



304406  
2  
22

**UNIVERSIDAD SIMON BOLIVAR**

CARRERA DE BIOLOGIA CON ESTUDIOS INCORPORADOS  
A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CARACTERIZACION DEL RECEPTOR DE ANDROGENOS  
EN LA GLANDULA DE HARDER

**T E S I S**

Para obtener el grado de

**LICENCIADO EN BIOLOGIA**

que presenta

**ADRIANA ESTELA URUETA CARROLA**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, DE SEPTIEMBRE, 1988.



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# I N D I C E

	PAGINA
- Abreviaturas empleadas en esta comunicación.....	i
- Nombres triviales y sistemáticos de esteroides naturales y sintéticos.....	11
I. INTRODUCCION.....	1
II. OBJETIVO.....	13
III. MATERIAL Y METODOS.....	14
IV. RESULTADOS.....	20
V. DISCUSION.....	43
VI. CONCLUSIONES.....	56
VII. APENDICE.....	57
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	58

## ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTA COMUNICACION

CI .....	Curle
dpm .....	Desintegraciones por minuto.
EDTA .....	Etilendiamino tetracetato disódico.
G.H. ....	Glándula de Harder.
DTT .....	Ditiotreitol.
CCD .....	Carbón cubierto con dextrán.
g .....	Gravedad.
Kd .....	Constante de disociación.
fmol .....	femtomolas.
S .....	Unidades Svedberg.
M .....	Molaridad.
V/V .....	Volumen/Volumen.
U/ml .....	Unidades/mililitro.
P/V .....	Peso/Volumen.
ASB .....	Albúmina Sérica Bovina.
a.e. ....	Actividad específica.
TSH .....	Hormona estimulante de la tiroides.
D.S. ....	Desviación estandar.

NOMBRES TRIVIALES Y SISTEMATICOS DE ESTEROIDES NATURALES Y  
SINTETICOS Y OTROS COMPUESTOS EMPLEADOS EN ESTE ESTUDIO

<u>NOMBRE TRIVIAL</u>	<u>NOMBRE SISTEMATICO</u>
1. Testosterona, (T)	17 $\beta$ -hidroxi-4-androsteno-3-ona
2. 19-Nor-testosterona, (19-Nor T)	17 $\beta$ -hidroxi-19-nor-4-androsteno-3-ona.
3. 5 $\alpha$ -Dihidrotestosterona, (5 $\alpha$ -DHT)	17 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstano-3-ona.
4. 5 $\beta$ -Dihidrotestosterona, (5 $\beta$ -DHT)	17 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstano-3-ona.
5. Progesterona	4-pregнено, 3,20-diona.
6. Estradiol	1,3,5(10) estratrieno,3,17 -diol.
7. $\Delta^4$ -Androstendiona	4-androsteno,3,17-diona.
8. Dehidroepiandrosterona (DHA)	3 $\beta$ -hidroxi-5-androsteno,17-ona.
9. $\Delta^5$ -Androstendiol	5-androsteno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol.
10. 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -Androstandiol	5 $\alpha$ -androstano,3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol.
11. 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -Androstandiol	5 $\alpha$ -androstano,3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol.
12. $\Delta^{16}$ -Androstenona	5 $\alpha$ -16-androsteno,3-ona.
13. 3 $\beta$ , $\Delta^{16}$ -Androstenona	3 $\beta$ -hidroxi,5 $\alpha$ ,16-androsteno-3-ona.
14. 3 $\alpha$ , $\Delta^{16}$ -Androstenona	3 $\alpha$ -hidroxi,5 $\alpha$ ,16-androsteno,3-ona.
15. Etiocolanolona	3 $\alpha$ -hidroxi,5 $\beta$ -androstano,17-ona.
16. Mibolerone, (DMNT)	7 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -dimetil-17 $\beta$ -hidroxi-19-Nor 4-androsteno-3-ona.
17. Metiltrienolona, (R 1181)	17 $\beta$ -hidroxi,17 $\alpha$ -metil-4,9-11,estra- triene,3-ona.
18. ORG 2058	16 $\alpha$ -etil-21-hidroxi-19-nor, 4-preg- нено,3,20-diona.
19. Acetonido de triamcinolona	1,4-pregnandienó, 9 $\alpha$ -fluoro-11 $\beta$ , 16 $\alpha$ ,17 $\beta$ ,21-tetrol 3,20-diona-16, 17 acetonido.

NOMBRE TRIVIAL

20. Tamoxifen

21. Tamoxifen aziridina

NOMBRE SISTEMATICO

2-[4(1,2-difenil-1-butenil) fenoxi]-  
N,N dimetiletanamina; 1-p~~o~~-dimetila  
minoetoxifenil-trans 1,2 difenilbut-  
1-eno.

2-[4(1,2-difenil-1-butenil) fenoxi]-  
N,N dimetiletanamina; 1-p~~o~~-dimetila  
minoetoxifenil-trans-1,2 difenilbut-  
1-eno, N-imina.

## CARACTERIZACION DEL RECEPTOR DE ANDROGENOS EN LA GLANDULA DE HARDER

### I. INTRODUCCION

A finales del siglo XVII el naturalista suizo Johan Jakob Harder (1657-1711), informó por primera vez de la existencia de una estructura localizada dentro de la órbita ocular. Por la excelente descripción anatómica de esta estructura intraorbital realizada por Harder en una especie de venado (Dama vulgaris) en la actualidad se le conoce como glándula de Harder o glándula Harderiana.

A excepción de los peces, la glándula de Harder (glándula palpebrae tertiae profunda), está presente en la mayoría de los vertebrados, y se desarrolla en asociación con la membrana nictitante o tercer párpado en animales adaptados a la vida terrestre, por lo cual se le atribuye como una de sus múltiples funciones, la de lubricar y humedecer la córnea en aquellos animales que poseen esta membrana.

Filogenéticamente, la glándula de Harder se encuentra presente en anfibios, reptiles, aves y mamíferos y aunque se le consideraba ausente en anfibios totalmente acuáticos se ha descrito en el Xenopus sp. donde ha sido estudiada con detalle (Shirama et al, 1982). En los primates, esta glándula existe sólo en forma vestigial, como una estructura embrionaria transitoria, desapareciendo por completo en las etapas tardías del desarrollo (Kennedy, 1970).

La glándula de Harder se encuentra situada en la parte profunda de la órbita ocular, en la región naso-posterior del globo ocular, y está asociada anatómicamente con los músculos oculares y extraoculares, ro-

deando una porción del nervio óptico (Venable y Grafflin, 1940). Esta estructura junto con las glándulas orbital externa e infraorbital forman parte de las glándulas orbitales (ver figura 1). En los anuros la glándula de Harder se desarrolla en etapas perimetamórficas (Shirama et al, 1982), mientras que en las aves ésta se desarrolla en íntima asociación con la membrana nictitante (Burns, 1975). El ducto de la glándula en los reptiles se abre dentro del órgano vomeronasal (Kennedy, 1970). Comparativamente en el armadillo (Weaker, 1981), los ductos de la glándula de Harder terminan en la base de la membrana nictitante, y en algunos mamíferos, un ducto simple de la glándula termina en la superficie interna del tercer párpado.

En la rata (Brownscheidle y Niewenhuis, 1978), ratón (Strum y Shear, 1982), hámster (Bucana y Nadakavukaren, 1972), conejo (Kühnel, 1971), y en otros mamíferos, la glándula de Harder es alargada, de tamaño relativamente grande, (ver figura 1), lobulada o bilobulada y estructuralmente está compuesta de túbulos y alveolos secretores, de secreción apócrina (Kennedy, 1970), holócrina (Hoffman, 1971), ó merócrina según la especie de que se trate. El tipo de secreción que elabora la glándula de Harder, puede ser de naturaleza serosa, mucosa, seronucoide, mixta y lipídica; aunque debe señalarse que la secreción de lípidos y la presencia de porfirinas han sido descritas únicamente en mamíferos (Brownscheidle y Niewenhuis, 1978; Figue y Davidheiser, 1960).

Esta estructura túbulo-alveolar se encuentra en la mayoría de los roedores, constituida por células mioepiteliales y por varios tipos diferentes de células secretoras (Strum y Shear, 1982).





Figura 1

Fig. 1 Localización anatómica de la glándula de Harder en rata, cuya posición retro-ocular es característica entre los roedores. Glándula orbital externa og; músculo oblicuo superior S.O., músculo bolicuo inferior I.O.; glándula infraorbital i.g. En detalle en la parte superior se muestra una glándula de Harder amplificada varias veces.

En la rata albina esta constituida por dos tipos de células: Las "Tipo A" y las "Tipo B". Las células "A" poseen grandes vacuolas de contenido lipídico, poco citoplasma intervacuolar y constituyen la mayor parte del epitelio glandular, mientras que las células "B" son más pequeñas, contienen vacuolas pequeñas y grandes cantidades de citoplasma intervacuolar y se encuentran en menor proporción. Una característica de las células "B" es la presencia de retículo endoplásmico liso abundante y de gran cantidad de mitocondrias.

Los dos tipos de células secretoras son de forma piramidal (Kanwar, 1960) y descansan sobre una lámina basal, la cual está revestida de células mioepiteliales. Es frecuente encontrar uniones del tipo desmosomal entre estas células mioepiteliales (Kanwar, 1960; Brownscheidle y Niewenhuis, 1978). En el lumen de algunos alveolos se observan acumulaciones de pigmentos o material denso, de coloración café rojizo que se han identificado como porfirinas predominantemente copro y proto-porfirinas y una Harderoporfirina que ha sido aislada exclusivamente de la glándula de Harder de la rata albina (Kennedy, 1970).

No existe dimorfismo sexual en la glándula de Harder de la rata. De hecho, no se han encontrado diferencias morfológicas de la glándula entre la rata hembra y la rata macho, aunque el peso de la glándula de Harder parece ser ligeramente mayor en el macho; histológicamente no se observan diferencias significativas entre ambos sexos, esto es, contienen el mismo arreglo celular y la única diferencia discreta es al parecer, la presencia de una mayor cantidad de lípidos en los alveolos de la rata macho (ver figuras 2 y 3).

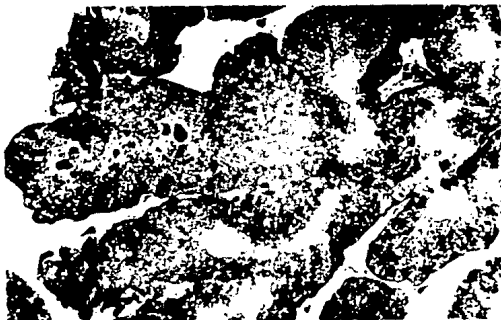


Fig. 2 Preparación histológica de glándula de Harder de rata normal. Nótese la presencia de pigmentos en el lumen del alveolo (Izq.) y el depósito de material lipídico. Azul de toluidina 250 X.

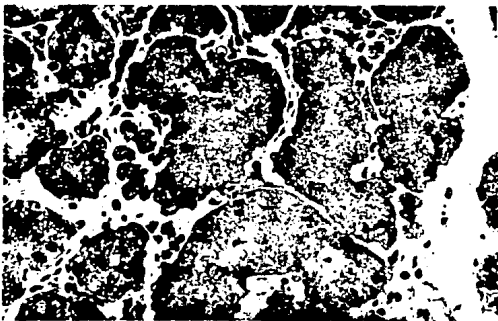


Fig. 3 Preparación histológica de glándula de Harder de rata hembra. Se muestran detalles de varios acinos glandulares con vacuolización homogénea y núcleos basales picnóticos. Azul de toluidina 250 X.

Los resultados de estudios (Christensen, 1953; Wooley y Worley, 1954), realizados en la glándula de Harder del hámster, indican que morfológicamente es similar, pero no idéntica a la glándula de la rata; ya que las glándulas del macho son más grandes que en la hembra y de color más claro, mientras que en la hembra son pequeñas, de color grisáceo, y bajo la luz ultravioleta exhiben diversos grados de fluorescencia (Kennedy, 1970), lo cual es debido a la alta concentración de porfirinas, que es característico de la glándula tipo hembra (Hoffman, 1971). El arreglo celular de la glándula en el hámster sigue casi el mismo patrón que en la rata, éste es; una membrana basal sobre la cual descansan células mioepiteliales que contienen filamentos finos en su citoplasma y núcleos relativamente grandes, y sobre éstas células descansan los componentes del epitelio secretor (Bucana y Nadakavukaren, 1972). Sin embargo, a diferencia de lo observado en la rata, en la glándula de Harder del hámster existe un verdadero dimorfismo sexual, (Christensen y Dam, 1953; Wooley y Worley, 1954; Payne et al, 1977; Wen Lang y Nadakavukaren, 1979; Hoffman y Jones, 1980; Thomson et al, 1984; Johnson y Reiter, 1985). La glándula de la hembra posee únicamente un tipo de células acinares ó tipo "I" similares al tipo "A" de la glándula de la rata, que se caracterizan por su forma piramidal, citoplasma finamente vacuolado, de núcleo basal y que presentan en su porción apical depósitos de pigmentos oscuros (porfirinas) una característica única de la glándula femenina (ver figura 4 y 5). Algunas células epiteliales secretoras poseen microvellosidades en el ápice así como una marcada interdigitación celular.

En el hámster macho, la glándula de Harder presenta las siguientes di-



Fig. 4 Corte histológico de glándula de Harder de hámster normal. Se observa una marcada concentración de pigmentos en el lúmen alveolar y un solo tipo celular (Tipo I). Los núcleos de éstas células son basales. Azul de toluidina 250 X.

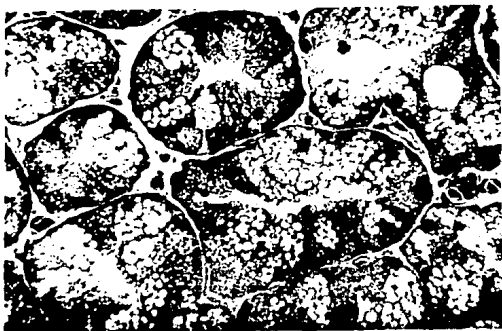


Fig. 5 Corte histológico de glándula Harderiana de hámster macho normal. Las células tipo II características del macho, con tienen vacuolas grandes y se observan en mayor proporción (claras) que las células tipo I, (oscuras). En todos los acinos se encuentran dispersos núcleos basales picnóticos. Azul de toluina 250 X.

ferencias morfológicas con respecto a la glándula de la hembra: existe otro tipo de células epiteliales secretoras, además de las células tipo I, las células tipo II, cuya presencia es exclusiva del hámster macho y se caracterizan por presentar una vacuolización extensa en su citoplasma. Estas células son generalmente largas y ocluyen la luz del alvéolo y contienen material lipídico finamente granulado y disperso en todo el citoplasma (Hoffman, 1971). Aproximadamente un tercio de las células secretoras de la glándula del macho contienen grandes vacuolas en la parte apical que parecen estar fusionadas al lumen (Bucana y Nadakavukaren, 1972). Cada célula secretora tiene un núcleo de localización basal, con dos o más nucleolos. El análisis ultraestructural de la célula tipo II revela la presencia de "racimos" de túbulos cilíndricos rodeados de membranas distribuidos al azar en todo el citoplasma, cada túbulo pareciera estar compuesto de subunidades microtubulares (Bucana y Nadakavukaren, 1972).

Estos racimos tubulares no se observan en las preparaciones histológicas de glándulas Harderianas del hámster hembra. Contrariamente a lo observado en la rata macho, en la glándula del hámster macho no se observan depósitos tisulares de porfirinas; sin embargo, la castración induce una rápida y gradual concentración de las mismas en las células secretoras (Hoffman, 1971; Payne *et al.*, 1977; Bucana y Nadakavukaren, 1978; McMasters y Hoffman, 1984).

En la glándula de Harder de algunos mamíferos se presentan y acumulan grandes cantidades de porfirinas que son sintetizadas y almacenadas dentro de la glándula. En experimentos en los que se ha utilizado como precursor ácido  $\delta$ -aminolevulínico parece ser que las enzimas nece

sarias para la biosíntesis de protoporfirinas están presentes en la glándula de Harder (Davidheiser y Figge, 1955; Figge y Davidheiser, 1957, 1960).

En el hámster sirio la concentración de protoporfirinas dentro de la glándula es inclusive, mayor a la encontrada en el hígado y la sangre. Por otra parte, cuando se analiza la actividad enzimática de una glándula proveniente de un macho contra la de una hembra, la diferencia más significativa tal vez sea la relativa a la actividad de la enzima ácido- $\delta$ -aminolevulínico sintetasa (la enzima limitante en la síntesis del anillo pirrólico), que en las hembras está incrementado de 5 a 6 veces con respecto a la actividad en el macho (Thompson *et al.*, 1984). Este conocimiento puede ser de interés para conocer el papel que desempeñan las porfirinas Harderianas en la fisiología de la glándula, ya que su síntesis parece estar controlada por diferentes estímulos hormonales provenientes tanto de la hipófisis anterior, la glándula pineal y las gónadas, lo cual sugiere un control hormonal fino, el cual a su vez depende del estado fisiológico del animal.

Durante el ciclo estral del hámster, las concentraciones totales de porfirinas, así como el peso de la glándula sufren variaciones significativas en las diferentes etapas, encontrándose incrementadas durante el estro. Las concentraciones de porfirinas, también se encuentran considerablemente altas a lo largo de la gestación y en las primeras etapas de la lactancia (Payne *et al.*, 1979). En la rata adulta no se han encontrado diferencias morfológicas importantes entre el macho y la hembra, en las glándulas de ambos sexos la concentración de pigmentos parece ser similar y las características ultraestructurales de un

animal orquidectomizado no son distintas a las de un animal intacto (Brownscheidle y Niewenhuis, 1978), así mismo existen depósitos de pigmentos en la glándula tanto del macho como de la hembra.

Por el contrario, en el hámster macho la castración induce un incremento en la producción de porfirinas dentro de la glándula, lo que contrasta con lo observado en el animal intacto, donde estos pigmentos se encuentran en cantidades mínimas o están ausentes (Hoffman, 1971; Lin y Nadakavukaren, 1979). También el peso de la glándula de Harder es menor en el animal castrado, la ovariectomía en la hembra parece no tener efectos importantes sobre la arquitectura celular, ni sobre las concentraciones de pigmentos. Sin embargo, la administración repetida de testosterona a estas hembras induce alteraciones a nivel celular y una reducción en las concentraciones de pigmentos intra-acinares (Clabough y Norvell, 1973; Sun y Nadakavukaren, 1980).

En el hámster normal, existe una marcada diferencia en el contenido intraglandular de varios metales y que de alguna manera están regulados por esteroides gonadales. En el macho se encuentran grandes cantidades de molibdeno (Mo) y hierro (Fe), mientras que en la hembra, estos niveles son bajos pero después de la ovariectomía incrementan las concentraciones de Fe; el Mo en los animales castrados disminuye (Hoffman y Jones, 1981). La influencia de la luz sobre la modulación de la glándula de Harder ha sido extensamente estudiada (Hoffman, 1979; Clabough y Norvell, 1973; Joó y Kahán, 1975; Pang et al; Hoffman, 1985). Así Wetterberg, Geller y Yuwiler (1970), estudiando el efecto del fotoperíodo sobre la glándula de Harder, demostraron la influencia que la pineal ejerce sobre la glándula y sugirieron una vía extrarretinal



para este control. La exposición a diferentes fotoperíodos trae como consecuencia alteraciones importantes en la ultraestructura glandular (Zweig et al, 1966; Feria Velasco et al, 1984). Como ha sido sugerido por varios autores, en las ratas neonatas los impulsos luminosos provenientes del medio ambiente modificarían, vía pineal la secreción de hormonas gonadales (ya que un efecto antigonal de la melatonina ha sido sugerida; Cardinali y Wurtman, 1972; Turek et al, 1975), y éstas a su vez ejercería su efecto sobre la glándula de Harder.

Aunque en su totalidad la pineal produce melatonina, exclusivamente la parte externa esta implicada en las modificaciones del control de la función gonadal en roedores (Anderson y Turek, 1985), mientras que la porción profunda o nerviosa de esta estructura parece no estar involucrada. Recientemente se ha demostrado que la glándula de Harder de de hámster produce melatonina in situ y presenta variaciones en su concentración, siendo éstas más altas en la hembra que en el macho (Hoffman, Johnson y Reiter, 1985).

La competencia de hormonas hipofisarias en el control y mantenimiento de la función de la glándula Harderiana ha sido sugerida por varios autores (Boas y Bates, 1954; Lorincz y Lancaster, 1957; Wetterberg et al, 1970; Ebling et al, 1975). Sin embargo, el rol específico de cada una de ellas no ha sido esclarecido en la actualidad. La hipofisectomía o la tiroidectomía resultan en la atrofia de la glándula de Harder en la rata y esta alteración puede ser prevenida por la administración de una preparación de hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona de crecimiento (HG) ó somatotropina (Boas y Bates, 1954). El peso de la glándula, no se restaura en animales hipofisectomizados y castrados después

de la administración de testosterona más -MSH (hormona estimulante de los melanocitos), (Ebling et al, 1975). En el hámster la hipofisectomía produce efectos similares que en la rata, la talla de la glándula reduce, y la administración de tiroxina parece mantener su peso pero ésta no impide el depósito de porfirinas (Hoffman, 1971; Clabough y Norvell, 1973), la regulación de la glándula de Harder en ésta especie representa un caso único por las diferencias en el patrón de secreción de gonadotrofinas entre la hembra y el macho (Allen et al, 1978).

## II. OBJETIVO.

Los resultados de observaciones experimentales muestran que la glándula de Harder presenta diferencias morfológicas, histológicas, ultraestructurales y bioquímicas entre los diferentes grupos de vertebrados, sin embargo, su función y los mecanismos que la regulan son en la actualidad poco conocidos. En los mamíferos y en particular en los roedores, la glándula de Harder parece estar controlada tanto por factores externos, como por las secreciones de órganos endócrinos.

Así, el efecto de las hormonas hipofisarias, tiroideas, pineales y gonadales, sobre las células que componen la glándula de Harder ejercen un efecto modulador, que en conjunto, regulan la actividad de ésta glándula. Este último grupo de hormonas esteroides gonadales, parecen estar desempeñando un papel fundamental en el mantenimiento de la actividad celular glandular.

A fin de establecer si la sensibilidad de la glándula de Harder a esteroides (andrógenos) gonadales es mediada a través de la interacción con receptores específicos intracelulares, los objetivos del presente estudio son: a) Identificar la presencia de receptores para andrógenos en la glándula de Harder en dos especies de roedores (rata y hámster), y b) Caracterizar los parámetros de unión del receptor de andrógenos en el citosol de las células de la glándula de Harder, como eventos primarios de su acción a nivel celular.

### III. MATERIAL Y METODOS

Materia] Radiactivo, compuestos esteroides y otros reactivos. (17 $\alpha$ -metil-<sup>3</sup>H) mibolerona, DMNT (a.e. 79 Ci/mmol), 5 $\alpha$ -[1 $\alpha$ , 2 $\alpha$ (n)-<sup>3</sup>], Androstan-3 $\beta$ -17 $\beta$  diol, 3 $\beta$ -Androstandiol (a.e. 40 Ci/mmol), (Ani 110-<sup>3</sup>H) Tamoxifen Aziridina (a.e. 21 Ci/mmol), (2,4,6,7-<sup>3</sup>H),Estradiol (a.e. 92 Ci/mmol) y (6,7-<sup>3</sup>H), ORG 2058 (a.e. 45 Ci/mmol), fueron adqui ridos de Amersham International, Amersham Bucks, Inglaterra. (1,2,4, 5,6,7-<sup>3</sup>H) 5 $\alpha$ -Dihidrotestosterona (a.e. 123 Ci/mmol), fué adquirida de New England Nuclear (Boston, MA. U.S.A.).

La pureza radioquímica de los compuestos tritiados fué mayor al 99% siendo determinada por cromatografía en papel y otras técnicas como ya ha sido reportado (Chávez et al, 1985). Los esteroides no-marcados (ver nombres triviales y sistemáticos), obtenidos de Steraloids (Pauling N.Y.), Amersham International y Sigma Chemical Co. (St.Louis MO.U.S.A.), fueron purificados por recristalización y se determinó su punto de fusión (m.p.), utilizando un equipo Mettler FP61 (Mettler Inst. Greifense, Switzerland).

Albúmina sérica bovina teñida con azul naftol, (4.6 S), y el Azul brillante de Coomassie (Brilliant Blue G) utilizado para la determinación de protefnas fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. Los reactivos em pleados fueron de grado analítico y repurificados cuando se consideró necesario.

## ANIMALES Y TEJIDOS

Para el presente trabajo se utilizaron ratas machos Rattus rattus de la cepa Wistar, de 200-250 g. Los animales fueron mantenidos en grupos de cinco por caja, con temperatura constante de  $22 \pm 2$  °C y bajo ciclos de luz-obscuridad de 14 y 10 h respectivamente. Los animales tuvieron libre acceso al alimento (Purina) y agua.

Los animales fueron anestesiados con éter y castrados bilateralmente vía incisión escrotal simple y mantenidos en recuperación por diferentes períodos. Al tiempo de los experimentos los animales fueron sacrificados por decapitación, e inmediatamente las glándulas de Harder fueron removidas en su totalidad y se colocaron en una solución Tris HCl 20 mmoles/l, pH 7.4, EDTA 1.5 mmoles/l, DTT 0.25 mmoles/l, molibdato de sodio 10 mmoles/l, y glicerol al 10% V/V (buffer TEDMG), a 4°C (sobre hielo). El tejido se lavó con solución TEDMG fresca, se limpió y pesó en balanza analítica. Posteriormente fué transferido a solución amortiguadora (TEDMG), fresca.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Obtención de la fracción soluble (citosol) de las células de la glándula de Harder.

La glándulas de Harder mantenidas en la solución TEDMG, fueron cortadas en fragmentos pequeños y homogeneizados con una solución amortiguadora TEDMG pH 7.4 suplementados con 5000 U/ml de Aprotinina (como inhibidor de proteasas, Sigma Chemical Co. St. Louis MO, U.S.A.) en relación 1:4 P/V. Los tejidos se homogeneizaron en frío por cinco

segundos (dos golpes) a 5000 rpm en un homogeneizador POLYTRON (Brickman instruments, Wetsbury N.Y.), el homogenado fué transferido a tubos de polialomero de 12.7 x 50.8 mm (Sorvall instruments, Dupont Willmington DE, U.S.A.) y centrifugado a 105000 xg a 2-4 °C por 60 minutos en un rotor SW 50.1 (rmax 10.73 cm), utilizando una ultracentrifuga Beckman modelo L8-70.

El sobrenadante con la fracción soluble o citosol, fué empleado para los estudios de marcaje in vitro.

El contenido de proteínas en esta fracción fué determinado por el método de Bradford\* (Bradford, 1976).

#### Análisis del receptor de Andrógenos en citosol.

El citosol de glándulas de Harder de hámster castrados tres días antes y ratas con 24 h de castradas fué incubado con DMNT-<sup>3</sup>H a 4 °C por diferentes períodos de tiempo (1-24 h), con el fin de determinar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de la unión de DMNT-<sup>3</sup>H al receptor de andrógenos en el citosol. Para éste fin, alícuotas de citosol (200  $\mu$ l) se incubaron con 0.2 pmolas de DMNT-<sup>3</sup>H solo ó con un exceso de DMNT no marcada (20 pmolas) a 4 °C por diferentes tiempos. Después de cada incubación, la fracción unida fué separada por la adición de 800  $\mu$ l de una suspensión de carbón cubierto con dextrán (Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Suiza) en solución amortiguadora TEDMG pH 7.4 suspensión CCD, ésta mezcla se centrifugó a 800 xg por diez minutos. El contenido de radiactividad en el sobrenadante, fué determinado en alícuotas a las cuales se les agregó 5 ml de una solución de centelleo

\* ver apéndice.

(Instagel, Packard Dawners Grove, IL, U.S.A.), y contadas en un espectrómetro de centelleo líquido Packard TRI-CARB (modelo 2660), cuya eficiencia de conteo para tritio fué mayor al 45%. El apagamiento (Quenching), se corrigió en cada muestra por estandarización externa y los resultados fueron expresados en desintegraciones por minuto (dpm). De la diferencia entre la unión total menos la unión no específica (DMNT- $^3\text{H}$  - DMNT $^0$ ) se obtuvo la unión específica o fracción específicamente unida y los resultados se graficaron como el Esteroide- $^3\text{H}$  unido, contra tiempo de incubación.

#### Análisis de Saturación del Receptor de andrógenos.

Los parámetros de unión al equilibrio entre la DMNT- $^3\text{H}$  y los sitios de unión de capacidad limitada, del citosol, fueron determinados por medio de incubaciones de la fracción soluble obtenida por homogeneizar y centrifugar las glándulas de Harder de rata o hámster machos (castrados 24 ó 72 horas). Para éste fin los extractos se incubaron con DMNT- $^3\text{H}$  (1.0 nM), más concentraciones crecientes de la hormona correspondiente no marcada. Las incubaciones se llevaron a cabo por 16 horas a 4 °C.

La fracción del complejo hormona-receptor, fué separada de la fracción libre del esteroide por la adición de CCD seguida de una incubación por cinco minutos en agitación continua a 4 °C. La unión no específica, fué determinada por la adición de un exceso (100 X) de la hormona no-marcada al último punto en cada determinación.

Los resultados fueron analizados por el método de Scatchard (Scatchard, 1949), y la unión máxima o número de sitios de unión fueron expresados como fmolas unidas por miligramos de proteínas.

### Especificidad de Unión del complejo DMNT-<sup>3</sup>H H-Receptor.

Para evaluar la especificidad de unión de la DMNT-<sup>3</sup>H con el receptor citosólico de las glándulas de Harder, tanto en la rata como en el hámster, se llevaron a cabo una serie de ensayos de competencia por el sitio de unión entre la DMNT-<sup>3</sup>H y varios compuestos esteroides de la serie C<sub>21</sub>, C<sub>19</sub> y C<sub>18</sub>. Alicuotas de citosol de la glándula de Harder de rata o hámster, se incubaron con una concentración fija de DMNT-<sup>3</sup>H (nM) sola o en presencia de concentraciones crecientes de diferentes compuestos no marcados, incluyendo progestágenos, andrógenos o estrógenos (ver figura 12, 13, 14 y 15). Después de la incubación se les agregó 0.8 ml de CCD pH 7.4 a 4 °C, permaneciendo expuestos a esta suspensión por cinco minutos con agitación continua. La fracción unida fue separada por centrifugación a 800 x g y alícuotas del sobrenadante fueron tomadas para cuantificar la radiactividad. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de unión de la DMNT-<sup>3</sup>H (control), y graficados contra la concentración media (IC<sub>50</sub>) de desplazamiento de la hormona isotópicamente marcada (Reel et al, 1979).

### Sedimentación del receptor de andrógenos en gradientes de sacarosa.

El patrón de sedimentación del complejo DMNT-<sup>3</sup>H-Receptor se analizó en gradientes de densidad de sacarosa del 20-35%. El citosol obtenido de glándulas de Harder de ratas o hámster (castrados a diferentes tiempos), fue incubado con DMNT-<sup>3</sup>H suministrado en concentraciones del orden de 10<sup>-9</sup> M por 16-20 h a 4 °C. Las muestras fueron tratadas con CCD como se indicó previamente y alícuotas de 0.5 ml de citosol marcado fueron colocadas sobre gradientes lineales de sacarosa de 20-35%. Los gradientes fueron preparados en tubos de polialómero (13 x 51 mm)



con un formador de gradientes (Buchler, Instruments Fort Lee, N.J. U.S.A.). Los tubos de polialómero fueron sellados térmicamente y centrifugados, usando aceleración lenta a 65 000 rpm (370 000 x g), en un rotor vertical VTi 65 (Beckman). Al término de la centrifugación, los gradientes fueron fraccionados puncionando el fondo del tubo y el contenido de radiactividad en cada fracción se determinó en el contador de centelleo líquido. Gradientes con Albúmina Sérica Bovina (4.6 S), teñida con azul naftol (Kouvonen et al, 1978), fueron corridos en paralelo y utilizados como referencia.

Las características de sedimentación del complejo DMNT-<sup>3</sup>H-Receptor fueron determinadas por el método de Martin y Ames (1962).

La especificidad de unión del complejo DMNT-<sup>3</sup>H-Receptor fué determinada incubando el citosol con DMNT-<sup>3</sup>H en presencia de un exceso (100 X) de DMNT no marcada, 5 $\alpha$ -DHT, triamcinolona acetónido y otros compuestos y procesadas de igual manera.

Otros radioligandos como el 3 $\beta$ -5 $\alpha$ -Androstandiol-<sup>3</sup>H, ORG 2058-<sup>3</sup>H y 17 $\beta$ -Estradiol-<sup>3</sup>H fueron también incubados con citosol y procesados como la DMNT-<sup>3</sup>H para comprobar o descartar la existencia de otros sistemas de receptores.

#### IV. RESULTADOS

Se ha observado que la exposición a diferentes esquemas de iluminación (fotoperíodo), produce alteraciones fisiológicas reversibles, en los animales de experimentación; la glándula de Harder en éstos animales es muy susceptible a estos cambios, que se traducen en modificaciones histológicas, morfológicas y ultraestructurales, es por esto, que los animales utilizados en el presente estudio fueron mantenidos bajo condiciones de luz oscuridad (14/10) y temperatura ( $22 \pm 2$  °C) constantes.

Con el fin de corroborar las condiciones de los tejidos empleados al tiempo de los experimentos, biopsias de glándulas de Harder tomadas al azar de los diferentes grupos experimentales, fueron analizadas histológicamente. Las observaciones histológicas fueron similares a las ampliamente descritas por varios autores (Hoffman, 1971; Bucana y Nadakavukaren, 1972; Brownscheidle y Niewenhuis, 1978) para estas especies, bajo condiciones normales.

En las figuras 2 y 5 se muestra que las características histológicas de las glándulas de Harder utilizadas en este trabajo son las típicas de animales machos (Hoffman, 1971; Payne et al, 1977; Lin y Nadakavukaren, 1979).

Ratas albinas adultas y hámster sirios adultos, fueron orquidectomizados bilateralmente a diferentes tiempos, con el objeto de remover la mayor parte de los andrógenos endógenos, y el tejido Harderiano de estos animales fué utilizado a lo largo de los experimentos in vitro.

En un primer grupo de experimentación, se determinó la unión de la

DMNT-<sup>3</sup>H en el citosol de la glándula de Harder de la rata y del hamster, se observó una unión específica del andrógeno sintético. Como se muestra en las figuras 6 y 7 en ambas especies la unión específica máxima es alcanzada a las ocho horas de incubación y permanece estable por lo menos hasta las 24 horas. En contraste, existen diferencias en la unión máxima (expresada en fmolas unidas/mg de proteínas del citosol), de la DMNT-<sup>3</sup>H, siendo de 3 - 4 veces mayor en la glándula del hámster que en la de la rata (Fig. 7). Aunque diferente en concentración el componente de unión citosólica se encuentra presente en ambas especies.

Por otra parte la actividad de unión específica, se alcanzó a las ocho horas no mostrando variaciones en las siguientes 12 horas, por lo que los experimentos subsecuentes se realizaron por 18 - 20 horas (toda la noche) a 4 °C, para asegurar el equilibrio de unión.

El efecto del tiempo de exposición de la mezcla al carbón cubierto con Dextrán para separar la fracción libre del esteroide, fué determinado a tres diferentes tiempos como se muestra en la figura 8. Si bien, la unión permanece casi constante después de la exposición a la suspensión de carbón por estos periodos, un tiempo corto (2 min) parece incrementar la unión no-específica, con esto se determinó que el tiempo óptimo para separar la fracción libre de la fracción unida es de 5 minutos, ya que la unión específica es mayor, tomando en cuenta la unión no-específica es la más baja entre los tiempos determinados.

La castración en el hamster macho produce cambios en la citoarquitectura de la glándula de Harder que se manifiesta gradualmente conforme pasa el tiempo después de la operación cambios no observados en la

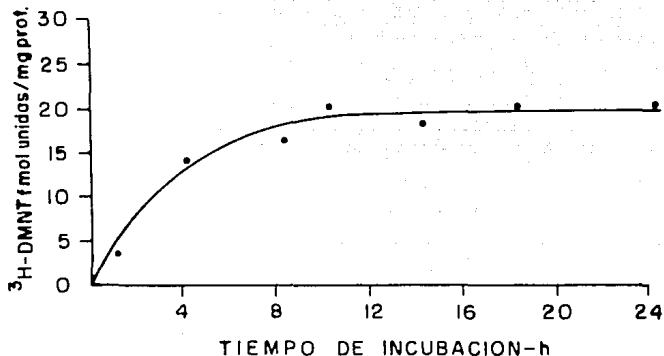


Fig. 6 Unión de la DMNT- $^3\text{H}$  en el citosol de glándula de Harder de rata en función de tiempo. El citosol fué incubado con DMNT- $^3\text{H}$  (1 nM), en presencia o ausencia de DMNT no marcada por diferentes periodos de tiempo a 4 °C. La unión específica se calculó por la sustracción de la hormona radioactiva unida en forma no específica a la unión total. Cada punto representa la media de determinaciones por triplicado.

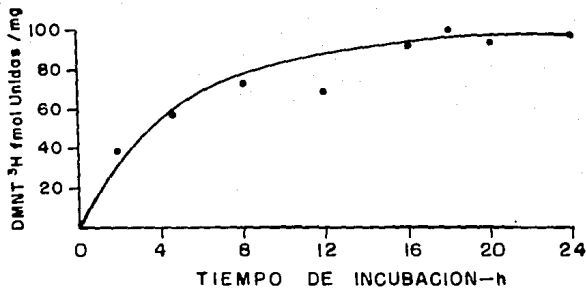


Fig. 7 Cinética de Unión de la DMNT- $^3\text{H}$  en el citosol de la glándula de Harder de hámster en función del tiempo de incubación. El citosol fué incubado con DMNT- $^3\text{H}$  (1 nM), en presencia o ausencia de DMNT no marcada por diferentes períodos de tiempo a 4 °C. La unión específica se calculó por la sustracción de la unión no-específica a la unión total. Cada punto representa la media de determinaciones en triplicado.

glándula de la rata, por este motivo, el efecto del tiempo después de la castración sobre la unión de la DMNT-<sup>3</sup>H en la glándula de ésta primera especie fué determinada con el fin de evitar una subestimación de la cuantificación de la unión específica.

La fracción soluble de las glándulas de hámsters castrados por 3, 30 ó 60 días fue incubada con DMNT-<sup>3</sup>H, o en presencia de DMNT radioinerte, y se midió la unión específica de cada una de éstas fracciones (figura 9). En términos de concentración no se observó una diferencia entre el grupo de animales de 3 días ( $83.6 \pm 3.9$ ), 30 días ( $85.8 \pm 3.5$ ), 60 días ( $77.3 \pm 0.7$ ), cuando se expresa en fmolas unidas por mg de proteína en el citosol de éstos grupos.

Cuando los extractos de la fracción soluble de la glándula de Harder se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de DMNT-<sup>3</sup>H, ó bien con una concentración fija de DMNT-<sup>3</sup>H, más concentraciones crecientes de DMNT no marcada (Fig. 10), la saturación de la unión ocurre aproximadamente a 2-4 nmol/l en el citosol de la rata (Fig. 10), mientras que en el citosol de la glándula del hámster esta saturación se alcanza antes a concentraciones de entre 1-2 nmol/l (Fig. 11).

El análisis de los datos de la unión de la DMNT-<sup>3</sup>H con el receptor de andrógenos por el método de Scatchard mostró un componente simple único de unión de alta afinidad cuya constante de disociación (Kd), es de  $8.9 \times 10^{-10}$  M, para el componente citosólico de la rata (Fig. 10) y de  $3.0 \times 10^{-10}$  M para la unión en el citosol del hámster (Fig. 11).

La capacidad máxima de unión mostró diferencias entre las preparaciones de éstas dos especies, cuando se analizaron por el método de Scatchard (Figs. 10 y 11), observándose, para el componente de alta

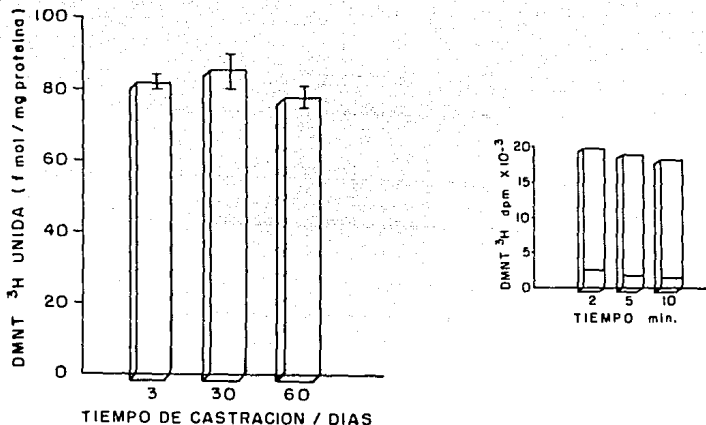


Fig. 8 Efecto de la exposición al carbón por diferentes tiempos de incubación sobre la unión específica de la DMNT en el citosol en la glándula de Harder de hámster. Aliquotas de citosol (0.1 ml), fueron incubadas con la DMNT-<sup>3</sup>H (0.96 nM) durante 18 h a 4 °C. Las muestras incubadas fueron tratadas con carbón cubiertas con dextrán por diferentes períodos de tiempo (2, 5 y 10 minutos), y centrifugados a 800 x g. Se muestra la unión total y la unión no específica de determinaciones por triplicado.

Fig. 9 Figura que muestra el efecto de la castración sobre la unión de la DMNT-<sup>3</sup>H de la glándula de Harder en hámster machos orquidectomizados por diferentes períodos de tiempo (3, 30 y 60 días). Incubaciones del citosol con el andrógeno sintético o más un exceso de DMNT no marcada fueron llevadas a cabo por 18 h a 4 °C. La unión específica determinada simultáneamente en cada uno de los grupos experimentales fue expresada como fmolas unidas por mg de proteína. Valores promedio  $\pm$  D.S.

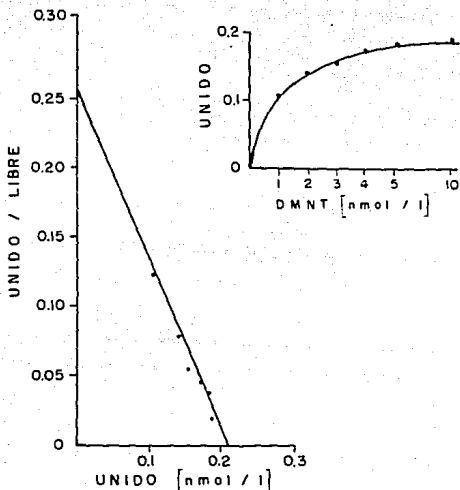


Fig. 10 Análisis de saturación de la interacción de la DMNT-<sup>3</sup>H con el receptor de andrógenos. Alicuotas de citosol (6 mg prot./ml), obtenido de glándulas de Harder de rata macho castrada se incubaron con DMNT-<sup>3</sup>H (0.2 pmoles) a 4 °C en presencia de concentraciones crecientes (0 - 1.8 pmoles) de dimetilnor-testosterona radioinerte. La unión total se obtuvo por la sustracción de la unión específica de la unión total. El análisis de los datos representados por el método de Scatchard muestran un componente de unión de alta afinidad (parte inferior de la gráfica).



afinidad del hámster una concentración aproximadamente dos veces mayor ( $113 \pm 15$  fmolas/mg proteína), que en el citosol de la glándula de la rata ( $63 \pm 14$  fmolas/mg proteína).

La inhibición de la unión de DMNT- $^3\text{H}$  a los sitios de alta afinidad por diferentes esteroides, fué estudiada con objeto de determinar la especificidad de ésta unión. La fracción soluble (citosol) de las glándulas de Harder de ratas y hamsters machos, fué incubada con Dimetilnor-testosterona- $^3\text{H}$  sola, (1 nmola/ml) o en presencia de 5, 10, 50, 100, 250 ó 500 veces el exceso de esteroides no radiactivos en este caso la unión no específica esta representada por aquélla unión no desplazada por la adición de 250 ó 500 veces de DMNT no marcada (rata y hámster respectivamente), como se indica en las figuras 12-15. Se observó que la concentración de DMNT (radioinerte) requerida para desplazar al 50% de la unión de DMNT- $^3\text{H}$  fué determinada y a la cual se le asignó una afinidad relativa de 100% (% de unión). Las concentraciones de otros esteroides tanto  $\text{C}_{21}$ ,  $\text{C}_{19}$  y  $\text{C}_{18}$  requeridas para desplazar el 50% de ésta unión fueron comparadas contra la DMNT y constituye la afinidad relativa de unión (figuras 13-15). El componente de unión del citosol de la glándula de Harder de rata muestra ser altamente específico para andrógenos, ya que, exclusivamente los esteroides de probada capacidad androgénica o con una estructura relativa a la de testosterona, compiten efectivamente por los sitios de unión cuando se incuban a bajas concentraciones, de ésta manera la  $5\alpha$ -Dihidrotestosterona, el andrógeno sintético metiltrienolona (R 1881), la testosterona misma, la 19-Nortestosterona y en menor grado, el  $\Delta^5$ -Androstendiol (considerado un andrógeno de acción débil), son capaces de competir con la DMNT y de

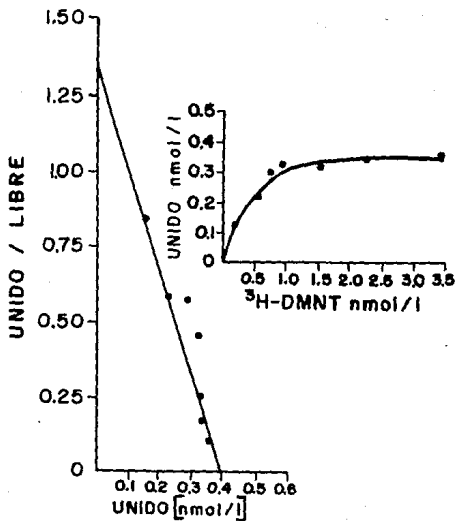


Fig. 11 Análisis de Scatchard de la unión de DMNT-<sup>3</sup>H con el receptor de andrógenos en la glándula de Harder del hámster. La saturación de los sitios de unión de capacidad limitada citosólicos fueron determinados al equilibrio por incubaciones *in vitro* de diferentes concentraciones de DMNT-<sup>3</sup>H (0.2 - 4.0 nmol/l), en presencia o ausencia de un exceso de DMNT no marcada. Una curva de saturación de la unión específica de DMNT-<sup>3</sup>H con el receptor de andrógenos se muestra en el recuadro.

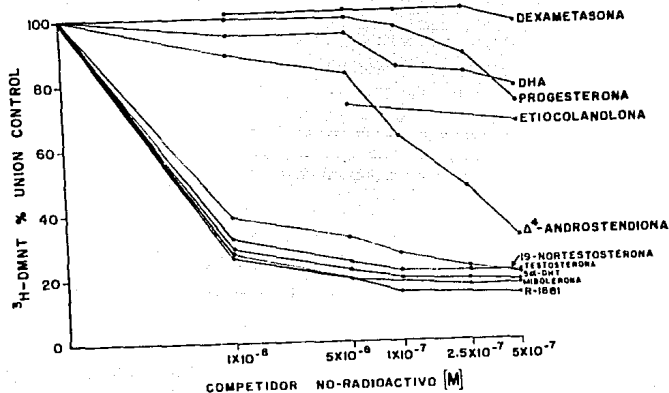


Fig. 12 Análisis de la Especificidad de unión de la DMNT  $^3\text{H}$  a los sitios de unión de andrógenos en la glándula de Harder de rata macho. Fracciones de citosol (0.1 ml), obtenidas de glándulas de ratas castradas fueron incubadas durante un período de 18 a 19 h a 4 °C, con DMNT- $^3\text{H}$  (1 nM) en presencia de concentraciones crecientes de esteroides sintéticos o naturales; Mibolerona (DMNT), Metiltrienolona (R 1881), 5 $\alpha$ -Dihidrotestosterona (5 $\alpha$ -DHT), Testosterona 19 Nor-Testosterona,  $\Delta^4$ -Androstendiona, Etiocolanolona, Progesterona, Dehidroepiandrosterona (DHA), Dexametasona. La fracción unida y libre fué separada por la adición de CCD por cinco minutos a 4 °C.

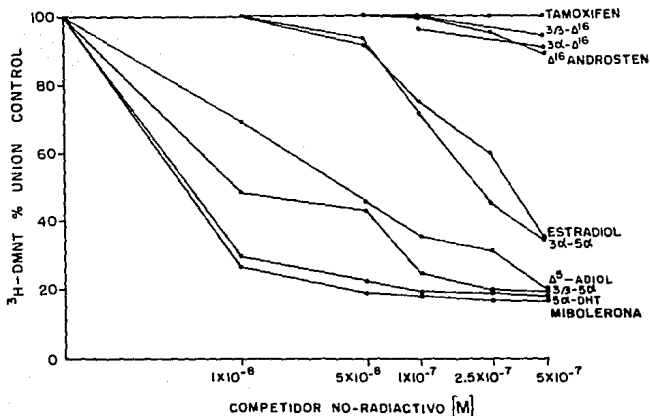


Fig. 13 Especificidad de unión de la DMNT-<sup>3</sup>H al receptor de andrógenos de la glándula de Harder en rata macho. Alícuotas de citosol (0.1 ml), de la glándula de Harder de rata fueron incubados con DMNT-<sup>3</sup>H (1 nM) por 18 h a 4 °C, en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de compuestos androgénicos; 3β-Δ<sup>16</sup>, 3α-Δ<sup>16</sup>-androsteno, 3α,5α-(3α-5α-Androstandiol), Δ<sup>5</sup>-Adiol (Androstandiol), 3β, 5α-Androstandiol, 5α-Dihidrotestosterona (5α-DHT), Mibolero na (Dimetilnortestosterona), 6 estrogénicos; Estradiol, tamoxifen (10-500 nM) no marcados. La unión total en ausencia de competidor fué considerada como el 100%. Cada punto representa el valor promedio de determinaciones por triplicado.

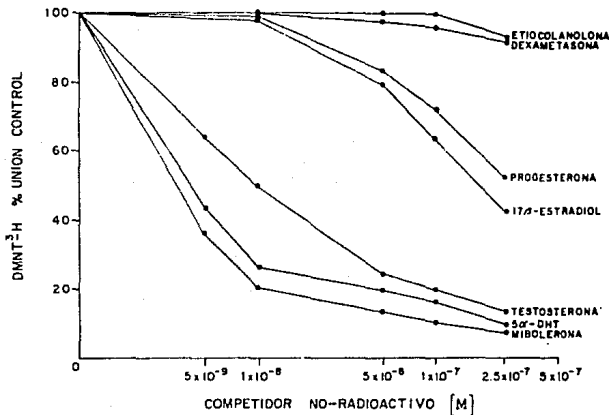


Fig. 14 Especificidad de unión de la DMNT-<sup>3</sup>H al receptor de andrógenos en la glándula de Harder de hámster. Muestras de citosol (0.1 ml) de las glándulas fueron incubadas con DMNT-<sup>3</sup>H (1.2 nmol/l) por 18 h a 4 °C, solo o con diferentes concentraciones de esteroides no-radioactivos, incluyendo DMNT, Etiocolanolona, Progesterona, Dexametasona 17β-Estradiol, Testosterona, 5α-Dihidrotestosterona (5α-DHT). La unión total en ausencia de competidor fue considerada como el 100%.

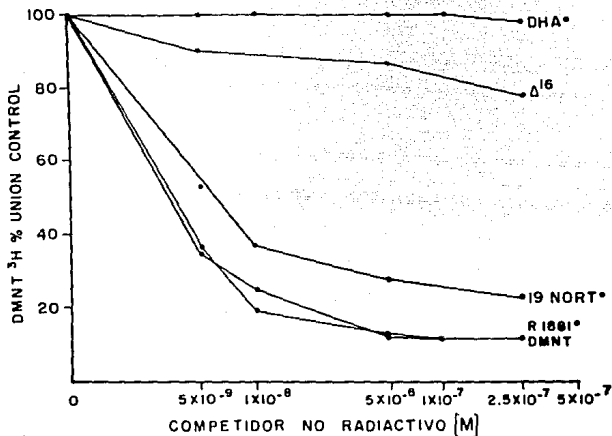


Fig. 15 Especificidad de unión de la DMNT-<sup>3</sup>H al receptor de andrógenos del citosol de células de la glándula de Harder de hámster macho castrado. Alícuotas de citosol (100  $\mu$ l), fueron incubados por 18 h a 4 °C con DMNT-<sup>3</sup>H (0.96 nM), con o sin concentraciones crecientes de esteroides naturales o sintéticos. Incluyendo DMNT, metiltrienolona (R 1881), 19-nortestosterona (19-Nor T),  $\Delta^{16}$ -androstenedona ( $\Delta^{16}$ ), De hidroepiandrosterona (DHA). La unión en ausencia de competidor se consideró como el 100%.

desplazar más del 50% de unión de la DMNT-<sup>3</sup>H a muy bajas concentraciones 10 nM, (figuras 12 y 13), sorprendentemente el metabolito reducido de la testosterona el 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -Androstandiol (desprovisto de actividad androgénica), es capaz de competir por los sitios de unión a concentraciones menores de 10 nM, mientras que su isómero 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -Androstandiol no muestra estas características. Otros esteroides C<sub>19</sub> como la Etiocolanolona y la Dehidroepiandrosterona no muestran efecto alguno sobre la unión de la DMNT-<sup>3</sup>H, mientras que la  $\Delta^4$ -Androstendiona o el Estradiol-17 $\beta$ , tiene un ligero efecto sobre la unión, pero solo a muy altas concentraciones ( $2.5 \times 10^{-7}$  M).

La adición de Progesterona, Dexametasona ó el estrógeno sintético Tamoxifen, así como el compuesto  $\Delta^{16}$ -Androstenona (feromona) y sus metabolitos reducidos 3 $\alpha$ ,3 $\beta$ - $\Delta^{16}$ , mostró ser inefectiva en inhibir la unión. Cuando estos resultados son comparados con los obtenidos en el citosol de la glándula de Harder del hámster el patrón de desplazamiento es similar; indicando la especificidad del receptor de andrógenos (Figs. 14 y 15). Al igual que en la rata, en el hámster únicamente la DMNT, 5 $\alpha$ -DHT, R 1881, testosterona y en menor grado la 19-Nortestosterona compiten efectivamente por los sitios de unión, en tanto la progesterona y el estradiol 17 $\beta$ , mostraron ser competidores débiles mientras que la Dehidroepiandrosterona, Etiocolanolona, Dexametasona y la  $\Delta^{16}$ -Androstenona carecen de efecto.

Se puede considerar que la unión de la DMNT-<sup>3</sup>H es altamente específica en estas especies, ya que patrones similares de desplazamiento son observados cuando compuestos androgénicos son usados como competidores, mientras que otros, con actividad estrogénica glucocorticoide, o pregestacional, son débiles competidores.

El patrón de sedimentación de los complejos hormona- $^3\text{H}$ -Receptor fué analizado en gradientes de densidad de sacarosa. Fracciones de citosol de la glándula de Harder de hámster castrados a diferentes tiempos o bien de ratas macho castradas por 24 ó 48 horas fueron incubadas con el radioligando a 4 °C, las fracciones unidas fueron colocadas sobre gradientes lineales de sacarosa del 20-35% P/V preparados en una solución amortiguadora Tris HCl, que contenía 10 mM de molibdato de sodio.

Cuando el citosol de la glándula de hámster fué incubado con una cantidad saturante de  $5\alpha$ -Dihidrotestosterona- $^3\text{H}$ ; se observó la formación de un complejo  $5\alpha$ -DHT- $^3\text{H}$ -receptor en la región 8S del gradiente (Fig. 16 panel 4). La adición de DMNT o bien de  $5\alpha$ -DHT no marcadas (100 X) impide la formación del complejo- $^3\text{H}$  (Fig. 16 paneles 5 y 6).

Resultados similares se obtuvieron cuando el citosol se incubó con el andrógeno sintético DMNT- $^3\text{H}$  (Fig. 16 paneles 2 y 3).

El receptor de andrógenos de la glándula de Harder de hámster macho (castrado 24 h antes), estabilizado con molibdato de sodio tiene un coeficiente de sedimentación 7-8 S cuando se utiliza DMNT ó  $5\alpha$ -DHT como radioligandos. Además, la castración de estos animales a diferentes tiempos no afecta la unión, ni las características de migración del receptor. Así, el coeficiente de sedimentación del complejo DMNT- $^3\text{H}$ -receptor es idéntico (8S) en las muestras de citosol obtenidas de animales castrados 3, 30 ó 60 días antes del experimento, mientras que el marcaje del receptor no muestra diferencias importantes (Fig. 17).

El receptor de andrógenos en la glándula de Harder de la rata macho, posee características de sedimentación similares a las de hámster, el complejo DMNT- $^3\text{H}$ -receptor migró en la región 7-8 S del gradiente de



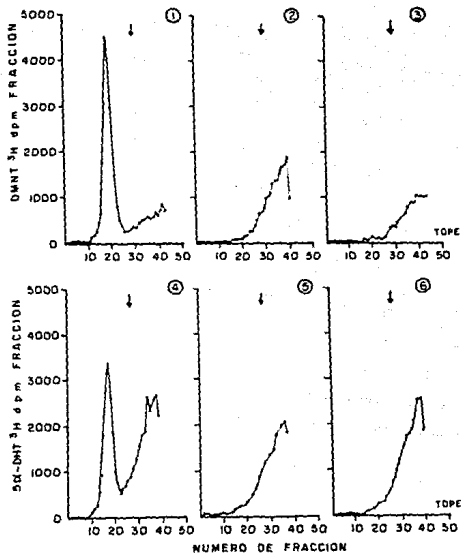


Fig. 16 Identificación del complejo hormona-receptor de andrógenos de glándula de Harder en gradientes de densidad de sacarosa. El receptor de andrógenos citosólicos de hámsters machos castrados fue marcado con 1 nmol/l de DMNT-<sup>3</sup>H o 5α-DHT-<sup>3</sup>H. Incubaciones paralelas de ambos radioligandos en presencia de un exceso de DMNT (2,6) o 5α-DHT (3, 5) se llevaron a cabo. Después de centrifugar a 371 000 x g por 2.5 h a 4 °C sobre un gradiente lineal en TEDM, 20-35% sacarosa, los perfiles de sedimentación fueron registrados por la cuantificación de radiactividad en cada fracción. ASB naftol azul 4.6 S (↓) se utilizó como marcador externo.

densidad de sacarosa (Fig. 18). Cuando el citosol es marcado con el andrógeno sintético- $^3\text{H}$  más un exceso de acetónido de triamcinolona o del isómero  $5\beta$ -reducido de la Dihidrotestosterona, las propiedades de sedimentación del complejo hormona-receptor no son modificadas, no obstante, la unión de la DMNT- $^3\text{H}$  parece mejorarse en presencia de triamcinolona. Por lo contrario la DMNT suprime completamente la formación del complejo DMNT- $^3\text{H}$ -Receptor así mismo, la  $5\alpha$ -DHT es capaz de inhibir casi completamente la unión de la dimetilttestosterona (Fig. 18). La forma predominante del receptor de andrógenos en el citosol de la glándula de Harder parece tener propiedades similares en el coeficiente de sedimentación (8S) y la especificidad del receptor en ambas especies estudiadas.

De los resultados de la especificidad del receptor de andrógenos en la glándula de Harder de la rata, se observó la actividad inhibitoria de la unión del andrógeno marcado al receptor, por compuestos, con propiedades estrogénicas como es el caso de  $3\beta$ -androstadiol y el  $17\beta$ -estradiol. Esta misma observación sin embargo, no se aplica a los ensayos que se realizaron con el citosol de la glándula de hámster macho. Este dato podría indicar la posible interferencia de un componente con afinidad para estrógenos al cual se uniera el andrógeno sintético. Para tal efecto, se estudió la unión a los componentes citosólicos de la glándula de la rata macho, empleando  $3\beta,5\alpha$ -androstadiol y tamoxifen aziridina isotópicamente marcados. No se observó marcaje de la fracción soluble de la glándula de Harder de la rata cuando se utilizó el metabolito de la testosterona ( $3\beta$ -Androstadiol), como radioligandos (Fig. 19); así mismo en ésta preparación el marcaje con un compuesto

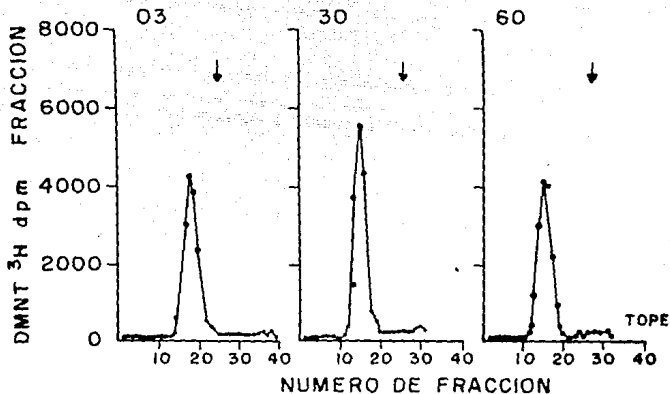


Fig. 17 Perfil de sedimentación del receptor de andrógenos en la glándula de Harder del hámster. Machos adultos fueron castrados 3, 30 ó 60 días previos al experimento. El citosol de cada grupo fué incubado con DMNT-<sup>3</sup>H por 18 h a 4 °C. Alicuotas de cada incubado fueron centrifugadas sobre gradientes de sacarosa 20-35% por 2.5 h a 371 000 x g; ASB (†).

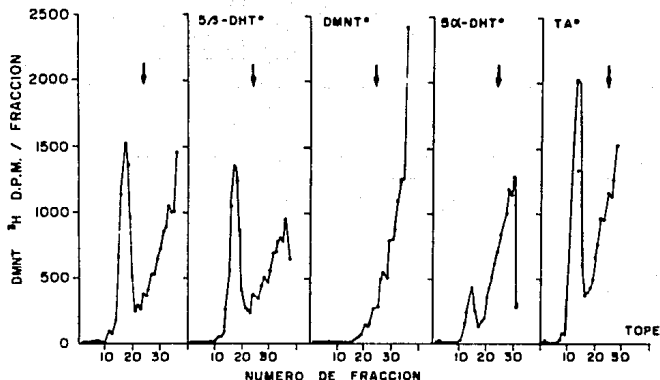


Fig. 18 Patrón de sedimentación del complejo hormona-<sup>3</sup>H receptor de la fracción soluble de la glándula de Harder de rata macho. Alícuotas de citosol (5.7 mg proteína/ml), fueron incubadas durante 22 h con DMNT-<sup>3</sup>H (2 nmol/l) a 4°C; con o sin un exceso (100 X) de esteroides no marcados; 5β-DHT, DMNT°, 5α-DHT° y acetónido de triamcinolona (TA°). El citosol incubado se depositó sobre un gradiente lineal de sacarosa (20-35%). Después de una centrifugación a 371 000 x g por 2.5 h los gradientes fueron fraccionados y se determinó el contenido de radiactividad en cada fracción.

altamente específico para el receptor de estrógenos como lo es el tamoxifen aziridina, resultó en la ausencia completa de unión específica y únicamente el citosol marcado con DMNT-<sup>3</sup>H utilizado como control, produjo la formación de un complejo en el gradiente de densidad de sacarosa.

Aunque no se puede descartar completamente la acción del estrógeno en la glándula de Harder de la rata, estos resultados, aunque preliminares excluyen la posible presencia de un componente de unión de estrógenos. De igual modo la ausencia total de un componente de unión citoplasmático para progestinas fué ampliamente comprobado en preparaciones de glándula de hámster macho mantenidas en condiciones óptimas para tal efecto. Como es bien sabido, existe una población de receptores putativos para progestinas, que son estrógenos regulados y que están presentes en tejidos blanco (McLusky y McEwen, 1982).

La administración crónica de estradiol a animales castrados resulta en un incremento importante del receptor citoplasmático para progestinas. Tomando ventaja de estas observaciones se estudió la presencia de estos receptores en la glándula de Harder de hámster macho tratado crónicamente con benzoato de estradiol o toxina colérica. El tratamiento por tres días con 5 ug de benzoato de estradiol (BE) ó 10 µg (I.P.) de toxina colérica demuestran una ausencia total de unión de la progestina sintética ORG 2058-<sup>3</sup>H al citosol de la glándula de los animales tratados (Fig. 20). La adición de un exceso de 100 veces de ORG 2058 (no marcado) a la mezcla de incubación muestra un perfil similar al encontrado en las incubaciones del citosol con el ORG 2058-<sup>3</sup>H, indicando que la poca unión encontrada es de origen no-específico (Fig. 20 panel A).

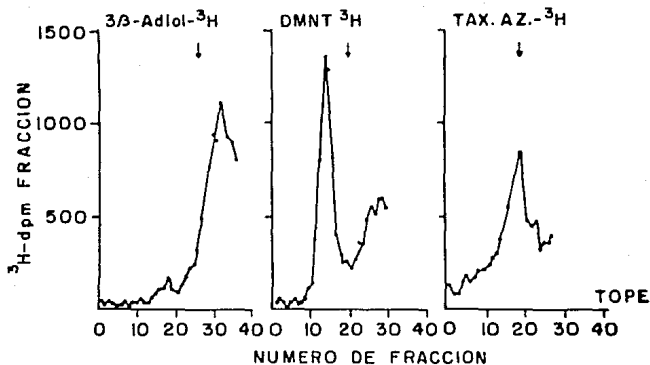


Fig. 19 Perfil de sedimentación de la fracción soluble de la glándula de Harder de rata, incubada con  $3\beta$ -Androstandiol- $^3\text{H}$  y tamoxifen aziridina- $^3\text{H}$  como radioligandos. Fracciones de citosol obtenidas de animales orquidectomizados se incubaron con 2 nmoles/l de cada radioligando a  $4^\circ\text{C}$ . La fracción unida específicamente fué centrifugada a través de gradientes de densidad (ver material y métodos). Albúmina sérica bovina (ASB) teñida con naftol azul (4.6 S), fué corrida en paralelo como control externo ( $\downarrow$ ).

Estos resultados muestran que en la glándula de Harder del hámster macho no hay poblaciones de receptores a progesterona (estrógeno y no estrógeno regulado).

En resúmen, la ausencia de componentes de unión para estrógenos o progestinas, sugieren que los efectos observados en la glándula de Harder son mediados por esteroides gonadales exclusivamente, a través de la interacción de el (los) andrógeno (s) con su receptor específico.

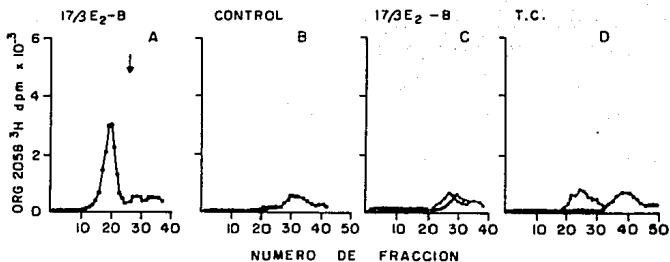


Fig. 20 Perfil de sedimentación sobre gradientes de densidad, de la unión de ORG 2058-<sup>3</sup>H en la fracción soluble de la glándula de Harder del hámster. Alicuotas de citosol provenientes de animales castrados y tratados con aceite (B), Benzoato de estradiol (C), o toxina colérica (D) fueron incubadas con ORG 2058-<sup>3</sup>H más la progestina no marcada (Panel C y D). Fracciones de citosol de hipófisis anterior del grupo de los animales tratados con Benzoato de estradiol, e incubados de igual manera con ORG 2058-<sup>3</sup>H fué utilizado como control (Panel A). Las mezclas de incubación se colocaron sobre gradientes lineales de sacarosa y fueron centrifugadas a 65 000 rpm por 2.5 h a 2-4 °C. (↓) Albúmina sérica bovína (4.6 S).



## DISCUSION

Las hormonas esteroides son compuestos de peso molecular relativamente bajo (alrededor de 300), biosintetizados en las glándulas endócrinas a partir de un precursor metabólico, el colesterol.

Dentro de este grupo de moléculas reguladoras se encuentran los corticoesteroides, secretados por la corteza suprarrenal, las hormonas sexuales femeninas (estrógenos y progestágenos), provenientes del ovario y las hormonas masculinas denominadas genericamente andrógenos, producidos por el testículo (Liao, 1976).

Una vez secretadas, estas sustancias son transportadas por medio de proteínas séricas específicas hacia los tejidos del organismo. Sin embargo, la retención del esteroide por los tejidos, esta determinada por la presencia de macromoléculas intracelulares de naturaleza proteica que muestran una alta especificidad para cada esteroide en particular (King y Mainwaring, 1974).

Así, los tejidos que poseen la capacidad de retener esteroides se les conoce con el nombre de órganos blanco, o bien, tejidos esteroide sensibles o esteroide dependientes.

La interacción entre el esteroide y las macromoléculas intracelulares específicas (denominadas receptores), representa el primer evento en el mecanismo de acción de las hormonas esteroides a nivel celular. La formación del complejo hormona receptor desencadena entonces una serie de procesos que regulan o modulan la actividad celular (O'Malley y Schrader, 1976).

Una vez que el complejo esteroide-receptor se ha formado sufre una se-

rie de cambios conformacionales (Transformación ó Activación del receptor) que resultan en un incremento de la afinidad del receptor por ciertos componentes o "Aceptores". La interacción del complejo activado esteroide-receptor con el aceptor nuclear, induce la iniciación de la transcripción de genes específicos y por lo tanto, la producción de ciertas proteínas se incrementa (Hiippaka y Liao, 1984).

Así, uno de los primeros efectos de los andrógenos sobre los órganos sexuales accesorios masculinos es el de aumentar la síntesis de ARN, incluyendo ARNm, y este efecto es observado en un tiempo muy corto después de la administración del andrógeno, por ejemplo Testosterona (Liao, 1976). Por el contrario los tejidos que no responden a la administración de la hormona, carecen invariablemente de receptores específicos. Receptores para glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógenos, andrógenos y progestinas han sido identificadas en tejidos, sobre los cuales se ha observado un efecto fisiológico de estos compuestos (O'Malley y Schrader, 1976).

Se acepta como criterio general para definir a un receptor (R) a aquella molécula o grupo de moléculas que interaccionan con una hormona (H) por medio de sitios de unión específicos para formar un complejo (H-R) el cual es mediador de los eventos celulares que resultan en la amplificación de la respuesta fisiológica de la hormona.

El efecto de las hormonas esteroideas se puede manifestar en los órganos blanco, en cambios a diferentes niveles; bioquímicos, metabólicos, fisiológicos y morfológicos. Algunas de éstas alteraciones han sido observadas, cuando por manipulaciones experimentales se ha tratado de elucidar la posible función de la glándula de Harder. En la glán

dula de Harder de ciertos roedores, se manifiestan después de la gonalectomía, modificaciones importantes de las características celulares, esto es peso de la glándula (Payne et al, 1977), dimensión celular (Clabough y Norvell, 1973; Bucana y Nadakavukaren, 1972), estructura celular (Hoffman, 1971; McMasters y Hoffman, 1984) y en la síntesis de productos de secreción (Ulrich et al, 1974; Reiter et al; 1983; Hoffman et al, 1985). Estos efectos son, sin embargo, revertidos o prevenidos por la administración de esteroides con propiedades androgénicas (Lin y Nadakavukaren, 1979; Sun y Nadakavukaren, 1980). La serie de observaciones antes mencionadas indican, que de alguna manera, en la glándula de Harder de este grupo (roedores) los esteroides gonadales juegan un papel predominante en la fisiología glandular.

Con el fin de evaluar si la sensibilidad de la glándula de Harder a los andrógenos es mediada a nivel celular, a través de interacciones del andrógeno con sitios de unión específicos, se llevaron a cabo una serie de experimentos para caracterizar el receptor intracelular de andrógenos en la glándula de Harder. Estos estudios se realizaron en dos especies de roedores, cuyas glándulas exhiben una diferente respuesta a la acción de los andrógenos. Las glándulas de Harder tanto de la rata, como del hámster macho fueron elegidos como modelo para el estudio del receptor dadas sus características, así, en el hámster, la glándula presenta un verdadero dimorfismo sexual mientras que la rata solo diferencias menores entre las glándulas de los dos sexos han sido descritas.

Una de las primeras evidencias acerca de la sensibilidad de la glándula de Harder a esteroides, fué mostrada por Brooksbank, utilizando una



si3n en las soluciones amortiguadoras utilizadas en los experimentos muestran que este compuesto estabiliza la interacci3n entre el ligando-<sup>3</sup>H y el receptor.

Uno de los primeros criterios para caracterizar el receptor de andr3genos en la gl3ndula de Harder, fu3 la medici3n de la uni3n del radio ligando DMNT-<sup>3</sup>H a su receptor en preparaciones crudas de citosol. Las figuras 6 y 7 muestran la interacci3n especifca del radioligando DMNT-<sup>3</sup>H con el componente de uni3n presente en la fracci3n soluble de la gl3ndula de la rata y el h3mster respectivamente. La uni3n m3xima fu3 alcanzada a las 12 h de incubaci3n, lo que indica la presencia de un componente de uni3n para andr3genos en ambas especies. Si se asume que la formaci3n de un complejo hormona-receptor es un evento obligatorio para desencadenar una respuesta biol3gica, el siguiente paso, fu3 el de demostrar que este componente de uni3n es saturable.

La exposici3n de la fracci3n soluble de las c3lulas de la gl3ndula de Harder a diferentes concentraciones de DMNT-<sup>3</sup>H o bien, del radioligando m3s un exceso de compuestos esteroides no marcados demostraron, que el componente de uni3n exhibe gran afinidad por la DMNT-<sup>3</sup>H, adem3s de ser un sistema de uni3n saturable (figuras 10 y 11). Por otra parte, los sitios de uni3n determinados por el m3todo de Scatchard, muestran ser de alta afinidad y baja capacidad (Scatchard, 1949). Las constantes de disociaci3n (Kd) aparentes ( $8.9 \times 10^{-10}$  M y  $3.0 \times 10^{-10}$  M), as3 como el n3mero de sitios de uni3n (66 fmoles y 113 fmoles), obtenidas, para la rata y el h3mster respectivamente, son similares a las ya reportadas para el receptor de andr3genos, de diferentes tejidos (Liao et al, 1973; Ginsburg y Shori, 1978; Amet et al, 1986)

Subsecuentemente, la especificidad de los sitios de unión de alta afinidad fué determinada por estudios de competencia, en donde los resultados muestran claramente que los compuestos (esteroides), con actividad androgénica intrínseca, se comportan como antagonistas de la unión de la DMNT-<sup>3</sup>H, ésto es, compiten efectivamente por los sitios de unión; mientras que, compuestos carentes de tal actividad, como es el caso de los glucocorticoides, progestinas o estrógenos, exhiben poca o casi nula interferencia con la unión del radioligando (Figuras 13-15). De ésta manera, el componente de unión de alta afinidad parece exhibir el mismo grado de especificidad en ambas especies estudiadas.

Los resultados de especificidad del componente de unión de la glándula de Harder del hámster apoyan fuertemente los hallazgos de Payne referentes a la habilidad que tienen diversos andrógenos para mantener el peso y el tipo celular de la glándula del hámster (Payne *et al.*, 1977). De este modo el mantenimiento de las células tipo II en el macho está determinado por la presencia de andrógenos circulantes posiblemente de origen testicular, mientras que la presencia de pigmentos dentro de la glándula es regulada probablemente por un efecto inhibitorio (ya sea la biosíntesis o sobre la actividad de ciertas enzimas involucradas en la formación de protoporfirinas) que ejercen los andrógenos a través de su interacción con este componente de unión.

La existencia de al menos dos formas del receptor de andrógenos en la fracción soluble de diversas células blanco, ha sido reportada por varios autores (Lea *et al.*, 1979; Grody *et al.*, 1982; Tai *et al.*, 1986). Ambas formas del receptor tienen la capacidad de unir específicamente andrógenos-<sup>3</sup>H y han sido agrupados en base a sus propiedades de sedi-

mentación sobre gradientes de densidad. Las formas menores del receptor presentan un coeficiente de sedimentación de entre 3.5 - 5.5 S y un peso molecular aproximado de 85 000 Daltones.

A esta forma del receptor se le ha denominado indistintamente como el receptor "activado", "transformado" ó "disociado" (Tindall et al, 1984; Tai et al, 1986).

La otra forma del receptor, la forma grande o "no transformada", por el contrario, tiene un peso molecular mayor a 100 000 Daltones y un coeficiente de sedimentación de 8-9 S ó, mayor; este receptor no transformado o receptor "nativo" es la forma predominante en la fracción citoplasmática de la célula, cuando el receptor no transformado es extraído en condiciones de baja fuerza iónica. Posterior a la unión del andrógeno-<sup>3</sup>H con el receptor "nativo", el complejo sufre cambios conformacionales (activación del receptor), incluyendo modificaciones en su coeficiente de sedimentación, que le confieren entonces la capacidad de interactuar con la cromatina (Hiippaka y Liao, 1984; Yamamoto, 1985).

El receptor de andrógenos que observamos en el citosol de la glándula de Harder tanto de la rata como del hámster, puede ser considerado dentro de esta última forma de receptor, es un receptor "nativo" (figuras 16-18).

La forma 8-9 S del complejo Andrógeno-<sup>3</sup>H-receptor de la glándula de Harder del hámster (en presencia de Molibdato) conservó inalterada su capacidad de unión, aún cuando en el marcaje del receptor se emplearon dos diferentes ligandos DMNT-<sup>3</sup>H (Fig. 16, panel 1) ó bien 5 $\alpha$ -DHT-<sup>3</sup>H (Fig. 16, panel 4). La alta especificidad del receptor "nativo" fué así mismo observada para ambos radioligandos cuando se incubaron

en presencia de DMNT ó 5 $\alpha$ -DHT no marcadas. La formación del complejo andrógeno-receptor en el citosol de la glándula de Harder del hámster, también fué registrada en animales castrados previamente (30 y 60 días) y se observó que las características de la glándula son predominantemente femeninas (Payne et al, 1977; Lin y Nadakavukaren, 1979). Aunque el método de sedimentación en gradientes de densidad no es un método cuantitativo, nos permite inferir que la concentración del receptor no es afectada por la castración (figura 7) al menos, en la glándula de Harder del hámster. Estos resultados nos permiten sugerir además, que la glándula de Harder de la hembra, debe poseer también este componente de unión, ya que la castración provoca la transformación de la glándula hacia el tipo hembra ocho semanas después de la operación (Clabough y Norvell, 1973; Hoffman et al, 1985).

Por otra parte, el receptor de andrógenos presente en la glándula de Harder de la rata, posee un coeficiente de sedimentación idéntico al del hámster (figura 18). Además, aunado a sus propiedades de unión y a su alta especificidad, los datos sugieren que se trata de un componente de unión similar, que comparte propiedades fisicoquímicas de un receptor y que éste se encuentra en ambas especies aunque presentan ligeras variaciones.

La observación de que el receptor de andrógenos en la glándula de la rata se encuentra en menor concentración que en la glándula de hámster (ver resultados) y corroborada en los estudios de formación del complejo en gradientes de densidad (Figs. 16 y 17). Este hecho apoya la idea de una menor dependencia de los andrógenos en la regulación de la glándula de Harder de la rata y otros vertebrados, (Ebling et al, 1975 a,



1975 b; Brownscheidle y Niewenhuis, Weaker, 1981; Johnson et al, 1983), con respecto a la glándula del hámster.

Aunque las características ultraestructurales de la glándula de Harder de las ratas macho, parecen no alterarse después de la castración ni después de la administración de testosterona, una reducción en el número de "paquetes" de retículo endoplásmico de las células tipo "B" fué observada en animales castrados (Brownscheidle y Niewenhuis, 1978). No se encontraron diferencias morfológicas importantes después de la administración de testosterona lo cual, puede ser explicado por la cantidad (50 µg/día) de andrógeno administrada, ya que puede considerarse una dosis relativamente insuficiente para mantener niveles fisiológicos constantes de testosterona. Por otro lado la dependencia de la glándula de Harder en la rata a los andrógenos gonadales, queda demostrada por el efecto que tienen éstos sobre el peso mismo de la glándula y sobre la producción de lípidos intraglandulares, de éste modo la administración de testosterona produce un incremento o mantiene el peso y la producción de sebo en animales castrados (Ebling et al, 1975 a y b), y aún en animales hipofisectomizados y castrados.

Estas observaciones apoyan fuertemente el concepto de que la regulación androgénica de la glándula es ejercida vía receptor de andrógenos en ambas especies.

Sin embargo, la participación de otras hormonas esteroides de origen suprarrenal y/o gonadal no puede ser descartada, particularmente, por el hecho de que tanto el estradiol como la progesterona pueden alterar en cierto grado la concentración de porfirinas intraglandulares en la rata (Ulrich et al, 1974) y en el hámster (Payne et al, 1978).

La síntesis del receptor de progesterona, a su vez depende de la acción del estradiol a nivel transcripcional (McLusky y McEwen, 1978, 1980), esto significa que el estrógeno modula la síntesis del receptor de progesterona en los tejidos blanco. Si se presupone que el efecto de la progesterona sobre las fluctuaciones de porfirinas es ejercido mediante este mecanismo, entonces algún componente de unión intracelular debe estar presente en la glándula de Harder. Los resultados sin embargo, muestran lo contrario (Fig. 20). La administración de benzoato de estradiol a hámsters castrados no indujo respuesta alguna en la glándula de Harder en términos de síntesis de receptor de progesterona además la ausencia de receptores residuales para progesterona (McLusky y McEwen 1978, 1979), en los animales no tratados (Fig. 20) con lo cual se puede concluir (con las reservas pertinentes), que en la glándula de Harder no se encuentran presentes receptores de progesterona específicos y que sus efectos observados en la glándula de Harder deben ser mediados por otro (s) mecanismo (s) diferente (s) al modo de acción clásico.

Esta sugerencia esta apoyada en los resultados donde la administración de toxina colérica a hámsters castrados, no indujo modificación alguna sobre la síntesis del receptor de progesterona, aún cuando un incremento significativo del mismo por toxina colérica ha sido reportado (Alleva et al, 1983). En contraste, el tejido de la hipófisis anterior, que sí responde al estímulo del estradiol exógeno con la formación de un complejo ORG 2058-<sup>3</sup>H receptor, se utilizó como control positivo de receptor de progesterona, (Fig. 20), en comparación al efecto de la toxina colérica y el benzoato de estradiol sobre la glándula de Harder.

A este respecto, los resultados de especificidad del receptor de andrógenos en la glándula de Harder, indican cierta interferencia por parte del estradiol (figuras 13, 14) y específicamente por el metabolito reducido de la testosterona, el  $3\beta,5\alpha$ -Androstandiol con la interacción de la DMNT- $^3\text{H}$ -receptor (figura 13). Si bien, se sabe que estos compuestos (estradiol y  $3\beta$ -androstandiol), prácticamente no interaccionan con el receptor de andrógenos; cierto grado de antagonismo ha sido observado (King y Mainwaring, 1974), y se cree que su acción es ejercida a través del mismo receptor (García y Rochefort, 1979; Thieulant *et al*, 1981; Vilchis *et al*, 1986).

Debido a la fuerte interacción que ejerce el  $3\beta$ -Androstandiol sobre la unión de la DMNT- $^3\text{H}$  en la glándula de la rata macho se decidió examinar el comportamiento de unión del  $3\beta$ -Androstandiol- $^3\text{H}$  en la fracción citoplasmática (figura 19) no encontrándose ninguna evidencia de interacción específica, ni aún, cuando se intentó el marcaje con el estrógeno no esteroidal Tamoxifén aziridina- $^3\text{H}$  (Fig. 19). Esto sugirió la inexistencia de un componente de unión para estrógenos o en sí, para el  $3\beta$ -Androstandiol- $^3\text{H}$  que pudiera estar involucrado en la modulación de los niveles de porfirinas en la glándula.

Finalmente los cambios observados en los niveles de porfirinas durante el ciclo estral del hámster (Payne *et al*, 1979) o bien, debidos a la administración simultánea de estrógenos más progesterona (Ulrich *et al*, 1974). Podrían explicar la interacción de esta última a nivel del epitelio glandular.

Para que ocurra una respuesta celular inducida por progesterona, la presencia de receptores específicos en la célula blanco es un evento determinante (O'Malley y Schrader, 1976).

Hasta ahora el único efecto conocido, que es inducido por la toxina colérica en la glándula, es el de incrementar de 6 - 20 veces la actividad mitogénica (Hoffman y Alleva, 1982) y a diferencia de lo que sucede en otros tejidos, esta toxina no es capaz de inducir la  síntesis de receptores en la glándula de Harder.

En consecuencia puede afirmarse que la glándula de Harder no es un tejido blanco a progesterona o a sus derivados, ya que se demostró la ausencia total de componentes de unión citoplasmático y por lo tanto su acción a nivel genómico queda de igual forma descartado.

Una posible forma de actuar del estrógeno y la progesterona a nivel glandular, estaría confinado a la modulación de la secreción de otras sustancias a nivel del eje hipotálamo-pineal-gónada, ejerciendo por lo tanto un efecto indirecto sobre la glándula de Harder.

La interacción existente entre la pineal y la gónada (testículo), en el control de la glándula de Harder ha sido reiteradamente sugerida (Wetterberg, 1972; Clabough y Norvell, 1973; MacMasters y Hoffman, 1984), sin embargo, recientemente la producción o síntesis  in situ de melatonina dentro de la glándula ha sido demostrada (Hoffman et al, 1985). Este hallazgo complica grandemente el entendimiento de los efectos de la melatonina sobre la glándula de Harder, particularmente por que los niveles de la misma (melatonina) parecen estar controlados por andrógenos (Hoffman  et al, 1985). Las concentraciones de melatonina producidas dentro de la glándula de la hembra estan elevadas de 3 a 4 veces con respecto a las del macho, mientras que la remoción gonadal a estos últimos, produce un incremento gradual de la melatonina, probablemente este fenómeno está mediado a través

de un efecto inhibitorio del andrógeno, vía su receptor, sobre la actividad de algunas enzimas involucradas en la síntesis de melatonina como la N-Acetil serotonina o bien, Hidroxiindol-0-Metil transferasa (Cardinali et al, 1972; Pang et al, 1977).

Indirectamente el andrógeno afecta entonces el contenido de porfirinas ya que la melatonina incrementa la concentración de estas (Reiter y Klein, 1971; Joó y Kahán, 1975), dentro del tejido.

Por lo tanto, los resultados apoyan el concepto de que los andrógenos tienen un papel regulador, que actuando vía-receptor intracelular, modulan su expresión genómica. Una serie de cambios metabólicos morfológicos y bioquímicos que se llevan a cabo en la glándula de Harder pueden ser parcialmente entendidos a través de esta interacción.

Quedan aún muchas interrogantes por ser contestadas que expliquen satisfactoriamente algunos aspectos de la fisiología de la glándula de Harder que nos permitan comprender su función. Los resultados del presente estudio representan una pequeña contribución para el entendimiento de la regulación de la glándula de Harder.

## CONCLUSIONES

De los estudios realizados in vitro con la fracción soluble de las células de la glándula de Harder de dos especies de roedores; Mesocricetus auratus y Rattus rattus, los resultados fueron interpretados de la siguiente manera:

- a) Se reporta por vez primera un componente de unión altamente específico para andrógenos presente en la fracción citoplasmática de la glándula de Harder en estas especies.
- b) Este componente intracelular exhibe parámetros de unión al equilibrio, similares a las del receptor de andrógenos.
- c) Las propiedades de sedimentación del componente citoplasmático de alta afinidad sugieren que se trata de la forma nativa del receptor de andrógenos.
- d) La ausencia de otros posibles receptores (progesterona y/o estrógenos) en la glándula apoyan el concepto de que la regulación hormonal de esta estructura es mediada principalmente por andrógenos a través de este receptor específico.

## Apéndice I.

### Determinación de Proteínas por la Técnica de Bradford.

El método de Bradford (Bradford, 1976), es un método colorimétrico utilizado para la cuantificación de proteínas en muestras biológicas. Este método se basa en la observación de que el colorante azul brillante de Coomassie (que existe en dos formas diferentes de color; roja y azul), en su forma roja, es convertida a la forma azul cuando se une el colorante con la proteína. El complejo colorante-proteína tiene un coeficiente de extinción alto, lo que permite una gran sensibilidad en la medición de las proteínas.

La unión del colorante a la proteína produce un cambio en la absorción máxima del colorante que va de 465 a 595 nm.

Este método tiene la ventaja de que cationes (sodio, potasio), y detergentes (Tritón X 100 y dodecil sulfato de sodio), no muestran interferencia en la reacción.

En esta técnica el colorante azul brillante de Coomassie G-250 es utilizado como reactivo y la albúmina sérica de bovino (BSA), se emplea como estándar de referencias.

En este método el ensayo se determina (lee) en un espectrofotómetro a 595 nm y la reacción permanece estable por lo menos 60 minutos.

BIBLIOGRAFIA

- Allen, E. Buhl, Reid, L. Norman and John, A. Resko. (1978). Sex differences in estrogen inducen gonadotropin release in hamsters. Biol. Reprod. 18:592-597.
  
- Amet, Y., Abalain, H.L. di Stefano, S., Daniel, J-Y., Tea, K., Floch, H. and Robel, P. (1986). Androgen regulation of the androgen receptor of the quail uropygial gland: application a [<sup>3</sup>H] mibolerone. J. Endocrinol. 109:299-306.
  
- Björkman, N., Nicander, L. and Schatz, B. (1960). On the histology and ultrastructure of the Harderian gland in rabbits. Z. Zellforsch. 52:93-104.
  
- Boas, F.N. and Bates, R.W. (1954). Role of the thyroid and anterior pituitary glands in the maintenance of the Harderian glands of the rat. Endocrinology. 55:601-612.
  
- Bradford, M/M (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Analyt. Biochem. 72:248-254.
  
- Brooksbank, B.W.L., Wilson, D.A.a. and Cloug, G. (1973). The in vivo uptake of [<sup>3</sup>H] androsta-4,16-dien-3-one in tissues of the adult male rat. J. Endocrinol. 57:
  
- Broenscheidle, C.M. and Niewenhuis, R.J. (1978). Ultrastructure of Harderian gland in male albino rats. Anat. Rec. 190:735-754.
  
- Bucana, C.D. and Nadakavukaren, M. (1972). Fine structure of the hamster Harderian gland. Z. Zellforsch. 129:178-187.



- Bucana, D., Nadakavukaren, M. (1972). Innervation of the hamsters Harderian gland. Science. 173:205-206.
- Burns, R.b. (1975). Plasma cells in the avian Harderian gland and the morphology of the gland in the rook. Can. J. Zool. 53:1258-1269.
- Butler, D.G., Wilson, J.X. and Youson, J.H. (1978). Transformation of corticosterone to 11-dehydrocorticosterone by nasal Harderian and lachrymal glands of the domestic duck (Anas platy rhynchos) in vitro. Gen. Comp. Endocrinol. 34:475-479.
- Cardinali, P.D., Larin, F. and Wurtman, R.J. (1972). Action spectra for effects of light on hidroxindole-O-methyl transferases in rat pineal retina and Harderian gland. Endocrinology 91:877-886.
- Claboug, H.W. and Norvell, J.E. (1973). Effects of castration, blinding, and the pineal gland on the Harderian glands of male golden hamster. Neuroendocrinology. 12:344-353.
- Christensen, F. and Dam, H. (1953). A sexual dimorphism of the Harderian glands in hamsters. Acta physiol. Scand. 23:333-336.
- Davidheiser, R., and Figge, F. (1958). Comparison of porphyrin producing enzyme activities in Harderian glands of mice and other rodents. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 97:775-777.
- Davidheiser, R., and Figge, F. (1955). Enzymatic porphyrin synthesis in Harderian glands and other organs and tissues of mice. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 90:461-462.
- DiIoria, D.P. and Nadakavukaren, M.J. (1984). Prevention by pinealectomy of short photoperiod induced ultrastructural changes in the hamster Harderian gland. Anat. Rec. 210:449-452.
- Ebling, F.J., Ebling, E., Randall, A. and Skinner, J. (1975). The effects of hypophysectomy and of bovine growth hormone on the responses to testosterone of prostate, preputial, Harderian and lacrymal glands and of brown adipose tissue in the rat. J. Endocrinol. 66:401-406.

- Ebling, F.J. Ebling, E., Randal, V. and Skinner, J. (1975). The synergistic action of  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone and testosterone on the sebaceous, prostate, preputial, Harderian and lacrimal glands, seminal vesicles and brown adipose tissue in the hypophysectomized rat. J. Endocrinol. 66:407-412.
- Feria-Velasco, A., Meléndez, C. and Jaramillo, J. (1984). Sex differences in secretion pattern of neonatal rat Harderian gland under various environmental lighting conditions. Comp. Biochem. Physiol. 74(B) 709-714.
- Figge, J.F. and Davidheiser, H.R. (1957). Porphyrin synthesis by mouse Harderian gland extracts; sex, age and strain variation. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96:437-439.
- García, M. and Rochefort, H. (1979). Evidence and characterization of the binding of two  $^3\text{H}$ -labeled androgens to the estrogen receptor. Endocrinology 104:1797-1804.
- Ginsburg, M. and Shori, D.K. (1978). Are there distinct Dehydrosteroid receptors in Brain?. J. Steroid Biochem. 9:437-441.
- Grody, W.W., Scharader, W.T. and O'Malley, B.W. (1982). Activation, transformation, and subunit structure of steroid hormone receptors. Endocrine Rev. 3: 141-163.
- Hancock, M.R., Gennings, J.R., Gower, D.B. (1985). On the existence of receptors to the pheromonal steroid 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-one, porcine nasal epithelium. FEBS Lett. 181.
- Hiipakka, A.R. and Shutsung, L. (1984). Modulation of androgen receptor activity in the rat ventral prostate. Ann. N. Y. Acad. Sci. 438: 54-59.
- Hoffman, R.A. (1971). Influence of some endocrine glands, hormones and blinding on the histology and porphyrins of the Harderian glands of golden hamsters. Am. J. Anat. 132:463-477.

- Hoffman, R.A. and Jones, J.W. (1980). Concentration of metals in the Harderian glands of male and female hamsters. Comp. Biochem. Physiol. 69(A): 153-156.
- Hoffman, R.A., Johnson, L.B., and Reiter, R.J. (1985). Harderian glands of golden hamsters; temporal and sexual differences in immunoreactive melatonin. J. Pineal. Res. 2:161-168.
- Huhtala, A., Huikuri, K.T., Palkama, A. and Tervo, T. (1977). Innervation of the rat Harderian gland by adrenergic and cholinergic nerve fibres. Anat. Rec. 188:263-272.
- Johnston, H.S. McGadey, J., Thomson, G.G., Moore, M.R. and Payne, A.P. (1983). The Harderian gland, its secretory duct and porphyrin content in the mongolian gerbil (Meriones unguiculatus). J. Anat. 137(3):613-630.
- Joó, I. and Kahán, A. (1975). The porphyrin content of Harderian glands in rats and the melatonin-melanocyte stimulating hormone system. Endokrinologie 65:308-312.
- Kanwar, K.C. (1960). Morphological and cytochemical studies on the Harderian glands of rats. La Cellule 61:121-143.
- Karnovsky, M.J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 27:137 A.
- Kennedy, G.Y. (1970). Harderoporphyrin: A new porphyrin from the Harderian glands of the rat. Comp. Biochem. Physiol. 36:21-36.
- King, R.J.B. and Mainwaring, W.I.P. (1974). Androgens and particularly, a metabolite of testosterone, 5  $\alpha$ -Dihydrotestosterone. En Steroid cell interactions. pp. 41-101. Butterworths. London.
- Kuhnel, W. (1971). Struktur und cytochemie der Harderchen Drüse von Kaninchen. Z. Zellforsch. 119:384-404.

- Lea, O., Wilson, E. and French, F. (1979). Characterization of differences forms of the androgen receptor. Endocrinology 105:1350-1360.
- Liao, S. (1976). Receptors and the mechanism of action of androgens. In: Receptors and mechanism of action of steroid hormones. Part. I. (editado por Pasqualini, J.R.) Marcel Dekker, INC. New York 159 pp.
- Liao, S., Liang, t., Fang, S., Castañeda, E. and Shao, T. (1973). Steroid structure and androgenic activity. J. Biol. Chem. 218 (17):6154-6162.
- Lin, W.L. and Nadakavukaren, M.J. (1979). The androgenic effect on the fine structure of the Harderian gland in the male hamster. Cell Tissue Res. 198:119-127.
- Lorincz, L.A. and Lancaster, G. (1957). Anterior pituitary preparation with tropic activity for sebaceous, preputial, and Harderian glands. Science 126:124-125.
- Martin, R.G. and Ames, B.N. (1961). A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: Application to protein mixtures. J. Biol. Chem. 236:1372-1379.
- MacLusky, N.J. and McEwen, B.S. (1980). Progesterin receptors in rat brain distribution and properties of cytoplasmic progesterin - binding sites. Endocrinology 106:192-202.
- MacLusky, N.J. and McEwen, B.S. (1978). Oestrogen modulates progesterin receptor concentration in some rat brain regions but not in others. Nature 279:276-278.
- McMasters, M.K. and Hoffman, A.R. (1985). Harderian gland: Regulation of sexual "Type" by gonads and pineal gland. Biol. Reprod. 31:579-585.

- Noma, K., Nakao, K., Sato, B., Nishizawa, Y., Matsumoto, K. and Yamamoto, Y. (1980). Effect of molybdate on activation and stabilization of steroid receptors. Endocrinology 107:1205-1211.
- Norvell, J., Clabough, J. (1972). Adrenergic and Cholinergic innervation of the hamster Harderian gland. Science 178:1102-1103.
- O'Malley, W. and Schrader, W.T. (1976). The receptor of steroid hormones. Sci. Am. 234:32-43.
- Pang, S.F., Brown, G.M., Grotta, J.L., Chambers, J.W. (1977). Determination of N-acetyl-serotonin and melatonin activities in the pineal gland, retina, Harderian gland, brain and serum of rats and chickens. Neuroendocrinology 23:1-13.
- Panke, E.S., Reiter, R.J. and Rollag, M.D. (1979). Effect of removal of the Harderian glands on pineal melatonin concentration in the syrian hamsters. Experientia 35:1405-1406.
- Paule, W.J., Hayes, E.R., Maths, B.H. (1955). The Harderian gland of syrian hamster. Anat. Rec. 121:349-350.
- Payne, A.P. (1977). Pheromonal effects of Harderian gland homogenates on aggressive behaviour in the hamster. J. Endocrinol. 73:191-192.
- Payne, A.P. and Bennet, N.K. (1976). Effects of androgens on sexual behaviour and social variables in the male golden hamster. J. Reprod. Fert. 47:239-244.
- Payne, A.P., McGadey, Moore, M.R., and Thomson, G. (1977). Androgenic control of the Harderian gland in the male golden hamster. J. Endocrinol. 75:73-82.
- Pevet, P., Heth, A. and Nevo, E. (1984). Photoperiod perception in the Harderian gland activity in the female golden hamster during the oestrous cycle, pregnancy and lactation. Biochem. J. 178:597-604.

- Reiter, J.R. and Klein, D.C. (1971). Observation on the pineal gland Harderian glands, the retina and the reproductive organs of adult female rats exposed to continuous light. J. Endocrinol. 51:117-125.
- Scatchard, G. (1949). An attraction of protein for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660-672.
- Shirama, K., Kikuyama, S., Takeo, Y. and Maekawa, K. (1982). Development of Harderian gland during metamorphosis in Anuras. Anat. Rec. 202: 371-378.
- Shirama, K. (1978). Induction of persistent estrus by constant light effects of neonatal and Harderian glands function. Neuroendocrinology 27: 193-203.
- Strum, J.M. and Shear, C.R. (1982). Constant light exposure induces damage and squamous metaplasia in Harderian glands of albino mice. Tissue Cell. 14(1):149-161.
- Strum, J.M. and Shear, C.R. (1982). Harderian glands in mice: fluorescence, peroxidase activity and fine structure. Tissue Cell. 14(1): 131-148.
- Sun, C.Y. and Nadakavukare, M.J. (1980). Effect of testosterone on the female hamster Harderian gland pigmentation and ultrastructure. Cell. Tissue Res. 217:511-517.
- Tai, P-K., Maeda, Y., Nakao, K., Wakim, N.G., Duhring, J.L. and Faber, L. E. (1986). A 59-kilodalton protein associated with progestin estrogen androgen, and glucocorticoid receptors. Biochemistry 25:5269-5275.
- Tindall, D.J., Chang, C.H., Lobl, T.J. and Rowley, D.R. (1984). Molecular cellular properties of the androgen receptor in rat ventral prostate. Ann. N.Y. Acad. Sci. 438:39-53.

- Thieulant, M.L., Samperez, S. and Jovan, P. (1981). Evidence for 5 - androstane-3 -diol binding to the estrogen receptor in cytosol from male rat pituitary. Endocrinology 108:1552-1560.
- Thomson, G.G., Hordovatz, M., Moore, R., McGadey, J. and Payne, A.P. (1984). Sex differences in haem biosynthesis and porphyrin content in the Harderian gland of the golden hamster. Int. J. Biochem. 16:849-852.
- Towin, J.E., Fanta, E.P. and Hodge, H.C. (1948). The porphyrin of Harder's gland. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 60:228-231.
- Turek, F.W., Desjardins, C., Menaker, M. (1975). Melatonin: antigonadal effects in male golden hamsters. Science 190:280-282.
- Ulrich, R., Yuwiler, A., Geller, E. and Wetterberg, L. (1974). Effects of sex hormones and environmental lighting on rat Harderian gland porphyrin. J. Endocrinol. 63:99-102.
- Venable, J.H. and Grafflin, A.L. (1940). Gross anatomy of the orbital glands in the albino rat. J. Mammal. 21:66-71.
- Weaker, F.J. (1981). Light microscopic and ultrastructural features of the Harderian gland of the nine-banded armadillo. J. Anat. 133(1):49-65.
- Wetterberg, L. (1972). Increase of Harderian gland porphyrin content in castrated male hamsters dependent on light and visual function. Life Sci. 11:541-546.
- Wetterberg, L., Geller, E. and Yuwiler, A. (1970). Harderian gland: An extraretinal photoreceptor influencing the pineal gland in neonatal rats. Science 167:884-885.
- Winterhager, E. and Huhnel, W. (1983). Membrane specializations of the cells of the Harderian gland of the rabbit with particular references to the mechanism of exocytosis. Cell Tissue Res. 231:623-636.

- Wooley, G.W. and Worley, J. (1954). Sexual dimorphism in the Harderian gland of the hamster. (Cricetum auratus). Anat. Rec. 118:416-417.
- Yamamoto, K.R. (1985). Steroid Receptor regulate transcription of specific genes and gene networks. Ann. Rev. Genet. 19:209-252.