



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCION DE 5α - DIHIDROTESTOSTERONA EN CELULAS HUMANAS NORMALES Y MUTANTES



DEPTO. DE PASANTES Y
EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

BERTHA ALICIA CHAVEZ CANO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA

Victoria E. Valles de Bourges:	Presidente.
Paulina Castro A.:	Vocal.
Graciela Meza Rufz:	Secretario.
Dolores Lastra Azpilicueta:	1er. Suplente.
Homero Hernández Montes:	2o. Suplente.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Departamento de Biología de la Reproducción
Instituto Nacional de la Nutrición

SUSTENTANTE:

Bertha A. Chávez C.
Bertha Alicia Chávez Cano.

ASESOR:

Victoria E. Valles de Bourges
Dra. Victoria E. Valles de Bourges.

Agradezco al Dr. Carlos Gual, Director del Instituto Nacional de la Nutrición, así como al Dr. Gregorio Pérez - Palacios, Jefe del Departamento de Biología de la Reproducción del mismo Instituto, las facilidades que me concedieron para la realización de este Trabajo.

Este estudio se realizó con fondos del Donativo para el Proyecto: Delineamiento de las Alteraciones de la Diferenciación Sexual en el Humano No. 1601, del Programa Nacional Indicativo de Salud, CONACYT.

Mi sincero agradecimiento al
Dr. Gregorio Pérez-Palacios
por su ayuda y colaboración
en la realización de este
Estudio.

A la Dra. Martha Medina, Inves-
tigadora de Tiempo Exclusivo en
el Depto. de Biología de la Re-
producción del Instituto Nacio-
nal de la Nutrición, con afecto
y agradecimiento por su direc-
ción y apoyo para la elaboración
de este Trabajo.

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

I N D I C E

	Página
Nombres Triviales y Sistemáticos de las enzimas y esteroides empleados en el trabajo	I
Abreviaturas empleadas en el trabajo	III
I. ANTECEDENTES	1
II. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	22
III. MATERIAL Y METODOS	24
Reactivos para cultivo celular	24
Reactivos	24
Compuestos marcados con isótopos radiactivos	25
Limpieza de material	25
Cultivo de Células	25
Congelación Celular	27
Estudio del Receptor Citoplasmático para DHT	27
Cultivo Celular	27
Obtención de Citosol	28
Separación del complejo 5 α -DHT-Receptor en gradiente de densidad por ultracentrifugación	29
Estudio de especificidad de unión del receptor para DHT.	30

Estudio de termolabilidad de la macromolécula receptora .	31
Transporte del complejo DHT- Receptor	31
Obtención de núcleos limpios .	32
IV. RESULTADOS	35
V. DISCUSION	48
CONCLUSIONES FINALES	54
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .	

NOMBRES TRIVIALES Y SISTEMATICOS DE LAS ENZIMAS
Y ESTEROIDES EMPLEADOS EN EL TRABAJO.

NOMBRE TRIVIAL	NOMBRE SISTEMATICO
ENZIMAS	
3 β -ol deshidrogenasa (3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa).	3 β -hidroxiesteroide: NAD(P) oxidoreductasa
17,20 desmolasa	17,20 esteroide liasa
20,22 desmolasa	20,22 esteroide liasa
5 α -esteroide reductasa (esteroide Δ^4 -5 α -des- hidrogenasa).	5 α -Esteroides:(aceptor) Δ^4 -oxidoreductasa.
17 α -hidroxilasa (esteroide 17 α -hidroxi- lasa).	Esteroides, NADP reduci do: oxígeno oxidoreduc tasa (17 α -hidroxila - ción).
20 α -hidroxilasa (esteroide 20 α -hidroxi- lasa).	Esteroides, NADP reduci do: oxidoreductasa.
22 hidroxilasa (esteroide 22 hidroxilasa)	Esteroides, NADP reduci do: oxígeno, oxidore- ductasa (22 hidroxila- ción).
Δ^4 - Δ^5 -Isomerasa (esteroide -isomerasa).	3-cetoesteroide Δ^4 - Δ^5 -isomerasa.

17 β reductasa
(17 β -hidroxiesteroide
deshidrogenasa).

17 β -hidroxiesteroide:
NAD(P) oxidoreductasa.

ESTEROIDES

3 α , 5 α -androstandiol

5 α -androstan-3 α , 17 -
diol.

Δ^5 -androstenediol

5-androsten-3 β , 17 β -diol

Δ^4 -androstendiona

4-androstan-3, 17-diona

Androsterona

3 α -hidroxi-5 α -andros-
tan-17-ona.

Colesterol

5-colesten-3 β -ol

Cortisol

11 β , 17 α -21 Trihidroxi
4 pregnen-3, 20-diona.

Dehidroepiandrosterona

3 β -hidroxi-5-androsten-
17-ona.

Dihidrotestosterona

17 β -hidroxi-5 α -andros-
tan-3-ona.

Etiocolanolona

3 α -hidroxi-5 β -andros-
tan-17-ona.

17 α -hidroxipregnenolona

3 β , 17 α -dihidroxi
5-pregnen-20-ona.

Pregnenolona	3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona.
Progesterona	4-pregnen-3,20-diona.
Testosterona	17 β -hidroxi-4-androsten-3-ona.

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TRABAJO

ADN	Acido desoxirribonucléico.
ARN	Acido Ribonucleico.
Ci	Curie
5 α -DHT	5 α -dihidrotestosterona.
dpm	Desintegraciones por minuto.
EDTA	Etilendiamin Tetracetato disódico.
FTC	Feminización Testicular completa.
FTIC	Feminización Testicular incompleta.
g	Gravedad.

HEF	Hormona estimulante del folículo.
HL	Hormona luteinizante..
Ka	Constante de asociación.
Kd	Constante de disociación.
LH-RH	Hormona liberadora de gonadotropinas.
MEM	Medio esencial mínimo.
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
S	Unidades Svedberg.
SFT	Síndrome de Feminización Testicular.
SHBG	Proteína transportadora de hormonas sexuales.
Tfm	Feminización Testicular en ratones.

I. ANTECEDENTES

Los estudios pioneros de Paul Ehrlich (1) a principios del siglo, permitieron formular por primera vez el concepto de receptor, al cual se demostró con el término de ligador. Este concepto es válido hasta la actualidad en lo que se refiere a la afinidad que ciertos tejidos tienen por sus ligandos, afinidad que está determinada por la presencia de receptores en las células blanco, dando lugar a la formación de complejos hormona-receptor, o de complejos ligando-ligador, como lo llamó Ehrlich.

Actualmente se define como receptor, a una macromolécula membranal o intracelular de naturaleza protéica, que se une específicamente y con alta afinidad a una proteína, un esteroide o una droga. La formación de este complejo Proteína-Receptor, Esteroide-Receptor o Droga-Receptor dá lugar a una serie de eventos intracelulares que resultan en una acción o efecto específico.

Aun cuando hasta el momento actual no se ha caracterizado la estructura íntima de los receptores para hormonas esteroides, como sería el conocimiento de la naturaleza de los aminoácidos y su secuencia, se acepta que estas macromoléculas para funcionar como receptores, requieren poseer las características de una proteína globu

lar con su más alto nivel de complejidad estructural. La estructura cuaternaria, les permite disociarse en sub-unidades de menor tamaño facilitando su función; la integridad de su estructura terciaria, les permite el acoplamiento a su ligando, y la secuencia determinada de amino ácidos les confiere especificidad en la interacción con su ligando (1).

Los objetivos fundamentales en el estudio de receptores se han orientado por una parte, al esclarecimiento de los mecanismos íntimos que intervienen en la interacción de las dos moléculas reactantes, y por otra al estudio de la función biológica que el complejo Receptor - Ligando tiene.

En la interacción de la macromolécula receptora con su ligando, juegan un papel relevante las características estructurales de la proteína receptora, así como la disposición y número de sitios activos que posee, y por otra parte las características del ligando son también fundamentales; por ejemplo cuando el ligando es un compuesto esteroide, el tipo de grupos reactantes y su arreglo espacial, es lo que confiere especificidad a la unión, y lo que determina el tipo de unión no covalente que se establecerá. La molécula esteroideal puede unirse en forma inespecífica a

otro tipo de moléculas tales como aminoácidos, ácidos nucleicos, lípidos, purinas u otro tipo de proteínas que no tienen función de receptor, obedeciendo simplemente a las reglas de polaridad, estableciéndose uniones de tipo hidrofóbico que son las que operan en el tipo de unión no específico.

Los esteroides (2) son compuestos orgánicos que contienen el núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno, e incluyen gran cantidad de compuestos entre los que se encuentran los ácidos biliares, las hormonas corticoadrenales y gonadales entre otros.

Entre las hormonas esteroides gonadales se encuentran los compuestos derivados del núcleo del androstano, que poseen 19 átomos de carbono en su molécula (Fig 1) formando cuatro anillos: A, B, C y D, y dos metilos angulares, los cuales se encuentran por encima del plano de la molécula (posición β).

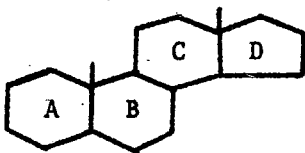


FIGURA No. 1

Los compuestos derivados del androstano tienen en mayor o menor grado actividad androgénica (actividad anabólica y/o virilizante), por lo que se les designa genéricamente con el nombre de andrógenos. La testosterona presenta en su estructura química un doble enlace entre los carbonos 4 y 5, en el carbono 3 tiene un grupo cetónico, y en el carbono 17 un grupo alcohólico en posición β (Fig 2).

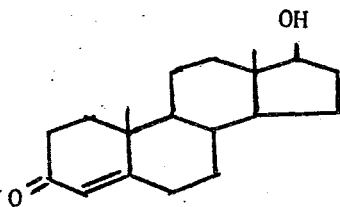


FIGURA No. 2

La testosterona es una hormona androgénica producida por las células intersticiales de Leydig (3,4), que están distribuidas en el estroma entre los túbulos seminíferos (5), y tienen la capacidad de biosintetizar la hormona a partir de acetato (6,7).

La síntesis de testosterona en los testículos se

inicia a partir de acetato, el cual unido a la Coenzima A (6,7) forma la acetil Coenzima A, la que a través de una serie de reacciones bien conocidas, conduce a la formación de ácido mevalónico que es un intermediario en la biosíntesis de colesterol. El ácido mevalónico forma un pirofosfato, constituyendo una unidad isoprenoide, que al reaccionar con otras unidades isoprenoides forma el escualeno de 30 átomos de carbono. Este compuesto se cicliza formando lanosterol, que al perder tres metilos y modificarse en algunos puntos de insaturación, dá lugar a la formación de colesterol.

A partir de colesterol (27 átomos de carbono) se forman los esteroides androgénicos como se muestra en la Fig 3. La conversión de colesterol a pregnenolona, se lleva a cabo a nivel mitocondrial mediante la hidroxilación de los carbonos 20 y 22. Subsecuentemente, la enzima 20,22 desmolasa rompe la cadena lateral del colesterol dihidroxilado, y dá como resultado una molécula de 21 átomos de carbono que contiene el núcleo del pregnano, que es la pregnenolona y que no posee actividad hormonal.

Por acción de 2 enzimas, la 3β - α deshidrogenasa y la Δ^4 , Δ^5 -isomerasa la estructura Δ^5 - 3β -Hidroxi de

la pregnenolona se convierte en una estructura Δ^4 -3-ceto. El compuesto resultante es la progesterona que posee gran actividad hormonal (Fig 3).

Posteriormente la progesterona se hidroxila en posición 17α , formándose la 17α -hidroxiprogesterona; esta molécula sufre una ruptura entre los carbonos 17 y 20 por acción de la 17,20 desmolasa, formándose un compuesto de 19 átomos de carbono que es la androstendiona, que al reducirse en posición 17β se convierte en testosterona. Además de la ruta biosintética descrita (Δ^4), existen vías alternas como la llamada ruta de los Δ^5 (Fig 3).

La función endócrina de los testículos está regulada por las gonadotropinas, que son hormonas de naturaleza protéica producidas en la adenohipófisis. La hormona estimulante del folículo (HEF), estimula la gametogénesis tanto en gónadas femeninas como masculinas, y la hormona luteinizante (HL) estimula la esteroidogénesis en las células de Leydig. A su vez la producción tanto de HEF como de HL, están reguladas por la hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas (LH-RH) (8,9).

La testosterona circula por el plasma unida a una proteína transportadora, que es un β -globulina que se

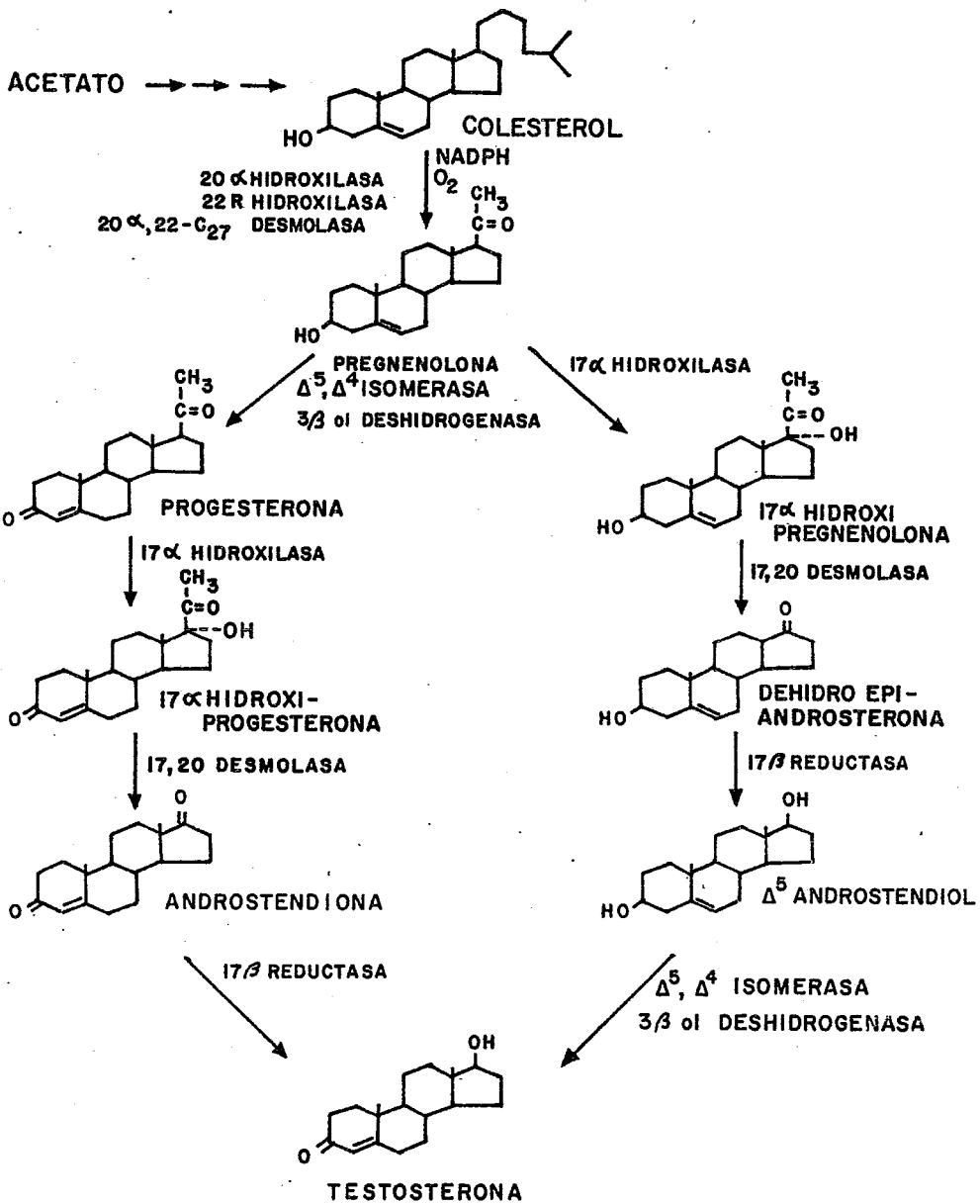


FIGURA No. 3

conoce con el nombre de proteína transportadora de hormonas sexuales (SHBG), la unión de la testosterona a esta globulina, comparte las mismas características de unión que se mencionan posteriormente en el caso de receptores. El peso molecular de la SHBG es de 52,000 a 110,000 daltones, su K_a a 4 °C es de $1.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ (10), y su coeficiente de sedimentación en ultracentrifugación es 4S. Al ser transportada en la sangre, la testosterona llega a los diferentes tejidos en donde va a ejercer su acción, a los cuales se les denomina órgano blanco. Cuando la testosterona llega a dichos tejidos, se desliga de la proteína transportadora, y en su forma libre penetra al interior de la célula, a través de la membrana por un mecanismo de difusión pasiva.

Los efectos de la testosterona dependen tanto de su acción "per se" como de algunos de sus metabolitos, de los cuales el compuesto 5α -reducido conocido como 5α -dihidrotestosterona (5α -DHT) es el más importante. En la formación de este metabolito, el doble enlace del anillo A de la testosterona, se reduce por acción de una enzima dependiente de NADPH que es la 5α -esteroide reductasa. Esta enzima de localización nuclear y citoplasmática, se encuentra en prácticamente todos los tejidos andrógeno-dependientes, y es diferente de la 5α -esteroi

de reductasa hepática de localización microsomal. Otro metabolito intracelular de la testosterona, y que posee gran efecto androgénico es el $3\alpha,5\alpha$ -androstandiol, - mientras que la Δ^4 -androstandiona, la androsterona, y la eticolanolona, entre otros, tienen menor efecto androgénico.

El tipo de unión que se lleva a cabo entre el receptor y el esteroide, debe reunir las siguientes características (1):

a) ESPECIFICIDAD.

Esto significa que la molécula protéica receptora es altamente discriminativa, y se unirá sólo a otra molécula con características químicas bien definidas.

b) CAPACIDAD.

Que se refiere a una característica cuantitativa del receptor, limitada por el número de sitios activos, los cuales son susceptibles de ser saturados. La baja capacidad de unión de un receptor con su ligando específico, es una característica que ha sido utilizada para estudios diferenciales

de unión específica e inespecífica, mediante el empleo del esteroide isotópicamente marcado y no marcado. El esteroide marcado unido específicamente a los sitios activos del receptor, es susceptible de ser desplazado de sus sitios de unión por la adición de cantidades crecientes de esteroide no radiactivo, debido a la baja capacidad que le confiere el número limitado de sitios activos de unión. Por el contrario, el esteroide isotópicamente marcado unido inespecíficamente, no se desplaza con la adición aun de grandes excesos de esteroide no radiactivo, puesto que las posibilidades que existen de unión inespecífica son ilimitadas y por lo tanto no susceptibles de ser desplazadas (Fig 4).

c) AFINIDAD.

La afinidad de unión entre el Receptor y la Hormona, está determinada por las constantes de asociación (K_a) y de disociación (K_d) de la unión, que es de tipo no covalente, reversible y disociable, estas constantes se obtienen del desarrollo de la ecuación:

COMPETENCIA DE UNION DE UNA HORMONA MARCADA
RADIATIVAMENTE CON UNA NO MARCADA

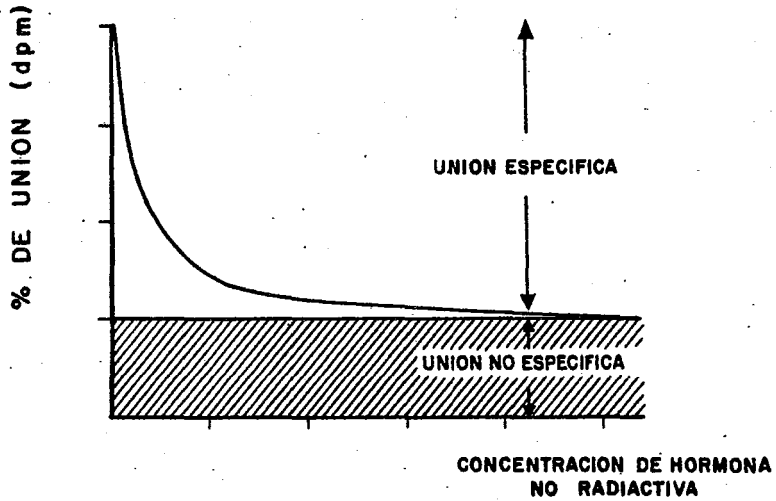
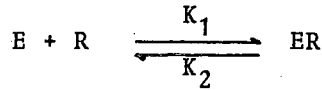


FIGURA No. 4



donde:

- E - esteroide
- R - receptor
- ER - complejo hormona-receptor
- K_1 - constante de velocidad con que se forma el complejo ER
- K_2 - constante de velocidad con que se disocia el complejo ER.

De acuerdo a la Ley de Acción de Masas: La velocidad de reacción química, es proporcional al producto algebraico de los reactivos, cada uno de ellos elevado a la potencia de su coeficiente en una ecuación balanceada.

Así:

$$\begin{aligned} V_1 &= (K_1) (E) (R) \\ V_2 &= (K_2) (ER) \end{aligned}$$

donde V = Velocidad.

En el equilibrio, la velocidad en ambas direcciones es igual, por lo que:

$$(K_1) (E) (R) = (K_2) (ER),$$

dividiendo la ecuación entre:

$$K_2 \quad y \quad (E) \quad (R),$$

tenemos:

$$\frac{K_1}{K_2} = \frac{(ER)}{(E)(R)} ;$$

de donde el valor:

$$K_1 / K_2$$

dá la constante de asociación en el equilibrio:

$$K_a = \frac{K_1}{K_2},$$

y el recíproco de K_a , dará la constante de disociación en el equilibrio:

$$K_d = \frac{K_2}{K_1} = \frac{1}{K_a} .$$

Los estudios metabólicos de Loeb y Wilson (11), - permitieron un mayor avance en el conocimiento de la interac-

ción de las hormonas androgénicas con su receptor, a nivel de tejidos accesorios masculinos. Estos autores demostraron, que después de la administración de testosterona tritiada a ratas castradas, el esteroide se unía a receptores en próstata y vesículas seminales.

Por otra parte, los estudios pioneros de Liao (12), Baulieu (13), y Mainwaring (14); mediante la utilización de gradientes de sacarosa de baja fuerza iónica, permitieron la caracterización parcial de este receptor de citosol para testosterona y dihidrotestosterona.

El coeficiente de sedimentación del receptor en ultracentrifugación, dependiendo del procedimiento utilizado para su estudio ha sido informado entre 8 y 9.5S. Experimentalmente, en presencia de altas concentraciones iónicas logradas mediante la adición de sales, la macromolécula receptora se disocia en subunidades de menor tamaño con coeficientes de sedimentación entre 4 y 5S, de acuerdo a Baulieu (13), y de 3.5S de acuerdo a los hallazgos de Liao (12).

Otras características fisicoquímicas del receptor en su forma no disociada que han sido establecidas por varios investigadores, incluyen la determinación del pe-

so molecular, que es alrededor de 276,000 daltones, su constante de disociación que oscila de 2.4 a 4.0×10^{-9} M, y punto isoeléctrico a un pH de 5.8 (15).

En forma similar a lo descrito para estrógenos (16) y progesterona (17), el complejo testosterona-receptor del citosol es transportado al núcleo mediante un proceso activo. La actividad de este proceso de transporte fue demostrado por Liao (18), quien informó que los núcleos obtenidos de próstata de ratas castradas no contenían receptores capaces de unir andrógenos, y, que la exposición de estos núcleos a dihidrotestosterona libre, no resultó en la formación del complejo Dihidrotestosterona-Receptor nuclear, lo que demostró que el fenómeno de transporte citosol-núcleo del complejo hormona-receptor es activo, y requiere su formación en el citosol. Las condiciones óptimas de temperatura para que se realice este fenómeno de transporte, han sido establecidas entre 25 y 37 °C.

Aunque la naturaleza exacta del componente nuclear que une al complejo receptor-andrógeno no ha sido completamente aclarada, numerosas observaciones experimentales han dado información acerca de él o los posibles sitios aceptorés en el núcleo. En el momento ac-

tual, aun cuando existen diversas teorías, es aceptado por la mayor parte de los autores, que el aceptor nuclear del complejo hormona-receptor es una proteína no histona, la cual está íntimamente ligada al ácido desoxiribonucleico (ADN) (12,19).

Los mecanismos íntimos que participan en la regulación de la unión entre proteínas no histonas, ADN y complejo hormona-receptor, no han sido aun bien dilucidados. Sin embargo, se acepta que como resultado de esta unión, se produce un incremento significativo en la actividad de las ARN polimerasas I y II con el consecuente incremento en la síntesis de ARN, como ha sido demostrado por Williams-Ashman y confirmado posteriormente por Liao (20).

Los eventos anteriormente descritos que incluyen la 5 α -reducción de la testosterona, la unión de estas hormonas a su receptor específico y su transporte al interior del núcleo, la síntesis de ARN y que culminan con la síntesis protéica a nivel ribosomal, ocurren en forma secuencial en las células andrógeno-dependientes.

Cuando existe una falla en el mecanismo de acción normal de la testosterona en cualquiera de los eventos

intracelulares anteriormente mencionados, se presentan diversas formas de resistencia a la acción de andrógenos, como es el caso del Tfm o síndrome de resistencia a andrógenos, descrita por Lyon y Hawkes (21) en ratones, o el Síndrome de Feminización Testicular en el Humano, y que inicialmente se le consideró asociado a un defecto enzimático en la conversión de testosterona a 5α -DHT. Sin embargo, estudios posteriores de Bardin, Pérez-Palacios y Wilson (22-24), demostraron conversión metabólica normal de testosterona a su metabolito 5α -reducido, postulando que el defecto residía en una falla de la unión de estas hormonas a su receptor específico.

Bardin demostró que el citosol de ratas con este defecto, no poseían la proteína receptora encontrada regularmente en animales normales. Observaciones posteriores, demostraron que la administración de testosterona y/o 5α -DHT a ratas con este defecto de receptor, no producía ningún efecto androgénico como era de esperarse, demostrándose así la falla en el mecanismo de acción hormonal en estos animales.

En el humano existen diversas formas de Pseudohermafroditismo masculino por insensibilidad a la acción de andrógenos, que se manifiestan clínicamente por una

falla en la acción virilizante de dichas hormonas. Esta condición clínica se presenta en individuos genotípicamente masculinos, esto es, con complemento cromosómico 46 XY, pero con fenotipo total o parcialmente femenino, dependiendo de la extensión del defecto. Cuando el defecto o falla, es universal se presenta la entidad conocida como Feminización Testicular completa; en estos individuos el fenotipo es completamente femenino debido a una ausencia absoluta de virilización. El primer reporte en la literatura de este trastorno hereditario, fue hecho en 1817 por Steglehner (25) quien al realizar una autopsia de una mujer de 23 años de edad, sorprendentemente encontró testículos inguinales bilaterales y ausencia de útero, desde entonces se han informado un gran número de casos, y en 1953 Morris (26) después de una exhaustiva revisión de 98 casos, propuso el término de Feminización Testicular para este síndrome, que en la actualidad constituye una entidad clínica bien definida, que se presenta en individuos con complemento cromosómico 46 XY, testículos bilaterales, ausencia de útero y trompas de falopio, genitales externos femeninos, y una vagina terminada en fondo de saco ciego.

Los pacientes con Feminización Testicular son psicológicamente orientados como mujeres, y habitualmente

acuden a consulta al llegar a la pubertad debido a amenorrea primaria o a la presencia de masas uni o bilaterales que se presentan en forma de hernias inguinales, y que corresponden a los testículos. Al inicio de la pubertad los pacientes presentan desarrollo mamario espontáneo de características normales. La ausencia de pelo púbico y axilar es característica de la variedad completa de este síndrome, la laparotomía exploradora, revela además de los testículos intra-abdominales, ausencia de derivados Mullerianos.

Existe una forma incompleta del Síndrome de Feminización Testicular, que clínicamente se distingue de la variedad completa por presentar al llegar la pubertad, aparición de pelo púbico y axilar, y frecuentemente hipertrofia discreta de clítoris. El desarrollo mamario en estos pacientes con la variedad incompleta del síndrome, suele ser menos aparente.

Los testículos como se mencionó anteriormente, en el 50% de los casos se encuentran localizados en las regiones inguinales. Sus características histológicas, incluyen túbulos seminíferos que presentan detención en la espermatogénesis a nivel de espermatogonia, con células de Sertoli de características normales, e hiperplasia de células de Leydig.

Los niveles de testosterona plasmática se encuentran moderadamente elevados, o en los límites superiores normales en relación a los niveles de un hombre adulto normal; lo que está en relación a la hiperplasia de las células de Leydig del testículo.

La refractariedad a la acción de testosterona, en estos pacientes ha sido demostrada también a otros niveles de la economía, como sucede en la Unidad Hipotálamo-Hipofisiaria informada por Tremblay y Col. (27) y Judd y Col. (28), de tal forma que no obstante de que estos pacientes tienen niveles normales o incluso elevados de testosterona circulante, los niveles de hormona luteinizante se encuentran también elevados, debido a una falla en la acción de retroalimentación negativa de la testosterona sobre HL a nivel central.

Por otra parte, la administración exógena de testosterona a dosis farmacológicas y por tiempo prolongado, no logra abatir los niveles de HL ni induce virilización.

Para determinar el nivel de la falla intracelular en el mecanismo de acción de la testosterona a nivel de los órganos andrógeno-dependientes; el fibroblasto humano obtenido a partir de biopsias de piel de área genital, constituye un buen modelo, ya que esta célula tiene la pe

culiaridad de ser andrógono sensible, y de conservar hasta su muerte las características genotípicas del individuo del cual proviene.

En los últimos años el desarrollo de las diversas áreas de la biomedicina, ha conducido a un perfeccionamiento de las técnicas de laboratorio de cultivo de células, que permiten el estudio de la biología a nivel molecular. El cultivo celular ha sido utilizado en estudios de índole genética, morfológica, en virología, investigación de fármacos, en el estudio de enfermedades metabólicas e investigación de cáncer entre otros; y particularmente en el área de Biología de la Reproducción, sería de gran utilidad para el estudio del mecanismo intracelular de acción hormonal.

II. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

El objetivo de este estudio lo constituyó la ubicación de la o las fallas moleculares a nivel celular, que resultan en el humano en alteraciones de la diferenciación sexual, con particular referencia a los síndromes de insensibilidad a la acción de hormonas esteroides con actividad androgénica.

La hipótesis plantea que mutaciones génicas en el cromosoma X pueden traducirse en alteraciones en la síntesis de receptores intracelulares para andrógenos, en la síntesis de moléculas estructurales alteradas, o bién en alteraciones a nivel nuclear o a nivel ribosomal en la síntesis protéica.

El estudio se realizó en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición. Las células utilizadas, se obtuvieron a partir de biopsias de piel de área genital de individuos normales, y de pacientes con síndromes de insensibilidad a Andrógenos que acuden a la Unidad Metabólica de Diferenciación Sexual, y fueron mantenidas en cultivo o en congelación.

Previo al estudio experimental se establecieron las condiciones óptimas de laboratorio para el mantenimiento -

de las células en cultivo, y se estandarizaron los procedimientos para el estudio del transporte intracelular de andrógenos en células normales.

III. MATERIAL Y METODOS

MATERIAL:

1. Reactivos para cultivo celular.

Medio esencial mínimo de Eagle (MEM-Eagle) con sales de Earle, con glutamina y aminoácidos no esenciales sin bicarbonato de sodio; penicilina-estreptomina liofilizadas, con 10,000 U/ml de penicilina base, y 10,000 μ g/ml de estreptomina; solución de tripsina EDTA (IX), 0.5 g de tripsina (1:250) y 0.2 g de EDTA por litro de solución balanceada de Hank, sin calcio y magnesio; solución de aminoácidos no esenciales (100 X); suero fetal de ternera; solución balanceada de fosfatos de Dulbeco (PBS), sin calcio, sin magnesio y sin bicarbonato de sodio. Todos los reactivos se obtuvieron de Grand Island Biological, Co.

2. Reactivos.

Todos los reactivos usados fueron de alto grado de pureza. El agua usada a través de todos los métodos fue bidestilada y desionizada.

3. Compuestos marcados con isótopos radiactivos.

(1,2,4,5,6,7-³H) Dihidrotestosterona con actividad específica de 123 Ci/mmola; ovoalbumina marcada con ¹⁴C, con actividad específica de 9.94 uCi/mg se obtuvieron de New England Nuclear, Co.

4. Limpieza de material.

Todo el material utilizado en cultivo celular se lavó en forma especial para este fin, y su esterilización se llevó a cabo en autoclave.

MÉTODOS:

Cultivo de células.

Las líneas celulares usadas en estos experimentos se establecieron a partir de biopsias de piel genital de individuos normales de ambos sexos y de pacientes con diferentes formas de pseudohermafroditismo masculino. Las biopsias se obtuvieron con una pinza de sacabocado estéril y desechables bajo anestesia local usando xilocaína al 1%, o bien durante el transoperatorio cuando se obtuvo en forma simultánea a algún procedimiento quirúrgico terapéutico. En todos los casos la biopsia se realizó previo consentimiento de los pacientes, o de los individuos normales.

Los fragmentos de piel obtenidos con la biopsia se sembraron en botellas de cultivo desechables (Falcon) con capacidad de 75 cm² (250 ml) usando 10 ml de medio de cultivo esencial mínimo-Eagle 0.98% p/v, pH 7.4, adicionado con tricine (Sigma) 20 mM, bicarbonato de sodio 24 mM, aminoácidos no esenciales 1% v/v, estreptomycin 100 ug/ml, penicilina 100 U/ml, y suero fetal de ternera 20%. Las siembras se incubaron a 37 °C en una atmósfera de aire 95% y CO₂ 5% durante el tiempo requerido para observar la aparición de los primeros fibroblastos. Esto se logró entre 1 a 2 semanas. Una vez que se logró la confluencia celular las células se subcultivaron en botellas nuevas. Este procedimiento se realizó desprendiendo las células de la botella con tripsina y calentando la botella a 37 °C durante 3 minutos.

El procedimiento de subcultivo se realizó 3 ó 4 veces adicionales, con lo que se logró el establecimiento de una línea celular sin contaminantes con otros tipos de células, que designaremos como línea celular primaria.

Una vez establecida la línea celular primaria, los fibroblastos se usaron para estudios específicos, o se almacenaron a -70 °C sin detrimento de sus capacidades celulares.

Congelacion celular.

Para el congelamiento se utilizaron células confluentes, las cuales se despegaron de sus botellas por el procedimiento de tripsinización previamente descrito. La suspensión celular se centrifugó a 800 x g a 4 °C durante 3 minutos, el precipitado celular se resuspendió en 1 ml de medio (MEM-Eagle 0.98% p/v, tricine 20 mM, bicarbonato de sodio 24 mM, aminoácidos no esenciales 1% v/v, estreptomicina 100 ug/ml, penicilina 100 U/ml, suero fetal de ternera 10% glicerol 10%, pH de 7.4) y se transfirió a viales de vidrio de 2.2 ml de capacidad. El proceso de congelación se realizó en forma gradual con la finalidad de evitar daño y/o muerte celular, hasta lograr una temperatura de -70 °C.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

A. ESTUDIO DEL RECEPTOR CITOPLASMICO PARA DHT:

Cultivo Celular. Para el estudio de receptores para 5 α -DHT en los fibroblastos mantenidos en cultivo, las líneas celulares (normales femeninos n=5, normales masculinos n=6, pacientes con FTC n=2 y pacientes con FTI n=2), se sembraron en botellas cilíndricas de vidrio con capacidad de 690 cm², (1892 ml). El inóculo inicial de 5 x 10⁶ células se realizó con 100 ml

de medio de cultivo (MEM-Eagle 0.98% p/v, tricine 20 mM, bicarbonato de sodio 24 mM, estreptomycin 100 ug/ml, penicilina 100 U/ml, suero fetal de ternera 10%, pH 7.4). Las botellas se gasearon con una mezcla de aire y CO₂ (95%-5%) durante dos minutos, y se incubaron en un incubador con rotación (Bellco Glass, Inc. Modelo 3032) a una velocidad de 0.2 rpm durante las primeras 24 hs y de 0.4 rpm los 6 días posteriores. En el 3° y 6° días se reemplazó el medio con 100 ml de medio de cultivo (MEM-Eagle 0.98% p/v, tricine 20 mM, bicarbonato de sodio 24 mM, estreptomycin 100 ug/ml, penicilina 100 U/ml y suero fetal de ternera tratado con carbón activado*).

Obtención de citosol. El 7° día las botellas se enjuagaron con 30 ml de medio de cultivo a 37 °C sin antibióticos y sin suero fetal de ternera, y se agregaron 50 ml del medio esencial mínimo a 37 °C que contenía DHT-³H a una concentración 1 nM, y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Al finalizar la incubación se decantó el medio de cultivo, y las botellas se enjuagaron dos veces con 50 ml de solución amortiguadora

* El tratamiento para eliminar el contenido de esteroides endógenos del suero fetal de ternera consistió en la adición de carbón activado (1 g/100 ml), agitación a 4 °C durante 12 hs y remoción del carbón por centrifugación y filtración en membrana millipore.

tris-salina (20 mM, 0.9%) a 4 °C. Se agregaron 10 ml de la solución amortiguadora, se prepararon las células con una espátula de hule (Bellco Glass, Inc.). Todo el procedimiento se realizó entre 0 y 4 °C. La suspensión celular se centrifugó a 800 x g a 4 °C durante 8 minutos, el precipitado conteniendo el paquete celular se resuspendió en 3 ml de solución tris-salina y se recentrifugó en las mismas condiciones. El paquete celular se resuspendió v/v en una solución que contiene tris 20 mM, EDTA 1.5 mM, Ditiotreitól 0.25 mM, trasylol 5000 U/ml y KCl 0.5 M. La suspensión celular se sometió a ultrasonido 3 veces durante 10 segundos (Sonicador Heat Systems Ultrasonics, Inc. Modelo W-220 F). La suspensión de células rotas por ultrasonido se centrifugó durante 1 h a 105,000 x g (Ultracentrífuga Beckman L-5-50B, en un rotor SW 50.1) a 2 °C. Del sobrenadante (Citosol) se tomaron alícuotas para la cuantificación de proteínas que se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Lowry (29).

Separación del complejo 5 α -DHT-Receptor en gradiente de densidad por ultracentrifugación:

Se aplicaron fracciones de 200 a 350 μ l de citosol en gradientes lineales de sacarosa 5-20% conteniendo gli

cerol al 10%, tris 20 mM, EDTA 1.5 mM, ditiotreititol 0.25 mM a un pH de 7.4 con KCl 0.5 M. Como marcador interno se utilizó ovoalbúmina ^{14}C .

Los gradientes se centrifugaron durante 20 hs a 2 °C a 250,000 xg. Se colectaron fracciones de 80 ul (5 gotas) mediante la perforación del fondo del tubo que contenía el gradiente. En estas fracciones se midió el contenido de radiactividad, previa adición de líquido de centelleo Insta-gel (10 ml), en un contador de centelleo líquido Packard Tri-Carb modelo 2660. Las muestras se contaron por un período suficiente para un error de conteo menor del 5%.

B. ESTUDIO DE ESPECIFICIDAD DE UNION DEL RECEPTOR PARA DHT

El procedimiento utilizado en estos estudios fue similar al descrito anteriormente, excepto que en el estudio de especificidad se añadió en la incubación hormonas frías en excesos, como a continuación se describe.

1. Estudio de desplazamiento de la DHT unida al receptor. Los fibroblastos se incubaron con DHT- ^3H a una concentración 1 nM, mas DHT no marcada radiactivamente a una concentración 200 nM.

2. Estudio de competencia con otra hormona de naturaleza esteroidea. Los fibroblastos se incubaron con DHT-³H a una concentración 1 nM, mas cortisol no marcado a una concentración 200 nM.

C. ESTUDIO DE TERMOLABILIDAD EN LA MACROMOLECULA RECEPTORA

La metodología utilizada en este estudio fue similar a la anteriormente descrita hasta el momento de la obtención del citosol, el cual se calentó a 60 °C por un período de 30 minutos. El citosol tratado de esta forma se colocó en un gradiente de sacarosa de densidad creciente y por ultracentrifugación y fraccionamiento del gradiente en la forma previamente descrita se hizo el análisis de la radiactividad obtenida en las diferentes fracciones.

D. TRANSPORTE DEL COMPLEJO DHT-RECEPTOR:

Para el estudio del transporte del complejo hormona - receptor del citosol al interior del núcleo, se usaron líneas celulares (normales masculinos n=2, pacientes FTC n=1 y pacientes FTI n=1) obtenidas con los procedimientos de cultivo anteriormente descritos. El complejo 5 α -DHT-receptor de citosol se obtuvo de fibroblastos provenientes de individuos normales con la técnica descrita anteriormente para el estudio de recep-

tores hasta la obtención del citosol. Los núcleos se obtuvieron de fibroblastos normales y de fibroblastos de pacientes con el síndrome de Feminización Testicular en sus variedades completa e incompleta.

Obtención de núcleos limpios. Se obtuvo el precipitado de células mediante el raspado de las paredes con una espátula; el precipitado celular se centrifugó a 800 xg durante 10 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 4.2 ml de solución amortiguadora hipotónica (tris 0.02 M, cloruro de magnesio 0.5 mM, cloruro de calcio 1.0 mM, pH de 7.4) se dejó en reposo durante 15 minutos al término de los cuales se rompió la membrana celular a través de una aguja hipodérmica número 25, el rompimiento completo de las membranas se logró al realizar esta operación durante 10 veces. A esta suspensión se le añadió 0.7 ml de solución amortiguadora hipertónica (tris 0.02 M sacarosa 2.2 M, MgCl₂ 0.5 mM, CaCl₂ 1 mM, pH de 7.4) con lo que se llevó la suspensión a condiciones de isotonicidad. Se centrifugó durante 20 minutos a 1600 x g a 4 °C, y el paquete nuclear limpio de detritus celulares se resuspendió en 1.2 ml de solución amortiguadora isotónica (tris 0.02 M, sacarosa 0.32 M, MgCl₂ mM, pH 7.4).

El citosol (0.6 ml) obtenido de fibroblastos normales conteniendo el complejo DHT-receptor (9460 cpm/ml) se incubó con núcleos (0.1 ml) normales y mutantes utilizando una solución de KCl (0.2 ml) a dos diferentes concentraciones molares (0.05 y 0.18 M). Las incubaciones se realizaron entre 0 y 4 °C durante 1 hora. El volumen final de las incubaciones fue de 800 ul. Como controles experimentales se utilizaron incubaciones de núcleos normales y mutantes con una solución de 5 α -DHT libre de receptores bajo las mismas condiciones descritas cuando se utilizó el complejo DHT-receptor.

Al finalizar el período de incubación los tubos se centrifugaron a 1600 x g durante 10 minutos a 4 °C, los paquetes nucleares resultantes se lavaron con 1 ml de TKM (tris 0.05 M, KCl 0.025 M, MgCl₂ 0.001 M, tritón X 100 0.2%, sacarosa 0.05 M, pH 7.4) y se centrifugaron a 1600 x g durante 10 minutos a 4 °C posteriormente se les agregó 1 ml de TE (tris 2 mM, EDTA 0.15 mM). Los tubos se agitaron en vortex y se re-centrifugaron a 1600 x g durante 10 minutos a 4 °C, los paquetes nucleares se resuspendieron en 0.7 ml de agua y se sonicaron 5 segundos 2 veces para romper los núcleos. De la suspensión nuclear, se toma-

ron 0.5 ml y se colocaron en viales con 10 ml de líquido de centelleo Insta-gel y se contaron durante 10 minutos en un contador de centelleo líquido. Se tomaron alícuotas de 0.2 ml para la cuantificación de ADN usando el método de Santoianni y Ayala (30), esta medición se hace con el objeto de comparar cuantitativamente los resultados obtenidos en cada uno de los tubos del ensayo.

IV. RESULTADOS

A. ESTUDIO DEL RECEPTOR CITOPLASMICO PARA 5 α -DHT:

A1) Células de pacientes con el síndrome de feminización testicular completa.

El fraccionamiento del gradiente lineal de sacarosa, y el análisis de la radiactividad contenida en cada una de las fracciones demostró, en el caso de los fibroblastos normales usados como control experimental, la presencia de una zona de mayor radiactividad entre las fracciones 30 a 40 con un pico máximo en la fracción 36, como se observa en la figura 5. Este pico de radiactividad tuvo un coeficiente de sedimentación de 4.6S en ultracentrifugación, estimado de acuerdo a la sedimentación observada para el marcador interno (ovoalbúmina ^{14}C) con un coeficiente de sedimentación conocido (3.6S).

Además del pico máximo ya descrito, se observó un área de radiactividad en las últimas 5 fracciones del gradiente y que corresponde a la 5 α -DHT- ^3H libre.

Por el contrario, el análisis de radiactividad de las fracciones del gradiente de incubaciones de células mutantes, provenientes de dos pacientes (A y B) con el síndrome de feminización testicular completa, demostró la presencia de ^3H en forma libre localizada en las últimas fracciones, como puede observarse en la figura 5. El citosol de las células normales tuvo una concentración proteínica de 5.7 mg/ml, mientras que el citosol de las células mutantes tuvo una concentración de 7 mg/ml. Estos resultados permitieron establecer que en las células normales, hubo unión específica de $5\alpha\text{-DHT}$ a su receptor citoplásmico a una concentración de 40.5 fmolas/mg proteína: Mientras que en el caso de las células mutantes esta unión específica no se estableció.

A2) Células de pacientes con el síndrome de feminización testicular incompleta.

Como se muestra en la figura 6 el análisis de radiactividad de las fracciones obtenidas del gradiente con el citosol de las células normales - utilizadas como control, mostró un pico de radiactividad en la fracción de 4.6S. El fraccio-

namiento del gradiente con el citosol de los dos pacientes (C y D) con el síndrome de feminización testicular incompleta, reveló en un caso, un área de radiactividad entre las fracciones 25 a 35, con un pico máximo en la fracción 28, mientras que, en las células del otro paciente se observó una área de radiactividad entre las fracciones 30 a 40 con un pico máximo en la fracción 34. Estos picos máximos de radiactividad tienen un coeficiente de sedimentación de 5.1 S calculadas en relación con la ovoalbúmina ^{14}C utilizando como marcado interno. El contenido de proteínas del citosol fue de 5.2 mg/ml en las células normales y de 4.07 y 6.5 mg/ml en las células mutantes. Los resultados demostraron unión específica de 5α -DHT a su receptor citoplásmico en una concentración de 37.9 fmolas/mg de proteína en las células normales, mientras que en las células mutantes esta unión se estableció a una concentración de 6.25 fmolas/mg de proteína y de 36.1 fmolas/mg de proteína respectivamente.

B. ESTUDIO DE ESPECIFICIDAD DE UNION DEL RECEPTOR PARA DHT

1. Estudio de desplazamiento de la DHT unida al receptor. Al

hacer el análisis de los resultados obtenidos en estos estudios, podemos observar (Fig 7) que al poner un exceso 200 veces de la hormona fría, existe un desplazamiento total de la hormona marcada. Esto se observó en el caso de células de prepucio normal así como en las células de un paciente con el síndrome de feminización testicular incompleta. Los estudios hechos se llevaron a cabo por duplicado.

2. Estudio de competencia con otra hormona de naturaleza esterooidal. Al incubar citosol con DHT-³H más cortisol sin marcar radiactivamente en una concentración 200 veces mayor que la hormona marcada, observamos que el cortisol no desplazó a la DHT-³H (Fig 8). En el caso de las células normales en el control (células normales incubadas con DHT-³H 1 nM) se obtuvo una unión de 32.3 fmolas DHT/mg de proteínas, las células normales incubadas con cortisol no radiactivo en un exceso de 200 veces tuvieron una unión de 36.24 fmolas DHT/mg de proteínas, estos resultados son el promedio de dos experimentos.

En el caso de las células del paciente con FTI, se obtuvieron resultados similares; el control -

tuvo una unión de 38 fmolas DHT/mg de proteínas y la incubación que se realizó usando el cortisol en exceso de 200 veces fue de 32.7 fmolas DHT/mg de proteínas, estos resultados representan el promedio de dos experimentos.

C. ESTUDIO DE TERMOLABILIDAD DE LA MACROMOLECULA RECEPTORA.

El análisis de las fracciones obtenidas del gradiente demostró tanto en células normales como en las células del paciente con FTI, solamente radiactividad libre, lo que indica que la macromolécula receptora para DHT perdió su capacidad de unión después de que fué sometida al calor (Fig 9).

D. TRANSPORTE DE COMPLEJOS DHT-RECEPTOR A NUCLEOS DE INDIVIDUOS NORMALES Y DE PACIENTES CON EL SINDROME DE FEMINIZACION TESTICULAR COMPLETA E INCOMPLETA.

El conteo de radiactividad de las diferentes incubaciones de núcleos con el complejo citoplásmico DHT-receptor, reveló como se muestra en las tablas I y II incorporación de radiactividad tanto en los núcleos normales, como en los núcleos provenientes de células de pacientes con las formas completa e incompleta

del síndrome de feminización testicular. Como puede observarse, el contenido de radiactividad expresado en dpm/ μ g DNA fue similar tanto en los núcleos normales como en los mutantes bajo las dos diferentes condiciones de fuerza iónica utilizada (0.05 y 0.18 M), observándose sin embargo una disminución significativa del contenido de radiactividad para ambos tipos de células cuando se utilizó en la incubación la fuerza iónica mayor.

Por otra parte las incubaciones de núcleos obtenidos de células normales y mutantes (Formas completa e incompleta del síndrome de feminización testicular), con 5 α -DHT-³H libre en ausencia de receptor citoplasmático demostró una incorporación nuclear de radiactividad prácticamente nula.

En la expresión final de los resultados, la incorporación neta de DHT-³H-receptor al interior del núcleo, fue calculada restando la cantidad mínima incorporada en los experimentos control (DHT-³H libre), a la radiactividad encontrada en el sonificado nuclear.

La concentración de ADN del sonificado nuclear fue similar en las células normales y mutantes, con un rango de 7.3 a 9.0 μ g/ml, con lo cual podemos afirmar que se trabajó con cantidades similares de material biológico en cada una de las incubaciones.

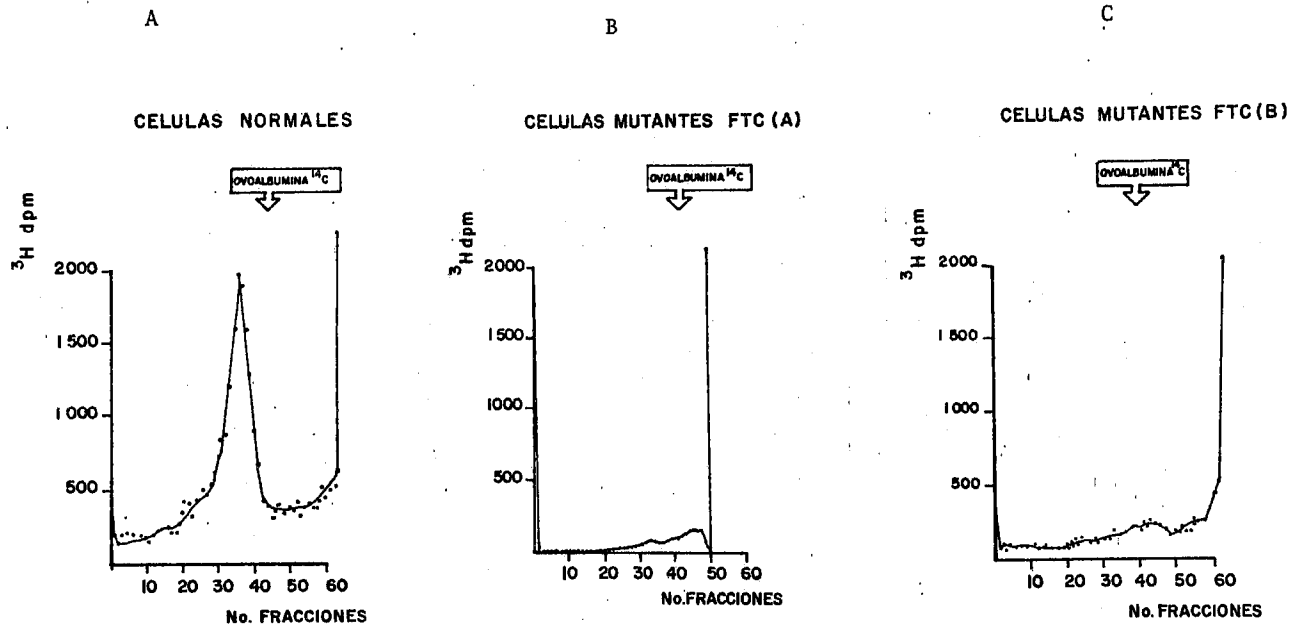


FIGURA No. 5

Comparación de la unión de $5\alpha\text{-DHT-}^3\text{H}$ al receptor citoplasmático, mediante ultracentrifugación en gradientes de densidad de sacarosa, en fibroblastos humanos provenientes de pacientes con el síndrome de feminización testicular completa y de un individuo normal usada como control. a) Fibroblastos provenientes de prepucio de un individuo normal. b y c) Fibroblastos provenientes de labio mayor de pacientes con el síndrome de feminización testicular completa.

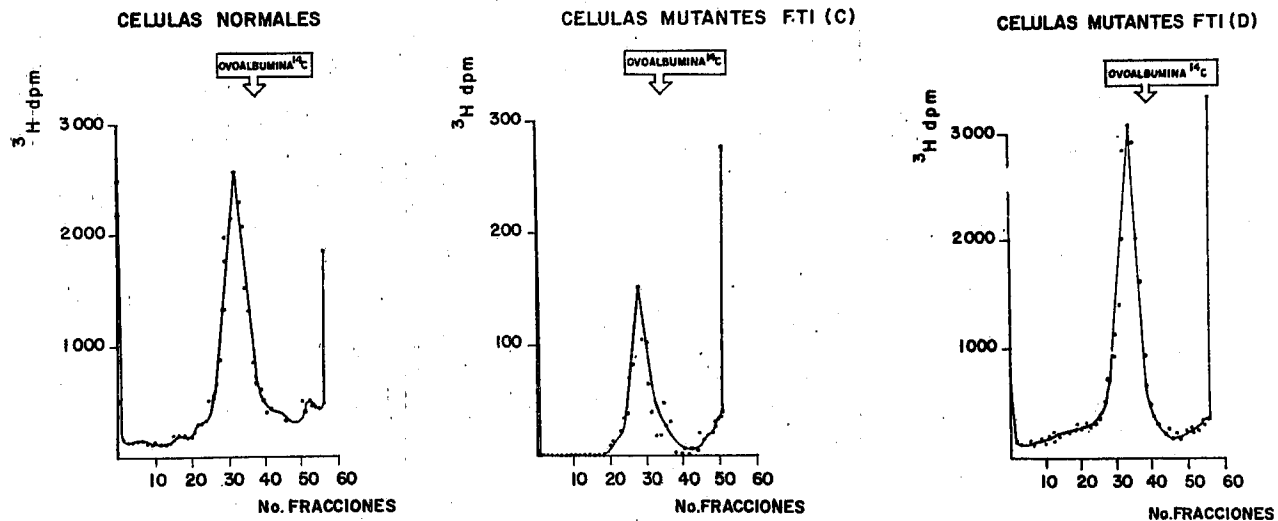


FIGURA No. 6

Comparación de la unión de 5α -DHT- 3 H al receptor citoplasmático, mediante ultracentrifugación en gradientes de densidad de sacarosa, en fibroblastos humanos provenientes de pacientes con el síndrome de feminización testicular incompleta y de un individuo normal usada como control. a) Fibroblastos provenientes de labio mayor de un individuo normal. b y c) Fibroblastos provenientes de labio mayor de pacientes con el síndrome de feminización testicular incompleta.

PREPUCIO NORMAL

LABIO MAYOR FTI

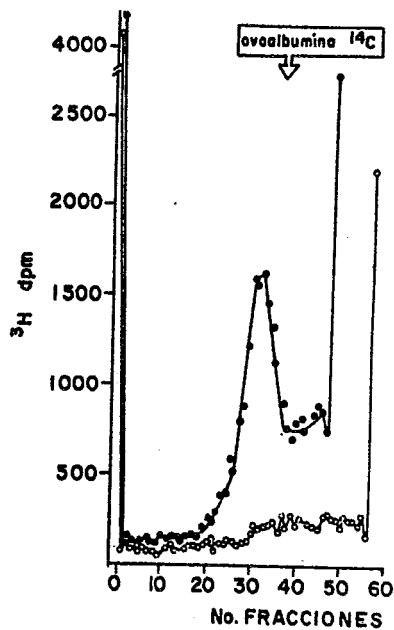
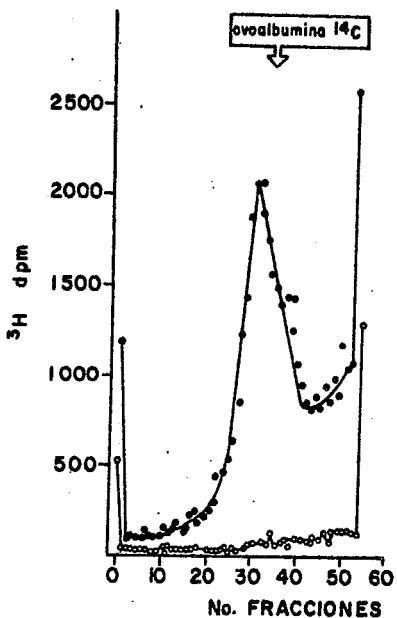


FIGURA No. 7

Desplazamiento de DHT- ^3H unida al receptor por un exceso de DHT no marcada radiactivamente. Los resultados presentan datos de un experimento efectuado por duplicado. ●—● 1 nM de DHT- ^3H , ○—○ 200 nM de DHT.

PREPUCIO NORMAL

LABOR MAYOR FTI

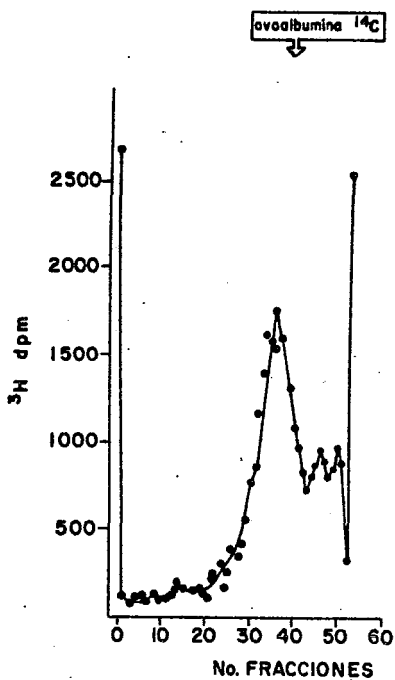
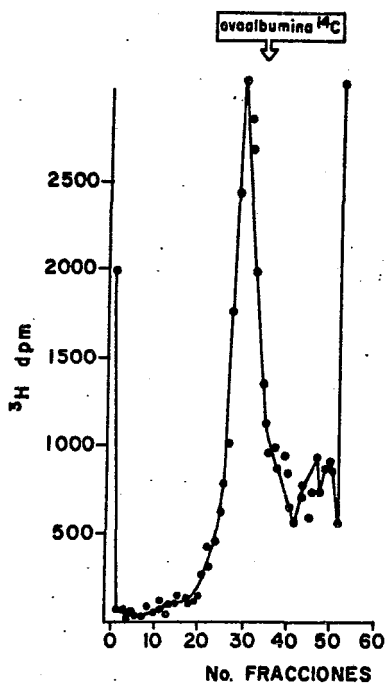


FIGURA No. 8

Competencia de unión entre DHT- ^3H y cortisol no marcado radiactivamente en un exceso de 200 veces. Estos datos son el resultado de un experimento efectuado por duplicado.

PREPUCIO NORMAL

LABIO MAYOR FTI

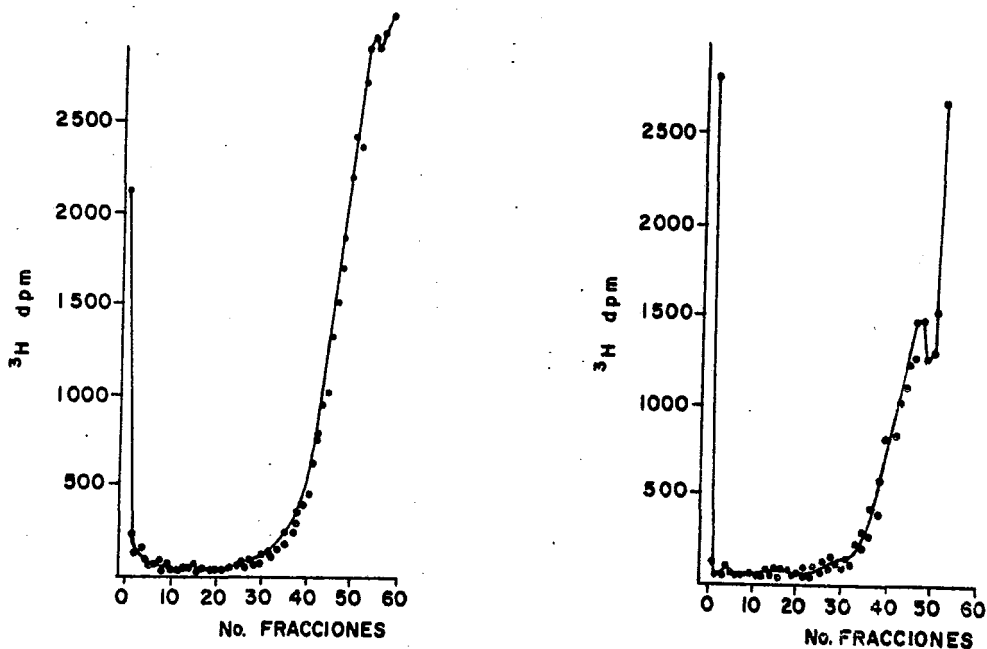


FIGURA N^o. 9

Estudio de termolabilidad de la macromolécula receptora. El citosol obtenido después de la incubación de los fibroblastos con DHT- ^3H 1 nM, se sometió a una temperatura de 60 °C durante 30 minutos. La capacidad de unión se perdió totalmente como se muestra en la figura. Los resultados presentan datos de un experimento.

T A B L A I

CAPTACION DE COMPLEJOS DHT-³H-RECEPTOR POR NUCLEOS NORMALES Y NUCLEOS DE FTC.

Origen del complejo DHT- ³ H Receptor Citoplasmático	Origen de la preparación nuclear	Concentración KCl M	dpm / µg DNA incorporados
Células Normales	Células Normales *	0.05	27 **
Células Normales	Células FTC *	0.05	35
Células Normales	Células Normales	0.18	15
Células Normales	Células FTC	0.18	17

* Las células normales se obtuvieron a partir de prepucio de un individuo normal. Las células FTC se obtuvieron de labio mayor de una paciente con FTC.

** Cada resultado presentado es el promedio de 3 estudios llevados a cabo teniendo una desviación estandar de: 4.36, 2.9, 2.7 y 3.66 respectivamente.

T A B L A II

CAPTACION DE COMPLEJOS DHT-³H-RECEPTOR POR NUCLEOS NORMALES Y
NUCLEOS DE FTI

Origen del complejo DHT- ³ H Receptor Citoplasmático	Origen de la preparación nuclear	Concentración KCl M	dpm / μ g DNA incorporados
Células Normales	Células Normales *	0.05	47 **
Células Normales	Células FTI *	0.05	45
Células Normales	Células Normales	0.18	26
Células Normales	Células FTI	0.18	32

* Las células normales se obtuvieron a partir de prepucio de un individuo normal. Las células FTI se obtuvieron de labio mayor de 2 pacientes con FTI.

** Cada resultado presentado es el promedio de 2 estudios llevados a cabo teniendo una desviación estandar de: 2.8, 2.5, 3.1, 2.9 respectivamente.

V. DISCUSION

Los resultados obtenidos en el curso de este estudio, permitieron establecer que el fibroblasto humano es una célula que es fácilmente obtenible a partir de biopsias de piel, y fácilmente mantenido en cultivo o en congelación sin detrimento de su capacidad metabólica. Por otra parte, representa un modelo experimental único para el estudio del mecanismo íntimo de acción de hormonas esteroides con actividad androgénica por un número importante de razones, incluyendo retención de la sensibilidad a andrógenos de la piel de la cual deriva por un tiempo prolongado, y fundamentalmente por permitir el estudio de las macromoléculas receptoras sin interferencia de proteínas plasmáticas que unen específica y no específicamente a las hormonas esteroides. Finalmente este tipo de estudio puede ser utilizado como un procedimiento auxiliar de diagnóstico en la clínica y contribuir a la ubicación de las fallas moleculares en alteraciones de la diferenciación sexual humana como se postuló en la hipótesis de trabajo.

Nuestros resultados confirmaron el concepto de que el mecanismo de acción íntimo de la 5α -DHT en una célula andrógeno sensible se realiza de acuerdo al esquema de "2 pasos" postulado por Jensen.

De hecho se pudo demostrar la formación del complejo DHT-receptor en el citosol de los fibroblastos normales. La macromolécula receptora exhibió un coeficiente de sedimentación en ultracentrifugación de 4.6S en presencia de KCl, que incrementa la fuerza iónica y favorece la disociación en sus sub-unidades. Nuestros datos coinciden con lo informado previamente en la literatura para otros tejidos andrógenos-sensibles o andrógeno-dependientes, en donde el coeficiente de sedimentación oscila entre 3 y 5S. El transporte del complejo citoplásmico DHT-receptor al interior del núcleo, fue también demostrado en el curso de este estudio por una técnica in vitro de incubación de citosol conteniendo el complejo hormona-receptor con una preparación nuclear. En experimentos cuyos resultados no se muestran en este trabajo, el transporte del complejo fue también evaluado por una técnica in vivo encontrándose un coeficiente de sedimentación de 3.6S para el complejo hormona receptor en el núcleo.

Cuando estos experimentos se realizaron con células provenientes de individuos con el diagnóstico bien establecido de feminización testicular completa, los resultados fueron significativamente diferentes de los obtenidos con células normales. En primer término cuando estas

células mutantes se incubaron con 5α -DHT- ^3H y el citosol se ultracentrifugó en un gradiente de sacarosa, toda la radiactividad se localizó en las últimas fracciones (DHT libre) indicando la ausencia de la macromolécula receptora.

Estos datos indican que en estas células la síntesis del receptor en citosol no se realiza en forma adecuada. La ausencia de la macromolécula receptora en la fracción soluble de la célula, se traducirá en una falta de penetración de la DHT al interior del núcleo, y consecuentemente en una falla total en el mecanismo de acción de DHT. De hecho, cuando en otros experimentos se estudió la penetración de DHT al núcleo "in vivo" en estas células se pudo demostrar la ausencia total de hormona intranuclear. Estos datos confirman algunos informes previos de la literatura (31-34) y sugieren fuertemente que la mutación causante del pseudohermafroditismo masculino en estos individuos está localizada a nivel del gen o genes que regulan la síntesis del receptor para andrógenos en el citosol.

En base al patrón de transmisión hereditaria del síndrome de Feminización Testicular (Recesivo ligado al cromosoma X) se ha postulado que la mutación ocurre a nivel génico, en el cromosoma X (33). Algunos datos experimentales en animales con esta mutación apoyan este concepto (19):

Es interesante señalar que nuestros resultados fueron idénticos en células provenientes de diferentes pacientes con la forma completa de este síndrome, pero pertenecientes a la misma familia.

Posterior a estos estudios, creímos de interés estudiar el transporte del complejo DHT-receptor del citosol al interior del núcleo en estas células mutantes, con el objeto de precisar si en ausencia de la macromolécula receptora el transporte se conserva o bien está alterado en cuyo caso sugeriría una andrógeno dependencia. Para ello fue necesario obtener complejo DHT-receptor de células normales, y estudiar el transporte al interior de núcleos provenientes de células mutantes. Los resultados demostraron que no existe una diferencia significativa en el transporte a núcleos mutantes y núcleos normales, demostrando la integridad del transporte aun en ausencia completa del receptor. Por otra parte, también observamos que cuando usamos concentraciones de KCl mayores se obtuvo una disminución significativa de la cantidad de radiactividad captada por el núcleo, lo que se explica en base al concepto de que el incremento en la fuerza iónica del medio abole la unión inespecífica de la hormona a otras proteínas (34).

Nuestros resultados demuestran que en la familia estu

diada con la forma completa del Síndrome de Feminización Testicular, la alteración molecular causante del padecimiento es la ausencia del receptor para andrógenos en el citosol. Sin embargo es factible la existencia de familias con la misma expresión fenotípica del síndrome, cuya falla molecular este localizada en algún o algunos eventos intracelulares - posteriores a la unión del andrógeno con su molécula en el citosol. Recientemente se han presentado algunas evidencias que apoyan este concepto (36-37).

Estudios previos realizados en este laboratorio, han demostrado que el perfil endócrino y la actividad esteroide genética gonadal de pacientes con la forma incompleta del Síndrome de Feminización Testicular, es similar a la observada en la forma completa a pesar de existir algunas diferencias en la expresión fenotípica. Fue por lo tanto de interés estudiar el mecanismo intracelular de acción de DHT en fibroblastos provinentes de piel de área genital (labio mayor) de estas pacientes. Los resultados indicaron que a diferencia de lo observado en células de individuos con la forma completa del síndrome, la DHT se une a una macromolécula receptora en el citosol en una forma similar a lo observado en células normales. El coeficiente de sedimentación del complejo DHT-receptor en su forma disociada fue de 5.1S en un número de 3 experimentos. Esta diferencia en el

coeficiente de sedimentación con el receptor normal puede explicarse en base a un artefacto metodológico. Sin embargo será necesario un mayor número de experimentos y de nuevos enfoques metodológicos de estudio para investigar si existe algún significado biológico para esta diferencia o es simple artefacto como se mencionó anteriormente.

El complejo DHT-receptor tiene en estas células mutantes la capacidad de penetrar al núcleo como se demostró en experimentos in vivo e in vitro.

CONCLUSIONES FINALES

El trabajo experimental informado en esta tesis permite establecer las siguientes conclusiones:

- I. El fibroblasto derivado de piel mantenido en cultivo representa un modelo único para el estudio del mecanismo íntimo de acción hormonal en condiciones normales y alteradas.
- II. Se demostró que la ausencia del receptor citoplásmico para andrógenos fue la falla molecular responsable del Síndrome de Feminización Testicular completa en la familia estudiada.
- III. Se demostró por primera vez que el transporte citosol-núcleo del complejo no es un proceso andrógeno dependiente.
- IV. Se demostró que en la forma incompleta del Síndrome de Feminización Testicular existe el receptor citoplasmático para andrógenos y que el complejo Hormona-receptor penetra al núcleo. indicando que la falla molecular responsable de la insensibilidad a andrógenos es posterior a los mecanismos estudiados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. King, R.J.B., and Mainwaring, W.I.P.: Steroid-cell interactions. London Buttrworhts 1a. edición 1974, pag. 1-6, 21 y 22.
2. Dorfman Ralph I.: Metabolism of steroid hormones, Academic Press, New York, 1965, pag 5-21.
3. Paulsen, C.A.: Testículos en: Tratado de Endocrinología. Editor: Williams R.H. Editorial Salvat, Barcelona 1969, pag. 409-463.
4. Williams-Ashman, H.G., Liao, S., Hancock, R.L., Jurkowitz, L., and Silverman, D.A.: Testicular hormones and the synthesis of ribonucleic acids and proteins in the prostate gland. Recent. Prog. Horm. Res. 20: 247-301, 1964.
5. Ham, A.V.: Sistema endócrino en: Tratado de Histología. Editorial Interamericana 7a. edición 1969, México, D.F.
6. Pérez-Palacios, G., Lamont, K.G., Pérez, A.E., Jaffe, R.B., and Pierce, B.J.: De novo formation and metabolism of steroid hormones in feminizing testes: Biochemical and ultrastructural studies. J. Clin Endocr. Metab. 29:786-800, 1969.
7. Serra, G.B., Pérez-Palacios, G., and Jaffe, R.B.: De novo testosterone biosynthesis in the human fetal testis. J. Clin. Endocr. Metab. 30:128-130, 1970.
8. Barraclough, C.A., and Gorski, R.A.: Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen induced sterility in the female rat. Endocrinology 68: 68-79, 1961.
9. Odell, W.P., and Moyer, L.D.: Dynamic relationship of the testis to the whole man: In: Physiology of reproduction. The .CV. Mosley Co. Saint Loius. Pag. 82-93.
10. Mercier-Bodard, C., Afsen, A., and Baulieu, E-E.: Sex steroid binding plasma protein (SBP). Acta Endcr. 64:204-224, 1970.

11. Wilson, J.D., and Loeb, P.M.: Intranuclear localization of testosterone 1,2-³H in the preen gland of the duck. *J. Clin. Invest.* 44:1111-1112, 1965.
12. Fang, S., Anderson, K.M., and Liao, S.: Receptor protein for androgens. *J. Biol. Chem.* 244:6584-6595, 1969.
13. Baulieu, E-E., and Jung, I.: A prostatic cytosol receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38:599-606, 1970.
14. Minwaring, W.I.P.: A soluble androgen receptor in the cytoplasm of rat prostate. *J. Endocr.* 45:531-541, 1969.
15. Mainwaring, W.I.P., and Irving, R.: The use of deoxyribonucleic acid-cellulose chromatography and isoelectric focusing for the characterization and partial purification of steroid-receptor complexes. *Biochem. J.* 134:113-127, 1973.
16. Giannopoulos, G., and Gorsk, J.: Estrogen Receptors *J. Biol. Chem.* 246: 2524-2529, 1971.
17. O'Malley, B.W., Toft, D.O., and Sherman, M.R. Progesterone-binding components of chick oviduct. II Nuclear components. *J. Biol. Chem.* 246, 117-1123, 1971
18. Fang, S., and Liao, S.: Androgen receptors. *J. Biol. Chem.* 246:16-24, 1971.
19. Mainwaring, W.I.P: The binding of (1,2-³H) within nuclei of the rat prostate. *J. Endocr.* 44:325-333 1969.
20. Jensen, E.V., Catt, K.J., Gorski, J., and Williams-Ashman, H.G.: Hormone receptor interaction in the mechanism of reproductive hormone action. In: *Frontiers in Reproductive and fertility control. Part 2* Roy O. Greepe and M.A. Koblensky, directors. Sponso red by the Ford Foundation The MIT Press, Cambridge Massachusetts and London England.
21. Lyon, M.F., and Hawkes, S.G.: Linked gene for testicular feminization in the mouse. *Nature* 227:12-19, 1970.

22. Bullock, L.G., Schneider, and Bardin, C.W.: 5α -steroid reductase activity in the tissues from rates with end organ insensibility to testosterone. *Life Sciences* 9:no. 12, 1970.
23. Pérez-Palacios, G., Morato, T., Pérez, A. E., Casañeda E., and Gual, C.: Biochemical studies on the incomplete form of testicular feminization syndrome. *Steroids* 17:471-492, 1971.
24. Bruchovshy, N., and Wilson, J.D.: The conversion of testosterone to 5α -androstane- 17β -ol one by at prostate in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 243:2012-2021, 1968.
25. Steglenhner, G.: De hermaphroditism nature. Kunz, Bambergae et Lipsiae 1817.
26. Morris, J. Mc L.: The syndrome of testicular feminization in the male pseudohermaphroditism. *Am. J. Gynecol.* 65:1192, 1953.
27. Tremblay, R.R., Foley, T.P., Corval, P., Park, J., J. Kowarski, A., Blizzard, R.M., Jones H.W., and Migeon, C.J.: Plasma concentration of testosterone, dihydrotestosterone, testosterone-oestradiol binding globuline, and pituitary gonadotropins in the syndrome of male pseudohermaphroditism with testicular feminization. *Acta Endocr.* 70:331-341, 1972.
28. Judd, H.L., Hamilton, C.R., Barlow, J.J., Yen, S.S. C., and Kliman, B.: Androgen and gonadotropin dynamics in testicular feminization syndrome. *J. Clin. Endocr. Metab.* 34:229-234, 1972.
29. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L.A., and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
30. Santoianni, P., and Ayala, M.: Fluorometric ultramicroanalysis of deoxyribonucleic acid in the human skin. *J. Invest. Derm.* 45:99, 1965.

31. Keenan, B.S., Meyer, W.J. III, Hadjian, A.J., Jones, H.W., and Migeon, C.J.: Syndrome of androgen insensitivity in man: absence of 5 α -dihydrotestosterone binding protein in skin fibroblasts. *J. Clin. Endoc. Metab.* 38:1143-1146, 1974.
32. Keenan, B.S., Meyer, W.J. III, Hadjian, A.J., and Migeon, C.J.: Androgen receptor in human skin fibroblasts. Characterization of a specific 5 α androstane-17 β -ol-3-one protein complex in cell sonicates and nuclei. *Steroids* 25:535-552, 1975.
33. Griffin, J.E., Punyashtiti, K., and Wilson, J.D. Dihydrotestosterone binding by cultured human fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 57:1342-1351, 1976.
34. Bullock, L.P. and Bardin, W.: Androgen receptors in testicular feminization. *J. Clin. Endocr. Metab.* 35: 935-937, 1972.
35. Pikler, G.M., Webster, R.A., Spelsberg, T.C.: Nuclear binding of progesterone in hen oviduct. *Biochem. J.* 156:399-408, 1976.
36. Meyer, W.J. III, Migeon, B.R., and Migeon, C.J.: Locus on human X chromosome for dihydrotestosterone receptor and androgen insensitivity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72:1469-1472, 1975.
37. Amrhein, J.A., Meyer, W.J. III, Jones, H.W. and Migeon: Androgen insensitivity in man: evidence for genetic heterogeneity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73:891-894, 1976.