, a través de la Na-K ATPasa, en el tejido uterino, al igual de lo observado previamente en músculo esquelético (21). En efecto, la captación de ⁸⁶Rb/K sensible a la ouabaina fue significativamente mayor en presencia de insulina, n=5, p < 0,01. Estos resultados indican que la insulina tiene una acción clara en el miometrio y que la no modificación de la contractilidad no obedece a la ausencia de receptores para esta hormona, o a las condiciones experimentales utilizadas. Por otra parte, la captación de glucosa mediada por insulina, en los cuernos uterinos utilizados para los estudios tensiométricos, no afectó en forma significativa la concentración de glucosa del medio extracelular dado el gran volumen de éste (35 ml) versus el peso del tejido (25 mg).

DISCUSION

La oxitocina tiene su acción primaria en el músculo liso uterino. Es capaz de aumentar tanto la frecuencia como la duración de los potenciales de acción durante las contracciones uterinas (15). La

Figura 2. Registro tipo de la respuesta contráctil del músculo uterino de rata preñada (25 días) en respuesta a dosis crecientes de oxitocina sola (A) y de oxitocina en presencia de 200 mU/ml de insulina (B).

Figura 3. Efecto de insulina en la activación de la bomba de sodio del miometrio. Los resultados se expresan como la captación de $^{86}\text{Rb}/\text{K}$ sensible a ouabaina. Barras blancas tejido control; barras negras tejido con 200 mU/ml insulina $n=5$; $p < 0,05$.

administración de oxitocina inicia las contracciones en un útero quiescente llevándolo a un útero activo en el que la fuerza y frecuencia de las contracciones aumenta significativamente (23). Los estrógenos aumentan el efecto oxitócico reduciendo el potencial de membrana y por lo tanto disminuyendo el umbral de excitación (19). Por lo tanto, hacia el término del embarazo, en el que los niveles de estrógenos se elevan y el potencial cae existe una mayor tendencia a la apertura de los canales de Ca voltaje-dependientes que son estimulados por oxitocina. El número de receptores a oxitocina también aumenta y su activación conlleva a una elevación del Calcio citosólico movilizado a través de la hidrólisis de fosfatidilinositoles y a la apertura de canales de Ca (4). Pero aun se discuten los mecanismos que son relevantes en modular el tono del miometrio (19).

La infusión de oxitocina es comúnmente utilizada para inducir o favorecer el trabajo de parto. La hemorragia postparto, obedece muchas veces a un miometrio hipotónico que no logra contraerse de una manera adecuada. Existen diversas medidas que se utilizan en el manejo de la atonía uterina tales como la estimulación mecánica, la administración de oxitócicos o retractores uterinos, etc. (8-14). Si estas medidas fracasan en algunos centros hospitalarios es habitual administrar simultáneamente insulina y oxitocina. Dado que esta medida se une a otros procedimientos, no es fácil discernir si la insulina ejerce un efecto real en la contracción y retracción del miometrio.

En el presente trabajo se analizó si la insulina *per se* ejercía algún efecto en el tono del miometrio y si favorecía el efecto contráctil de oxitocina. Los

resultados realizados tanto en úteros de ratas controles en diversas fases del ciclo estral, como los de ratas preñadas, revelan que insulina no modificó la frecuencia o fuerza contráctil del útero en ausencia o presencia de oxitocina. Sin embargo, en las mismas condiciones experimentales, insulina estimuló significativamente la bomba de sodio del miometrio. Es sabido que un aumento en la actividad de la Na/K ATPasa se traduce en una mayor concentración de potasio en el interior de las células y este efecto llevaría a una hiperpolarización del tejido y eventual cierre de los canales de calcio voltaje dependientes.

El mecanismo de acción de oxitocina involucra la liberación de calcio citosólico por acción del Ip3 (17, 19) y también la apertura de canales de calcio voltaje dependientes (19), cuyo bloqueo disminuye la capacidad oxitócica del útero, tal como demostraron Muñoz y Marusic (20). La insulina al hiperpolarizar la célula favorecería el cierre de los canales de Calcio voltaje dependientes (19, 24). No obstante, hay que tener presente otros efectos de insulina que podían contrarrestar la acción de esta hormona sobre el potencial de la membrana celular, tales como su efecto energético. En efecto, la principal acción de esta hormona es favorecer la entrada de glucosa a través de los transportadores de la familia GLUT (25). La entrada de glucosa al interior de las células es de vital importancia en la homeostasia del organismo (26, 27) y en particular es crucial en la contracción del músculo esquelético debido a las grandes demandas energéticas en el proceso de contracción. También en el miometrio existen receptores de insulina cuyo número aumenta durante el embarazo (27). Sin embargo, no existían datos en la literatura que demostraran efecto de insulina sobre la captación de potasio en las células del músculo liso uterino, de manera semejante a lo observado en el músculo esquelético (21). Los resultados del presente trabajo demuestran por primera vez que insulina es capaz de afectar la entrada de potasio al miometrio.

Es conocido en la clínica el efecto hipokalémico de la insulina, que obedece principalmente a la entrada de potasio al músculo esquelético. Este hecho nos lleva a especular que los resultados obtenidos en la captación de K del útero de las ratas probablemente está también presente en el tejido uterino humano.

En resumen, los antecedentes obtenidos en el presente trabajo indicarían que la administración simultánea de insulina y oxitocina no tendrían valor terapéutico en el caso de la inercia uterina. Sería interesante en futuros estudios evaluar la posibili-

dad de un desarrollo terapéutico que favorezca un aumento en la concentración de calcio intracelular o una disminución del umbral del potencial de acción del miometrio y por ende favorecer en un útero quiescente su potencial capacidad contráctil.

BIBLIOGRAFIA

1. Caldeyro-Barcia R, Sereno JA: The response of the human uterus to oxytocin throughout pregnancy. En: Caldeyro-Barcia Heller (eds). *Oxytocin*. New York: Press 1961; 177-200.
2. Fuchs A, Fuchs F, Husslein P *et al*: Oxytocin receptors in the human uterus during pregnancy and parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 150: 734-41.
3. Fuchs A, Fuchs F, Husslein P *et al*: Oxytocin receptors and human parturition: a dual role for oxytocin in the initiation of labor. *Science* 1982; 215: 1396-8.
4. Gimpl G, Fahrenholz F: The oxytocin receptor system: structure, function and regulation. *Physiol Rev* 2001; 81(2): 629-68.
5. Mitchell BF, Fang X, Wong S: Oxytocin: a paracrine hormone in the regulation of parturition? *Rev Reprod* 1998; 3: 113-22.
6. Donoso E y cols: Mortalidad materna, perinatal e infantil en Chile. Análisis comparativo entre el año 1990 y 1998. *REV CHIL OBSTET GINECOL* 2000; 65(6): 473-7.
7. Prendiville W, Elbourne D, Chalmers J: The effects of routine oxytocic administration in the management of the third stage of labor. An overview of the evidence from controlled trials. *Br J Obstet Gynecol* 1988; 95: 3-16.
8. Hayashi RH, Castillo MS, Noah ML: Management of severe postpartum hemorrhage with a prostaglandin F-2 alpha analogue. *Obstet Gynecol* 1984; 63: 806-3.
9. Oleen MA, Mariano JP: Controlling refractory atonic postpartum hemorrhage with hemabate steril solution. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162: 205-8.
10. Lester WM, Barholomew RA, Colvin ED y cols: Reconsideration of the uterine pack in postpartum hemorrhage. *Am J Obstet Gynecol* 1965; 93: 321-5.
11. Drucker M, Wallach RC: Uterine packing: A reappraisal. *Mt Sinai J Med* 1979; 46: 191-4.
12. Clark SL, Phelan JP, Yeh S *et al*: Hypogastric artery ligation for obstetric hemorrhage. *Obstet Gynecol* 1985; 66: 353-6.
13. Montgomery L, Belfort M, Allon M, Moise K Jr: Hypogastric artery ligation is an effective and safe alternative to hysterectomy in patients with severe postpartum hemorrhage (abstr). *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 291.
14. O'Leary JL, O'Leary JA: Uterine artery ligation for control of postcesarean section hemorrhage. *Obstet Gynecol* 1974; 43: 849-53.
15. Tabb TN, Garfield RE: Molecular biology of uterine contractility. *Clin Obstet Gynecol* 1992; 35(3): 494-504.
16. Senior J, Marshall K, Sangha R, Clayton JK: In vitro characterization of prostanoid receptors on human

myometrium at term pregnancy. *Br J Pharmacol* 1993; 108(2): 501-6.

17. Pheneuf S, Europe-Finner GN, Carrasco MP, Hamilton CH, López Bernal A: Oxytocin signalling in human myometrium. *Adv Exp Med Biol* 1995; 395: 453-67.
18. Jenkin G: Oxytocin and prostaglandin interactions in pregnancy and parturition. *J Reprod Fertil Suppl* 1992; 45: 97-111.
19. Wray S: What are the physiologically relevant mechanism of modulating uterine force? *J Physiol* 2000; 523P: 49S.
20. Muñoz H, Marusic E: Efectos de los fármacos tocolíticos sobre la contractilidad uterina inducida por oxitocina in vitro. *REV CHIL OBSTET GINECOL* 1992; 57(3): 159-70.
21. Goecke IA, Bonilla S, Marusic ET, Alvo M: Enhanced insulin sensitivity in extrarenal potassium handling in uremic rats. *Kidney International* 1991; 39: 39-43.
22. Bonilla S, Goecke IA, Bozzo S, Alvo M, Michea L, Marusic E: Effect of chorionic renal failure on Na, K-ATPase $\alpha 1$ y $\alpha 2$ mRNA transcription in rat skeletal muscle. *J Clin Invest* 1991; 88: 2137-141.
23. Thomas N, Tabb MD, Robert E, Garfield PhD: Molecular biology of uterine contractility. *Clin Obstet Gynecol* 1992; 35(3): 494-504.
24. Lida S, Taguchi H, Watanabe N, Kushihiro T, Kanmatsuse K: Insulin-induced relaxation of rat mesenteric artery is mediated by Ca (2+) activated K(+) channels. *Eur J Pharmacol* 2001; 411(1-2): 155-160.
25. Litherland GJ, Hajduch E, Hundal HS: Intracellular signalling mechanisms regulating glucose transport in insulin sensitive tissues (review). *Mol Membr Biol* 2001; 18(3): 195-204.
26. Quinones-Galvan A, Ferrannini E: Metabolic effects of glucose-insulin infusions: myocardium and whole body. *Curr Opin Clin Nutr Metabol Care* 2001; 4(2): 157-63.
27. Molinari C, Battaglia A, Bona G, Grossini E, Mary DA, Ruggeri P, Stoker JB, Vacca G: Mechanisms of the renal vasodilation caused by insulin in anesthetized pigs. *Life Sci* 2001; 69(14): 1699-708.
28. Sakamoto H, Leraneth C, MacLusky NJ, Saito Y, Naftolin F: Insulin specific sites in the myometrium of pregnant rats. *Endocrinol* 1987; 120(5): 1951-5.

DISCUSION

Dr. **González**: Pregunta sobre condiciones de oxigenación del baño.

Dr. **Valderrama**: Realiza consideraciones sobre si se pueden asimilar los resultados en rata para humanos.

Dr. **H. Figueroa**: Las condiciones experimentales fueron de normoxia.

El plan inicial fue realizar una segunda etapa de estudio en humanos, sin embargo considerando estos resultados, no se avanzará con este protocolo por razones obvias.