

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

CARACTERIZACION PRELIMINAR DEL RECEPTOR INTRACELULAR PARA 5 α DIHIDROTESTOSTERONA EN TEJIDO PROSTATICO NORMAL HUMANO.

T E S I S

Que Para Obtener el Título de
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P r e s e n t a

ESPERANZA FIORELLA ARIENTI VILLEGAS

México, D. F.

1978



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

TESIS 1970
M. 45 43



JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE: PROFA. ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ.

VOCAL: PROFA. ANGELA SOTELO LOPEZ.

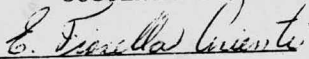
SECRETARIO: PROFA. VICTORIA VALLES

1er. SUPLENTE: PROFA. BEATRIZ MEDINA

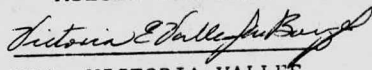
2do. SUPLENTE: PROFA. MAGDALENA OLIVOS.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LA DIVISION DE
BIOQUIMICA DE ESTEROIDES DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION
CIENTIFICA DEL CENTRO MEDICO NACIONAL DEL I.M.S.S.

SUSTENTANTE


E. FIORELLA ARIENTI V.

ASESOR DEL TEMA


DRA. VICTORIA VALLES

CON TODO CARIÑO A MIS PADRES, MI
ESPOSO Y MIS HERMANOS. A LAS FA-
MILIAS MILLA Y LOPEZ. A MIS AMI-
GAS MAGALY, LETTY Y MARICARMEN.
AL BIOL. JOAQUIN HERRERA M.

I N D I C E .

I. Abreviaturas empleadas ----	i
1. Introducción -----	1
2. Material -----	9
3. Métodos -----	13
4. Resultados -----	27
5. Discusión -----	50
6. Conclusión -----	55
7. Bibliografía -----	57

Abreviaturas empleadas.

g	gramos
μ g	microgramos (10^{-6} gramos)
pg	picogramos (10^{-12} gramos)
l	litros
μ l	microlitros (10^{-6} litros)
mm	milímetros
nm	nanómetros (10^{-9} metros)
xg	fuerza gravitatoria
Ci	curies
M	molar
mM	milimolar
mA	miliamperios
D.O.	densidad óptica
C.V.	coeficiente de variación
B.P.	banda principal
P.M.	peso molecular
U.V.	luz ultra violeta
RIA	radioinmunoanálisis
PPO	2,5 difenil oxazol
POPOP	p-bis(2,5 fenil oxazolil)
Tris	hidroxi metil amino metano
TEMED	N,N,N',N', tetrametil etilendiamina
TCA	ácido tricloroacético
EDTA	etilen diamino tetracético, sal disódica
ASB	albúmina sérica bovina

EGPA	electroforésis de disco en gel de poli- liacrilamida
ACTH	hormona adrenocorticotrópica
FSH	hormona folículo estimulante
LH	hormona luteinizante
T ³ H	testosterona 1,2 tritiada
DHT ³ H	dihidrotestosterona 1,2 tritiada
A ³ H	androstendiona 1,2, tritiada
CBG	globulina transportadora de cortisol
TeBG	globulina transportadora de testoste- rona

1. INTRODUCCION .

Muchas de las funciones del organismo humano están reguladas por hormonas. Las hormonas son mensajeros químicos que modulan actividades metabólicas específicas en tejidos diferentes a aquellos en los que se forman. Existen diferentes tipos de hormonas y de acuerdo con su estructura química se pueden formar grupos como los siguientes: hormonas protéicas, (ACTH, FSH, insulina, etc.), hormonas esteroideas, (cortisol, progesterona, etc.), catecolaminas, (adrenalina, noradrenalina, etc.), hormonas oligopeptídicas, (hormonas liberadoras), y algunas otras (como triyodotironina, etc.), que forman grupos reducidos.

Dentro del grupo de las hormonas esteroideas se encuentran dos subdivisiones principales: aquellas producidas en la corteza de las glándulas suprarrenales, conocidas como

corticoides y las formadas en las glándulas sexuales, que comúnmente se conocen con el nombre de estrógenos, las femeninas, y de andrógenos, las masculinas. Con los trabajos de Greep, Fevol y Hisaw (1,2) en 1936 sobre los efectos de las hormonas hipofisarias gonadotróficas FSH y LH en la regulación de la función testicular en ratas, empezó a crecer el interés por los andrógenos y su actividad biológica.. La acción de LH en la espermatogénesis parece consecuencia de la estimulación de la síntesis de testosterona por las células de Leydig, mientras que FSH es necesaria para el mantenimiento de la espermiogénesis, sin embargo sus efectos pueden ser minimizados y aún bloqueados por el acetato de ciproterona, que es un "anti-andrógeno", lo que indica que la acción de FSH y LH va unida, o mejor dicho, es mediada a través de los andrógenos. (3).

Estos esteroides han sido muy estudiados y actualmente conocemos su biosíntesis en el testículo (fig.1), así como su catabolismo en el hígado (fig. 2), (4), y su modo de acción en los órganos blanco.

Para que las hormonas puedan afectar a los tejidos blanco, requieren llegar a ellos, y por lo tanto, existen transportadores hormonales en la sangre como CBG y TeBG (5,6), y en algunos líquidos corporales como el líquido seminal.

Se ha propuesto un mecanismo de acción de las hormonas adrenales al actuar sobre su tejido blanco (7), en una forma que parece aplicable a todas las hormonas esteroideas, siendo ésta la siguiente:

BIOSINTESIS DE ANDROGENOS EN TESTICULO

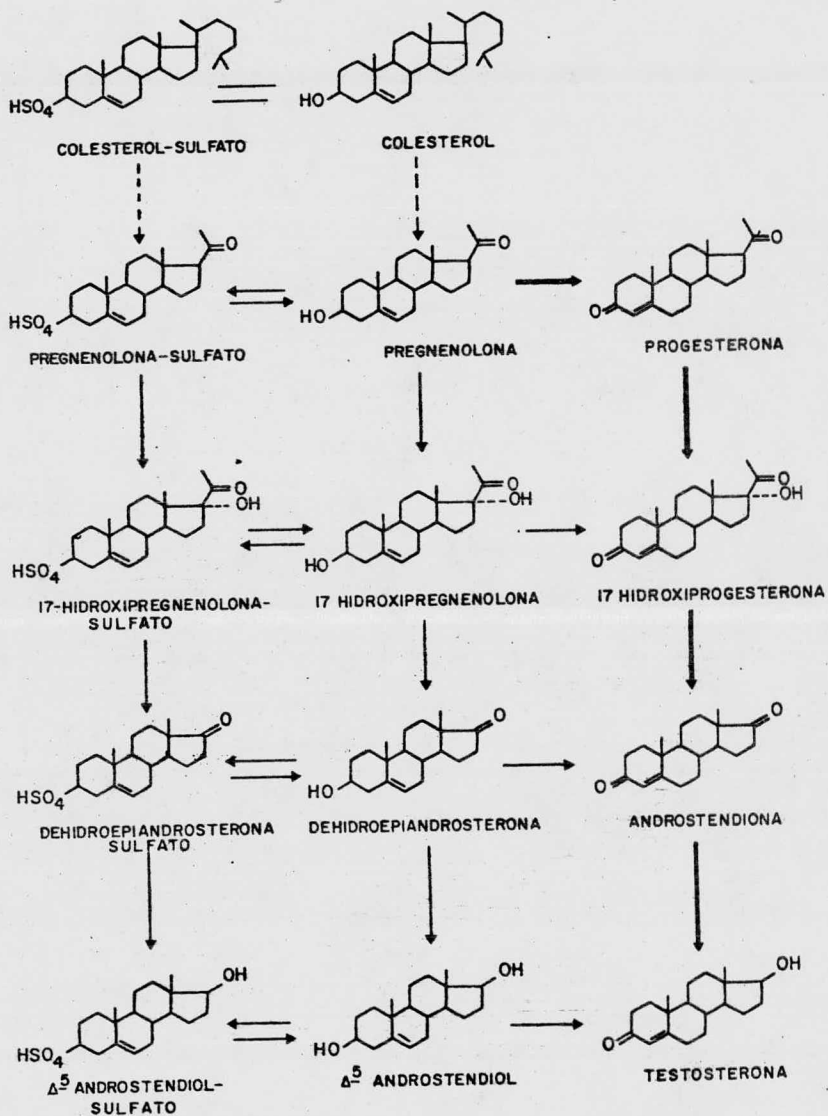


FIG. 1

CATABOLISMO DE ANDROGENOS EN HIGADO

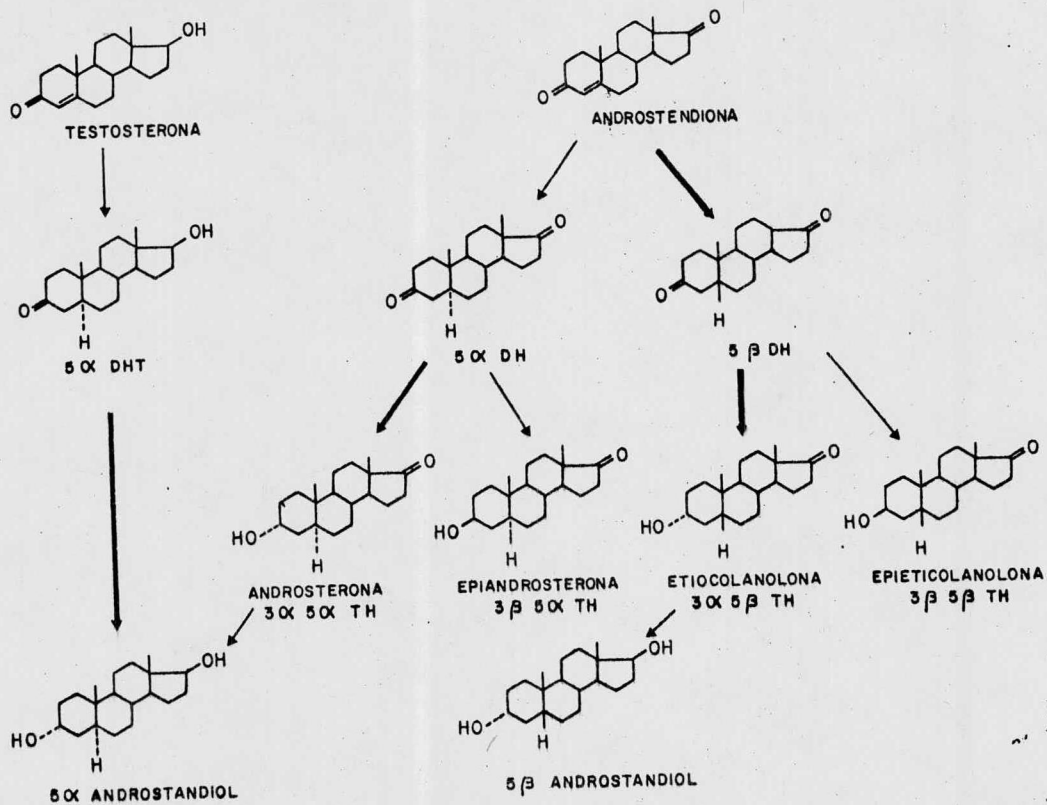


FIG. 2

1.- Iniciación de la respuesta por la unión del esteroide a un sistema receptor protéico específico en el citoplasma del tejido blanco, por lo que la palabra receptor se aplica a las proteínas que presentan una gran afinidad estereoespecífica por determinada hormona, tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células blanco;

2.- Interacción del complejo receptor-hormona con el genoma produciendo una desrepresión de la transcripción, con lo cuál se obtiene una inducción de la síntesis de proteínas, y

3.- La expresión propiamente dicha de los efectos fisiológicos por la presencia de las proteínas inducidas.

En todos los tejidos que responden a esteroides estudiados hasta la fecha, la hormona se ha encontrado unida no-covalentemente a macromoléculas protéicas específicas. Estos receptores han sido objeto de una investigación intensiva en muchos laboratorios. Liao (8), ha obtenido evidencias de que los receptores citoplásmicos para los andrógenos tienen un papel fundamental en la acción biológica de los mismos, al mostrar una gran relación entre la acción biológica de varios andrógenos sintéticos y su afinidad de unión con los receptores citoplásmicos del tejido prostático. Se cree que la retención de los complejos hormona-receptor en los núcleos estimula la síntesis de un mRNA específico, que a su vez regula la síntesis de proteínas en el citoplasma. Los complejos receptor-esteroide pueden influenciar procesos como la activación de la RNA-polimerasa, inactivar represores y

alterar el proceso de transcripción de RNA.

Los receptores de hormonas esteroideas se han estudiado en varios tejidos, como por ejemplo: en endometrio normal y en carcinoma endometrial para progesterona (9), receptores de estrógenos en hipotálamo y utero de hamster (10), receptores para estrógenos en tejido de glándula mamaria normal y neoplásica de ratón (11), receptores de andrógenos en epidídimo de mono rhesus (12), en testículo (13), y próstata de ratas (14).

Puesto que la especie humana es unisexual, el proceso de reproducción se lleva a cabo mediante la unión de las células germinales masculina y femenina, por lo tanto, los procesos de ovulación y espermatogénesis son de gran importancia, ya que de ellos depende la continuidad de nuestra especie y tal vez, el mejoramiento de sus características.

Dado que la próstata es el tejido en el que se efectuó nuestro estudio, haremos una breve descripción de la misma: la próstata es una glándula que suele describirse comparándola a una castaña, por su forma y su volumen, pero es más estrecha en la parte inferior. Rodea a la uretra cuando sale de la vejiga. Está rodeada de una cápsula delgada de tejido conectivo y fibras musculares lisas. El tejido de la próstata es un parénquima constituido por tres tipos de glándulas situadas más o menos concetricamente al rededor de la uretra. La próstata secreta una substancia alcalina y acuosa que forma la mayor parte del líquido seminal. Su alcalinidad ayuda a proteger a los espermatozoides del medio ácido de la ure-

tra masculina y la vagina femenina, protegiendo así su movili
dad.

Los objetivos de éste trabajo son averiguar si en la próstata normal humana existen receptores para andrógenos, similares a los reportados en otras especies, así como a los receptores para estrógenos encontrados en el tracto genital femenino. Caracterizarlos en cuanto a algunas de sus propiedades físicas y químicas, y en sus propiedades de unión a los andrógenos.

2. MATERIAL .

1.- MATERIAL BIOLÓGICO.

Las próstatas fueron obtenidas de pacientes cuya muerte no hubiera sido causada por afecciones de las vías genitourinarias y fueron escogidas de manera que no presentaran hiperplasia; hipertrofia o algún tipo de infección. La edad de los pacientes fluctuó entre los treinta y sesenta años.

2.- MATERIAL QUÍMICO.

Para las electroforésis se utilizaron los siguientes reactivos de Merck: acrilamida, bisacrilamida, alanina, glicina, hidróxido de potasio, persulfato de amonio, riboflavina, sacarosa y ácido tricloro acético; de Eastman N,N, N', N',- tetrametil etilendiamina (TEMED); de Monterrey S.A. ácido acético glacial;

de Sigma Ch. Co. : hidroximetil-amino-metano, sal sódica;
de Dade Harleco: ácido clorhídrico, azul de metileno;
de Carlo Erba: azul de bromofenol;
de Matheson Coleman & Bell: carbón activado Norit A;
de Pharmacia: dextrán T₄₀;
las proteínas albúmina sérica bovina (ASB), (P.M. 67,000),
ovalbúmina (45,000), citocromo C de corazón de caballo (12,
400), quimotripsinógeno A de páncreas de res (25,000), apo-
ferritina de caballo amorfa (480,000), mioglobina de músculo
de ballena (17,800) y globulinas humanas (P.M. promedio 160,
000) utilizadas en la estandarización de la electroforé-
sis de disco en gel de poliari-
lamida se obtuvieron de los labo-
ratorios Mann Research.

Para las incubaciones se utilizaron los esteroides
radiactivos T 1,2-³H, DHT 1,2-³H y A 1,2-³H con actividad
específica de 40 Ci/mM, fueron obtenidos de New England Nu-
clear Co.

Los esteroides no radiactivos; testosterona, dihidro-
testosterona, androstendiona, dehidroepiandrosterona, estro-
na, estradiol, progesterona, 17-hidroxiprogestero-
na, corticoste-
rona y cortisol se obtuvieron de Steraloids Inc. siendo re-
cristalizados antes de su uso.

Disolventes como: éter etílico, metanol, benceno,
acetato de etilo, cloruro de metileno y tolueno en grado ana-
lítico fueron destilados antes de su uso.

Se utilizaron cromatoplacas de sílica gel con fluo-
rescencia a 254 nm. y con 0.25 mm. de espesor de E. Merck.

Los anticuerpos anti-testosterona, anti-dihidrotestosterona, y anti-androstendiona fueron obtenidos en nuestro laboratorio.

Para la solución de centelleo se utilizó 2,5 difeniloxazol y p-bis(2,5 fenil oxazolil) benceno de grado centelleo de Amersham en una concentración de 4 g. y 0.05 g. respectivamente por litro de tolueno.

3.- EQUIPO.

Se utilizó una cámara de electroforésis con su fuente de poder y unidad refrigerante de Buchler Instr. Las centrifugaciones se llevaron a cabo en una centrífuga Damon IEC modelo PR-6000. Para la determinación de proteínas se utilizó un espectrofotómetro Beckman DK-2A. Para el ajuste de pH a las soluciones, se empleó un potenciómetro modelo 3550 de Beckman. La radiactividad fue evaluada en espectrómetro de centelleo líquido de Packard Instr. modelo 3320.

Se emplearon balanzas Mettler modelo P-120, L y B; agitadores por vibración Super Mixer, agitadores magnéticos max/mix de Precision y un horno de presión reducida Thelco - modelo 19.

Para las homogeneizaciones se utilizó un homogeneizador Virtis de Research Equipment.

3. METODOS .

1.- HOMOGENEIZACION.

Las próstatas, perfectamente lavadas con solución Ringer fueron pesadas. Posteriormente se limpiaron del tejido conjuntivo y tejidos adyacentes que pudieran tener y se pesaron nuevamente. De cada próstata limpia se cortó una porción representativa de aproximadamente 5 g. tomando en cuenta la descripción anatómo-histológica que ya fue mencionada.

El corte de próstata se colocó en un vaso de precipitados, se le adicionaron 5 ml. de sol. Ringer y se cortó en trozos pequeños con tijeras de disección. Inmediatamente se le agregaron 20 ml. más de Ringer para homogeneizar.

Después se adicionaron 25 ml. más de sol. Ringer con lo que se obtuvo un homogeneizado al 10% peso/volumen.

Todas las muestras fueron centrifugadas a 2,200xg. durante 15 min. y los sobrenadantes se almacenaron en alícuotas de 5 ml. que fueron congeladas hasta su utilización. Cada muestra fue etiquetada, "homogeneizado", con las claves P₁ a P₈ .

El procesamiento de las muestras fue realizado a 4°C.

2.- DETERMINACION DE PROTEINAS.

Las proteínas fueron determinadas cuantitativamente mediante el método de Lowry (15).

Se hicieron lecturas a 660 nm. y 770 nm. para comprobar la exactitud de las mediciones a las diferentes longitudes de onda. Para esto se preparo una curva tipo de ASB en concentraciones crecientes en intervalos de 10 μ g. hasta 100 μ g.

Para la determinación de las muestras se hicieron diluciones de los homogeneizados hasta 1:100 con el objeto de que algunas de las diluciones quedaran dentro del rango de sensibilidad de la curva patrón.

3.- ESTANDARIZACION DE LA ELECTROFORESIS DE DISCO EN GEL DE POLIACRILAMIDA. (16).

Se utilizaron las siguientes proteínas "puras" químicamente: ASB, citocromo C, quimotripsinógeno, apoferritina, mioglobina, ovalbúmina y globulinas gamma humanas. Se prepararon soluciones de mg/ml y se probaron 50 μ g. y 100 μ g.

de proteína por gel. Se realizaron desarrollos con 0.5, 2 y 5 mA por tubo. Las proteínas se desarrollaron solas y en mezclas, en dos tipos de electroforesis.

La EGPA ácida se aplica a proteínas básicas, las concentra a pH 5 y las separa a pH 3.8 .

La EGPA básica, por el contrario, se aplica a proteínas ácidas, las concentra a pH 8.3 y las separa a pH 9.5 .

Los reactivos empleados fueron los siguientes:

EGPA ácida

Reactivo No. 1

KOH 48.0 ml.

Ac. acético glac. 17.2 ml.

TEMED 4.0 ml.

Se ajusta el pH a 4.3 con

HCl conc. y se afora a 100 ml.

Reactivo No. 2

Acrilamida 30.0 g.

Bisacrilamida 0.8 g.

Se afora a 100 ml.

Reactivo No. 3

Persulfato de amonio .28 g.

Se afora a 100 ml.

Reactivo No. 4

KOH 1N 48.0 ml.

EGPA básica

Reactivo No.1

HCl 48.0 ml.

Tris 36.6 ml.

TEMED 0.23ml.

Se ajusta el pH a 8.9 con

HCl conc. y se afora a 100 ml.

Reactivo No.2

Acrilamida 30.0 g.

Bisacrilamida 0.8 g.

Se afora a 100 ml.

Reactivo No. 3

Persulfato de amonio 0.28 g.

Se afora a 100 ml.

Reactivo No. 4

HCl 1N 48.0 ml.

Ac. acético glac.	2.87 ml.	Tris	5.98 g.
TEMED	0.46 ml.	TEMED	0.46 ml.

Se ajusta el pH a 6.7 con HCl concentrado y se afora a 100 ml.

Reactivo No.5

Acrilamida	10.0 g.
Bisacrilamida	2.5 g.

Se afora a 100 ml.

Reactivo No. 6

Riboflavina	0.004g.
-------------	---------

Se afora a 100 ml.

Reactivo No.5

Acrilamida	10.0 g.
Bisacrilamida	2.5 g.

Se afora a 100 ml.

Reactivo No. 6

Riboflavina	0.004g.
-------------	---------

Se afora a 100 ml.

Reactivo No. 7

Sacarosa	40.0 g.
----------	---------

Se afora a 100 ml.

Amortiguador para la cámara:

β alanina	31.2 g.
Ac. acético glac.	8.0 ml.

Se ajusta el pH a 5 y se afora a 1000 ml. Para utilizar se se diluye 1:10

Amortiguador para la cámara:

Tris	6.0 g.
Glicina	28.8 g.

Se ajusta el pH a 8.3 y se afora a 1000 ml. Para utilizarse se diluye 1:10

Cada tubo de electroforésis estaba compuesto por tres secciones denominadas: gel muestra, por ser el gel en el cuál estaba contenida la muestra; gel espaciador, debido

a que las características del gel (T= 5.0 y C= 2.5), permiten que las proteínas se "organizen" en cuanto a peso molecular y carga; y el gel separador (T = 7.7 y C = 2.5), que es el gel en el cuál las proteínas migran a una velocidad x dependiendo de sus características fisicoquímicas.

La formulación de los geles fue la siguiente:

EGPA ácida

Gel separador

- 1 parte del reactivo No. 1
- 2 partes del reactivo No. 2
- 4 partes del reactivo No. 3
- 1 parte de agua

Gel espaciador

- 1 parte del reactivo No. 4
- 2 partes del reactivo No. 5
- 1 parte del reactivo No. 6
- 4 partes de agua

Gel muestra

- 1 parte del reactivo No. 4
- 2 partes del reactivo No. 5
- 1 parte del reactivo No. 6
- 2 partes de agua

EGPA básica

Gel separador

- 1 parte del reactivo No. 1
- 2 partes del reactivo No. 2
- 4 partes del reactivo No. 3
- 1 parte de agua

Gel espaciador

- 1 parte del reactivo No. 4
- 2 partes del reactivo No. 5
- 1 parte del reactivo No. 6
- 4 partes del reactivo No. 7

Gel muestra

- 1 parte del reactivo No. 4
- 2 partes del reactivo No. 5
- 1 parte del reactivo No. 6
- 2 partes del reactivo No.7

Los reactivos números 1 y 4 de ambos tipos de EGPA son utilizados como amortiguadores en el gel; los números -

2 y 5 son los que dan la consistencia al gel, es decir, su tamaño de poro; los reactivos número 3 y 6 son los catalizadores de la polimerización, el número 3 es un catalizador químico y el número 6 es un fotocatalizador. El reactivo número 7 de la EGPA alcalina se utiliza como protector de las -- proteínas.

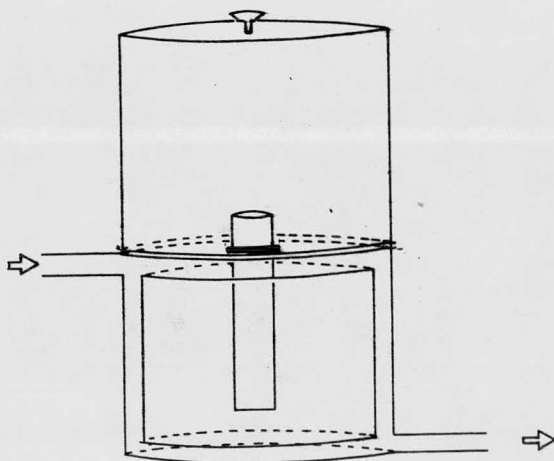
Cómo ya se mencionó, las concentraciones de acrilamida y bisacrilamida utilizadas en el gel separador producen un gel al 7.7% con un entrecruzamiento del 2.5%. Este gel fue empleado por considerar el tamaño del poro adecuado a las necesidades del experimento. La manera de calcular esas concentraciones fue la siguiente:

$$T = \frac{\text{acrilamida} + \text{bisacrilamida}}{100} \quad C = \frac{\text{bisacrilamida} \times 100}{T}$$

Para ambos casos de EGPA , los tubos en los que se realizó el desarrollo electroforético se llenaron con 1.5 ml. de la solución del gel separador y se estratificó agua en la parte superior del gel para que éste adquiriera una superficie plana, aproximadamente 20 min. después, se consideró que la gelificación se había realizado, se quitó el agua y se enjuagó con solución del gel espaciador, una vez seco el tubo se agregaron 100 μ l. del gel espaciador y se trató de la misma forma que el separador para obtener la superficie superior plana. Debido a que éste gel tiene como catalizador riboflavina se expone a la luz durante 15 minutos. Una vez terminada la gelificación se seca, se agrega la muestra y sobre

ella el gel muestra. Para obtener el mismo efecto de la superficie plana se le puso una perlitita de agua y se colocó nuevamente a la luz para efectuar la fotopolimerización.

Los tubos fueron colocados en la cámara superior, en la inferior se tiene la solución amortiguadora que se mantiene a 4°C. debido al agua de refrigeración que pasa a través de la doble pared de la misma. La cámara superior se cubre con la misma solución buffer. Es de hacer notar que mientras más superficie de los tubos esté en contacto con el amortiguador frío menos variaciones de temperatura habrá en el gel durante el desarrollo de la electroforésis. Esto se muestra esquemáticamente en la siguiente figura:



Para poder observar el desarrollo de la electroforésis se agregaron unas gotas de solución alcohólica de azul de bromofenol al 0.001% en el caso de EGPA alcalina y de solución acuosa al 0.005% de azul de metileno en el caso de -

EGPA ácida; estas soluciones nos indican el avance del frente iónico.

Para la estandarización se utilizaron 50 μ l. y 100 μ l. de soluciones de proteínas puras en una concentración de mg./ml. Se realizaron desarrollos utilizando 0.5, 2 y 5 mA por tubo a 4°C. y llevando el frente iónico entre 3 y 5 mm. del borde inferior del tubo. La fijación de las proteínas se hizo mediante su precipitación en TCA al 10% durante 60 minutos. Para la tinción de las mismas se ensayaron concentraciones del 1% y 0.1% de Negro de Amido en ácido acético al 7% en tiempos de 1 a 24 hrs. Para la decoloración del gel se utilizó ácido acético al 7% en cambios sucesivos hasta obtener un fondo transparente.

Una vez establecidas las condiciones de desarrollo, se hicieron electroforesis de prueba con la muestra incubada con el esteroide radiactivo, para lo cuál se prepararon las siguientes:

4.- INCUBACIONES.

En tubos de 10 x 75 mm. se pusieron aproximadamente 4×10^5 dpm de DHT ^3H , y en otros tubos T ^3H .

Se evaporó a sequedad, pues el esteroide se encontraba en solución alcohólica, y se agregaron 500 μ l. del homogeneizado. Se incubaron a 4°C. durante 18 hrs. Al terminar el periodo de incubación se adicionaron 100 μ l. de una suspensión de 0.125 g. de carbón activado y 0.125 g. de dextrán T₄₀ en 100 ml. de agua, y se centrifugó a 10°C. durante

15 min. a 2,200 xg. Del sobrenadante se tomaron 100 μ l. - para cada gel.

Una vez terminada la electroforésis, se sacaron los geles de los tubos, se midieron las distancias migradas por el frente iónico y las bandas visibles. Cada muestra fue corrida por duplicado. Uno de los geles fue teñido y el otro congelado para cortarlo "en rebanadas" homogéneas. Las rebanadas fueron colocadas, una por una, en viales de conteo, se les agregó 5 ml. de líquido de centelleo y se contó la radiactividad presente. La eficiencia del corte de los geles y la eficiencia de conteo fue calculada mediante la preparación de los siguientes geles: se preparó solución de gel espaciador a la que se le adicionó esteroide marcado en cantidad suficiente para obtener 4×10^3 dpm por rebanada. Se prepararon tres geles de los cuales uno se cortó inmediatamente después de haber terminado la electroforésis, otro se rodó sobre hielo seco y fue cortado, el tercero fue congelado durante dos horas y posteriormente cortado.

5.- RADIOINMUNOANÁLISIS.

A cada homogeneizado se le efectuó una determinación cuantitativa de testosterona, dihidrotestosterona y androstendiona, mediante radioinmunoanálisis.

Se tomaron 1 y 2 ml. de alícuota de cada homogeneizado y se le agregaron 4×10^3 dpm de testosterona, dihidrotestosterona y androstendiona, tomándose las mismas alícuotas de radiactividad en viales de conteo para cada esteroide, con

lo cuál se obtuvo el control de radiactividad puesta y poder corregir, al final, las pérdidas ocurridas durante el procesamiento de las muestras. Para la extracción de los esteroides se agregaron, a cada muestra, 10 ml. de éter etílico, - se congeló la fase acuosa en una mezcla de hielo seco-acetona, se decantó la fase orgánica y se evaporó a sequedad bajo corriente de aire en baño de agua a 30°C.

El residuo obtenido se resuspendió en una mezcla de éter etílico-metanol 2:1 y se aplicó en una cromatoplaca de sílica gel que previamente fue desarrollada, en forma ascendente, con una solución metanólica de EDTA 2mM y posteriormente en éter etílico; una vez aplicada la muestra se corrió en benceno-metanol 95:5 dos veces. Se aplicaron así mismo 2 μ g. de cada esteroide para utilizarlos como referencias. Una vez desarrollada la placa se revelaron los patrones de - testosterona y androstendiona con luz U.V. y la dihidrotestosterona mediante la reacción de Zimmerman.

Se marcan las zonas correspondientes a los esteroides y se desprende la sílica en un área de 1 cm. hacia arriba y hacia abajo de la marca. El desprendimiento de la sílica se realizó mediante succión a través de una pipeta Pasteur previamente empacada con fibra de vidrio.

Los esteroides fueron eluidos de la sílica gel mediante 1.1 ml. de éter- metanol 9:1 y del eluido se tomaron dos alícuotas: una para recuperación que fue transferida a - un vial para conteo de radiactividad, con lo cuál se obtienen las pérdidas del trazador durante la extracción y la pu-

rificación; y la segunda alícuota se colocó en un tubo de ensayo y se evaporó a sequedad para proceder al análisis.

Para efectuar el análisis fue necesario preparar curvas patrón de cada esteroide por cuantificar. Se pusieron los siguientes puntos: 0 pg., 5 pg., 10 pg., 25 pg., 50 pg., 100 pg., 250 pg., 500 pg., 1000pg., y 2500 pg. de cada esteroide por triplicado. Estos esteroides no son radiactivos. Los anticuerpos contra cada esteroide fueron disueltos en una proporción de 1:8,000 con una solución amortiguadora de fosfatos 0.25M conteniendo azida de sodio y gelatina, ambas al 1% y con un pH de 7.0. A estas soluciones se les agregó, aproximadamente, 4×10^4 dpm del esteroide radiactivo correspondiente por cada 500 μ l. de solución, que es la cantidad que se agregó a cada tubo, fuera de muestra o de la curva. Los tubos se agitan 1 minuto y se incuban a 4°C. durante 18 hrs.

Después de la incubación se les adicionó 100 μ l. de una suspensión de carbón-dextrán, se agitaron, se centrifugaron durante 15 min. a 650 xg., el sobrenadante se decantó a viales de conteo, se adicionó el líquido de centelleo y se contó la radiactividad presente.

Con los resultados obtenidos del espectrómetro de centelleo líquido, se calcularon los porcentajes de unión de las curvas de referencia y en ellos fueron interpolados los datos de las muestras, obteniéndose una cantidad en masa que fue corregida con los datos de la alícuota de recuperación para obtener la masa la masa inicial total presente en la a-

lícuota del homogeneizado.

6.- FRACCIONAMIENTO SALINO. (17).

Se preparó una poza con todas las muestras para efectuar un fraccionamiento de las proteínas por medio de una precipitación con sulfato de amonio, para ésto se adicionó el sulfato en cantidades tales que sus concentraciones finales aumentarían en intervalos de 5% desde 0 a 100% de saturación. La poza de homogeneizados fue colocada en un baño de hielo y para cada concentración se agitó hasta la total disolución del sulfato de amonio y treinta minutos más para lograr la máxima precipitación. Inmediatamente fue centrifugada a 2,200 xg. durante 15 min. y a 4°C. El paquete de proteínas precipitadas que se obtuvo por este procedimiento fue resuspendido en un ml. de solución salina 0.015M de pH 7.4. Cada fracción fue dializada contra solución Ringer pH 7.4

7.- DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE LA PROTEINA. (18).

Para determinar la concentración de sitios activos de la proteína se preparó una incubación de 100 μ l. de la poza de homogeneizados con cantidades variables de radiactividad, (de 4,000 a 3,200,000 dpm), se trató con la suspensión de carbón dextrán y se centrifugó 15 min. a 2,200 xg. a 4°C.

8.- DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD. (19).

Se incubaron 40,000 dpm de DHT 3 H, 200 pg. de dihidrotestosterona no marcada, 200 pg. del esteroide a probar y

500 μ l. del homogeneizado. Se trató con la suspensión de carbón-dextrán.

4. RESULTADOS .

Durante la estandarización del método de determinación de proteínas se hicieron lecturas a 660 y 770 nm. como lo indica el artículo original. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, por lo que para las muestras se realizaron determinaciones sólo a 660 nm. La variación máxima de la curva patrón fue de 4%, la pendiente de la misma al expresar la concentración de proteínas con respecto a la densidad óptica fue de $200.38 \mu\text{g.}/\text{D.O.}$ con un coeficiente de regresión 0.9984 considerando todos los puntos. Las diluciones cuyas lecturas quedaron dentro de los límites de sensibilidad de la curva fueron 1:10 y 1:100. Los resultados se muestran en la siguiente tabla y las curvas en las figuras 3 y 4 .

CURVA PATRÓN DE A.S.B. (LOWRY) 660 nm.

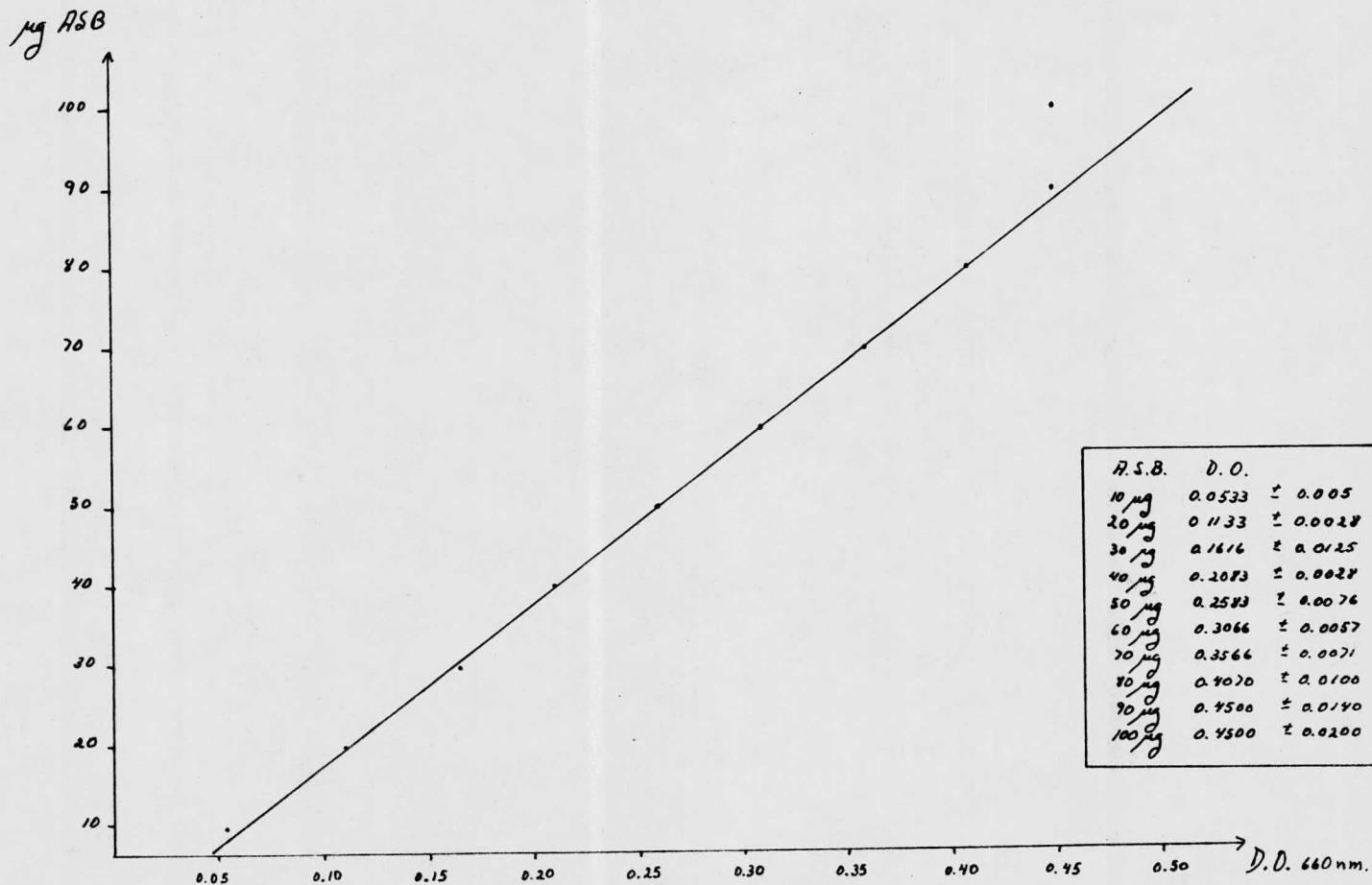


FIG. 3

CURVA PATRÓN DE HSB (LOWRY) 770 nm.

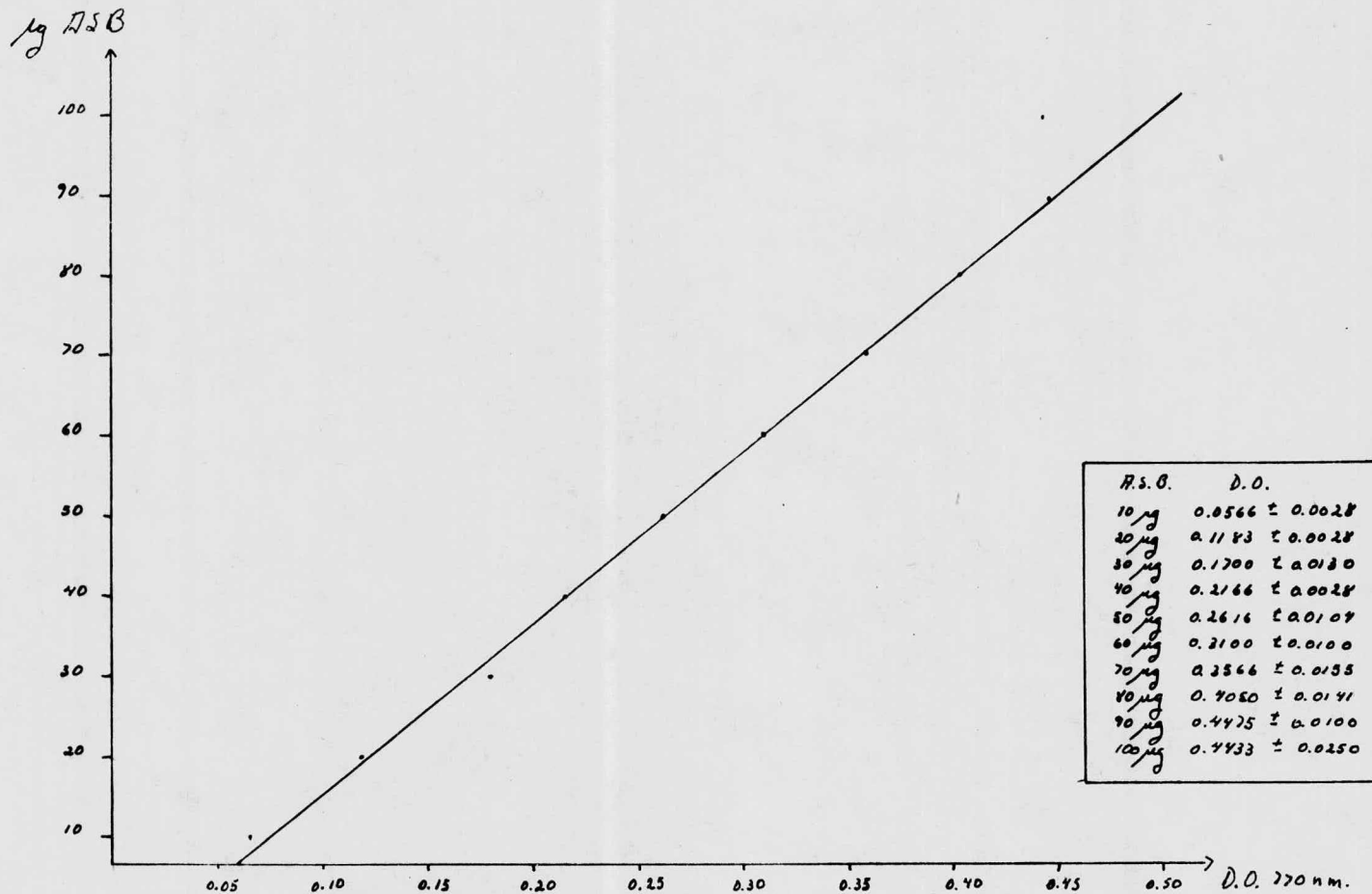


FIG. 4

Cuantificación de proteínas.

Método de Lowry, lecturas a 660 nm., curva patrón de ASB de 10 a 100 μg ., coeficiente de variación máxima 4%, coeficiente de regresión 0.9984.

Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra
P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	P ₈
Hom.tot	Hom.tot	Hom.tot	Hom.tot	Hom.tot	Hom.tot	Hom.tot	Hom.tot
$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
2.21	3.63	1.45	3.68	2.61	2.93	2.88	2.84
Promedio	2.8025	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$.	C.V.	26.11%			
Poza	2.5000	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$.	C.V.	5.00%			

La muestra con mayor concentración de proteínas fue P₄ y la de menor concentración fue P₃. Es de hacer notar que la concentración promedio de las muestras tiene una variación muy amplia (26.11%), sin embargo, el valor obtenido para la poza de homogeneizados es muy similar al valor promedio mencionado.

Para el desarrollo de las EGPA's. concideramos que las condiciones más adecuadas fueron: en geles con T = 7.7% y C = 2.5%, con una intensidad de corriente de 5 mA por tubo y a 4°C.

Los resultados de la estandarización de la electroforésis, tanto ácida como básica, de las proteínas patrón se muestran en seguida.

EGPA alcalina:

albúmina sérica bovina:

1.- Banda fuerte de 0.72 a 0.75	Rf	0.733	B.P.
2.- Banda media de 0.43 a 0.48	"	0.453	
*3.- Banda media de 0.25 a 0.29	"	0.272	

mioglobina:

*1.- Banda débil de 0.67 a 0.68	"	0.676	
*2.- Banda débil de 0.53 a 0.55	"	0.536	
3.- Banda débil de 0.45 a 0.49	"	0.465	
4.- Banda débil de 0.42 a 0.45	"	0.433	
5.- Banda fuerte de 0.34 a 0.37	"	0.351	B.P.
6.- Banda fuerte de 0.17 a 0.23	"	0.197	

ovalbúmina:

1.- Banda fuerte de 0.82 a 0.85	"	0.84	
2.- Banda fuerte de 0.79 a 0.83	"	0.815	B.P.
3.- Banda media de 0.74 a 0.77	"	0.75	
4.- Banda débil de 0.67 a 0.71	"	0.68	
*5.- Banda débil de 0.60 a 0.62	"	0.607	
6.- Banda débil de 0.27 a 0.29	"	0.28	
7.- Banda media de 0.25 a 0.27	"	0.264	

gamma globulinas:

1.- Banda única tenue de 0.08 a 0.09	Rf	0.083	
--------------------------------------	----	-------	--

apoferritina:

- 1.- Banda barrida desde el origen hasta 0.1 \overline{Rf} 0.076

citocromo C:

No presenta bandas en éste tipo de EGPA.

quimotripsinógeno:

No presente bandas en éste tipo de EGPA.

EGPA ácida:

albúmina sérica bovina:

- 1.- Banda ancha fuerte de 0.4 a 0.43 \overline{Rf} 0.425 B.P.
- 2.- Banda ancha media de 0.35 a 0.37 " 0.365

mioglobina:

- 1.- Banda fuerte de 0.87 a 0.97 " 0.917 B.P.
- *2.- Banda débil de 0.70 a 0.74 " 0.72

ovalbúmina:

- 1.- Banda fuerte y estrecha de 0.48 a 0.49 \overline{Rf} 0.485
- 2.- Banda fuerte y ancha de 0.45 a 0.47 \overline{Rf} 0.458 B.P.

gamma globulinas:

- 1.- Banda fuerte de 0.22 a 0.29 \overline{Rf} 0.268 B.P.

apoferritina:

No presenta bandas en este tipo de EGPA.

citocromo C:

1.- Banda fuerte de 1.02 a 1.11
R_f 1.04 B.P.

quimotripsinógeno:

1.- Banda fuerte de 0.66 a 0.69 " 0.678 B.P.

2.- Banda media fuerte de 0.61 a 0.65 " 0.631

* Banda que no siempre aparece.

Estos resultados se ilustran en las figuras 5 y 6.

Una vez estandarizado el método para la electroforesis de las proteínas patrón, se hizo lo mismo con los homogeneizados de próstata, obteniéndose las bandas que se muestran en la figura 7.

Obtenido el patrón electroforético de las muestras se procedió a localizar la proteína "receptora de andrógenos", para lo cual se preparó la siguiente incubación: una muestra elegida al azar, (P_g), se centrifugó a 650 xg., 2200 xg y - 4500 xg. durante 15 min. a 4°C. obteniéndose los sobrenadantes clasificados como P_g, P_g' y P_g" respectivamente. De cada sobrenadante se tomaron dos alícuotas y se incubaron con DHT ⁵II y T ³II. De las incubaciones de cada esteroide se tomaron nuevamente dos alícuotas, de la primera se hizo inmediatamente una EGPA y la otra fue tratada con una suspensión de

ESTANDARIZACION DE LAS PROTEINAS PATRON EN EGPA ALCALINA

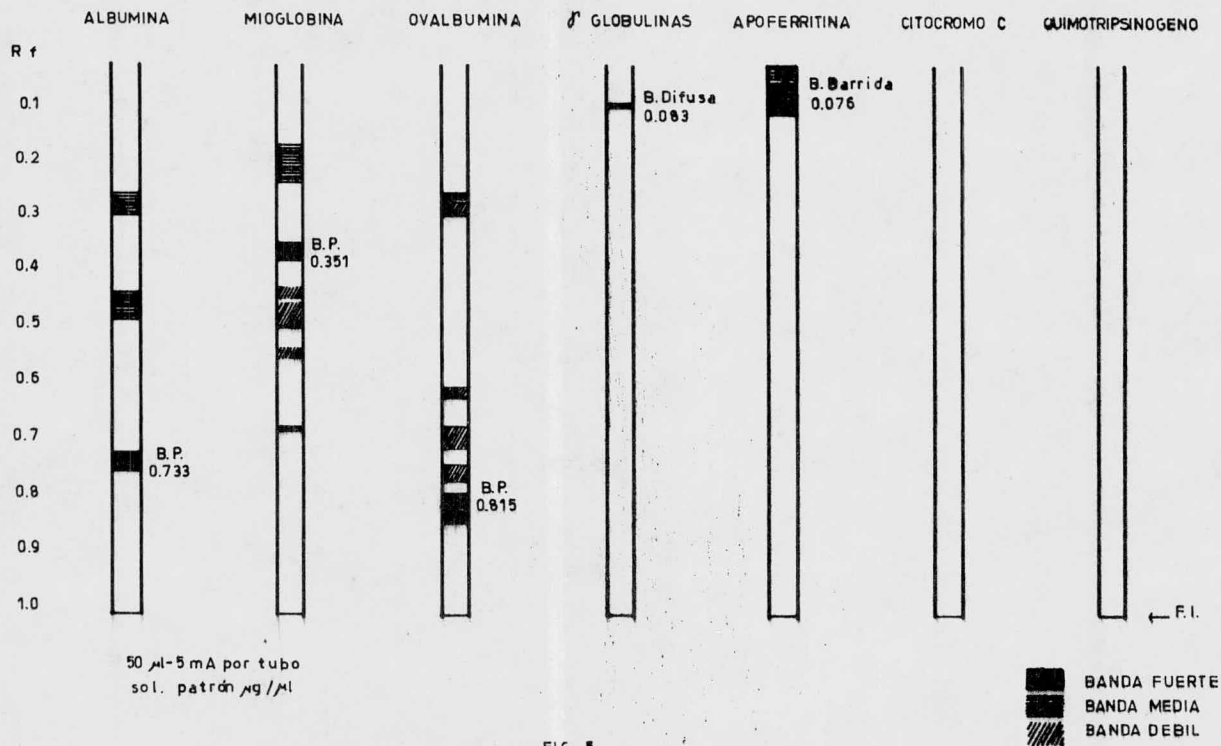
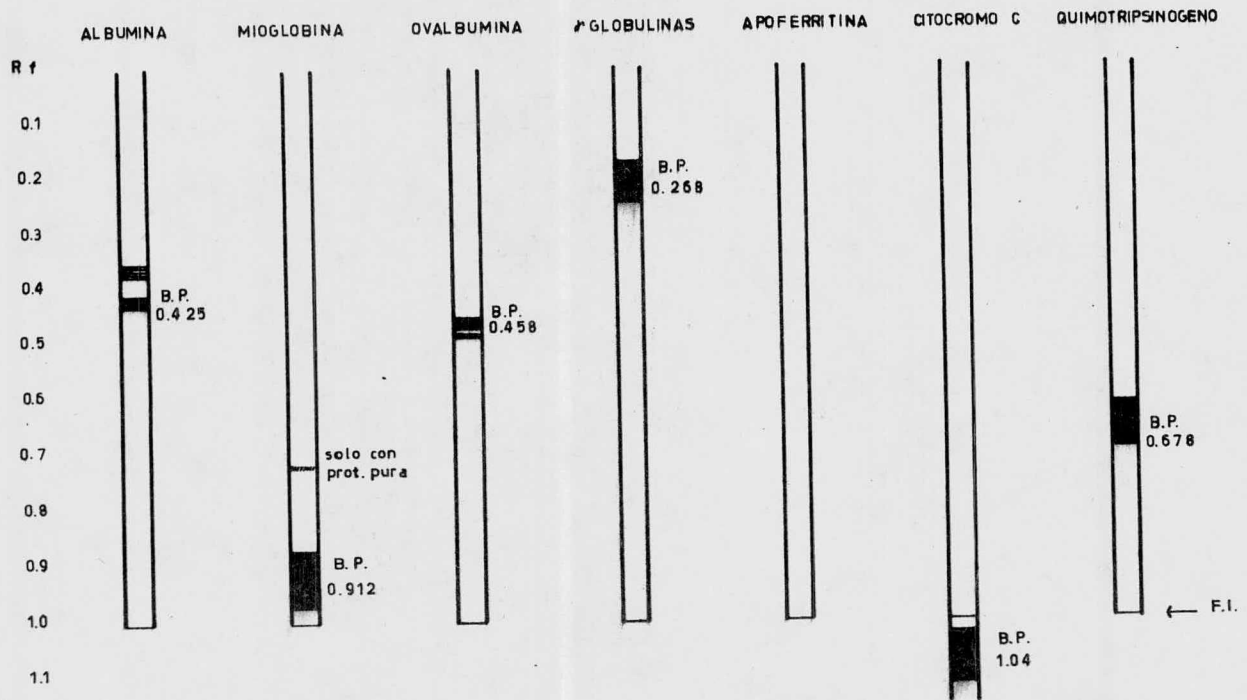


FIG. 5

ESTANDARIZACION DE LAS PROTEINAS PATRON EN EGPA ACIDA



50 μ l-5mA portubo
sol. patrón μ g/ μ l




 BANDA FUERTE
 BANDA MEDIA
 BANDA DEBIL

FIG. 6

ESTANDARIZACIÓN DE LOS HOMOGENIZADOS DE PRÓSTATA EN TGPAL ALCALINA

50 μ l 5 mR/TUBO

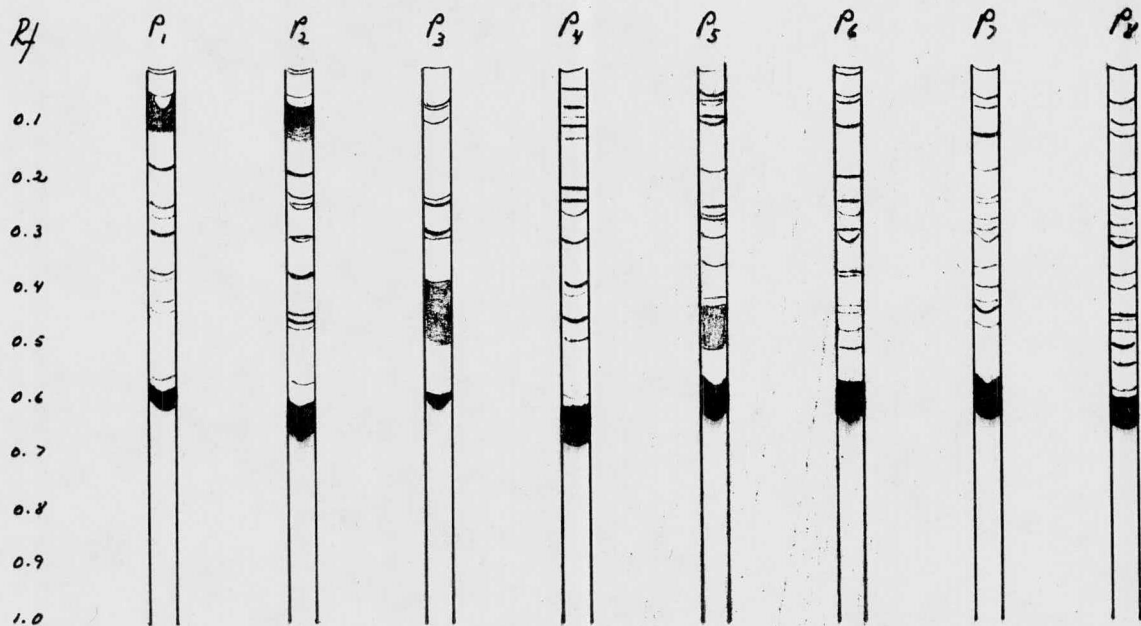


FIG. 7

carbón-dextrán T_{40} y posteriormente se efectuó la electroforesis.

En la gráfica 8 se muestran los resultados obtenidos en EGPA alcalina, y los resultados del tratamiento de los homogeneizados con la suspensión de carbón-dextrán.

Al analizar la EGPA ácida no encontramos áreas de acúmulo de radiactividad "unida" significativamente, (picos de radiactividad), por lo que sólo ilustramos una gráfica, (figura 9), al expresar los resultados obtenidos en la EGPA alcalina sí encontramos "picos" significativos notando además que la DIT 3H se une con mayor eficiencia que la T^3H y que esos "picos" de acúmulo de radiactividad se ven incrementados conforme disminuye la concentración de proteínas de la muestra ($P_8'' > P_8' > P_8$). Se observa también que la DIT 3H permanece unida después del tratamiento con la suspensión de carbón-dextrán, mientras que la T^3H se elimina notablemente. En todas las muestras se encontraron "picos" de radiactividad constantes a R_f de 0.09, 0.174, 0.26, 0.62, y 1.0 .

Posteriormente se efectuaron las EGPA alcalinas de todas las muestras incubadas y tratadas de la manera que ya se describió y los resultados se muestran en las gráficas 10 y 11.

En éstas gráficas podemos observar nuevamente, en todas las muestras, los "picos" de radiactividad localizados anteriormente en la muestra P_8 y su permanencia después del tratamiento con la suspensión de carbón-dextrán y valores de R_f similares en todos los casos.

GRAFICAS DE LA LOCALIZACION ELECTROFRETICA DE LA RADIATIVIDAD CON DHT- ^3H
 Y ^3H EN EGPA ALCALINA DE LAS MUESTRAS P_8 , P_8' Y P_8''

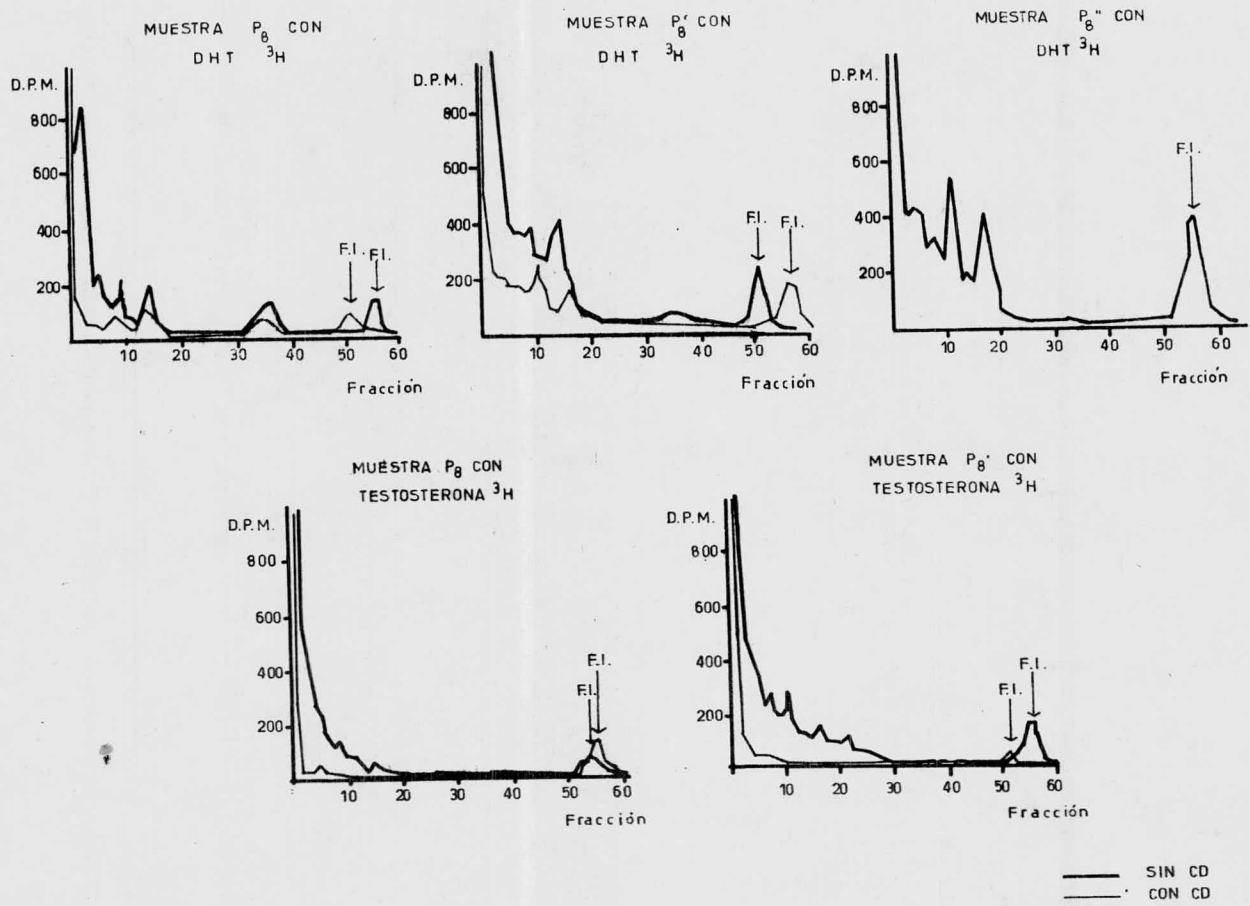


FIG. 8

GRAFICA DE LA LOCALIZACION ELECTROFORETICA DE LA RADIOACTIVIDAD COMO
DHT ^3H EN EGPA ACIDA DE LA MUESTRA P₈

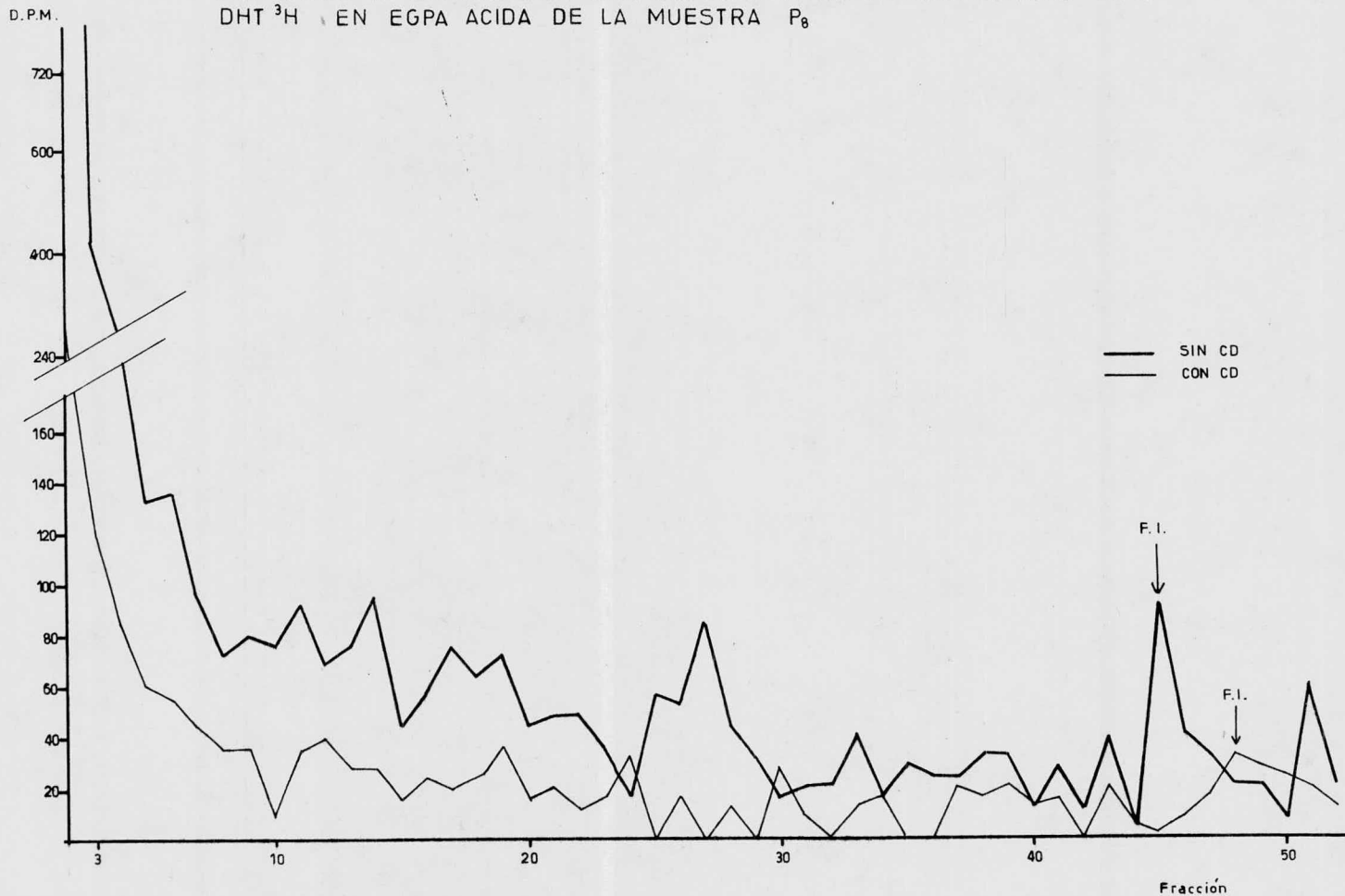


FIG. 9

GRAFICAS DE LA LOCALIZACION ELECTROFORETICA DE LA RADIOACTIVIDAD COMO DHT ^3H
 EN EGPA ALCALINA DE LAS MUESTRAS P_1 , P_2 , P_3 Y P_4

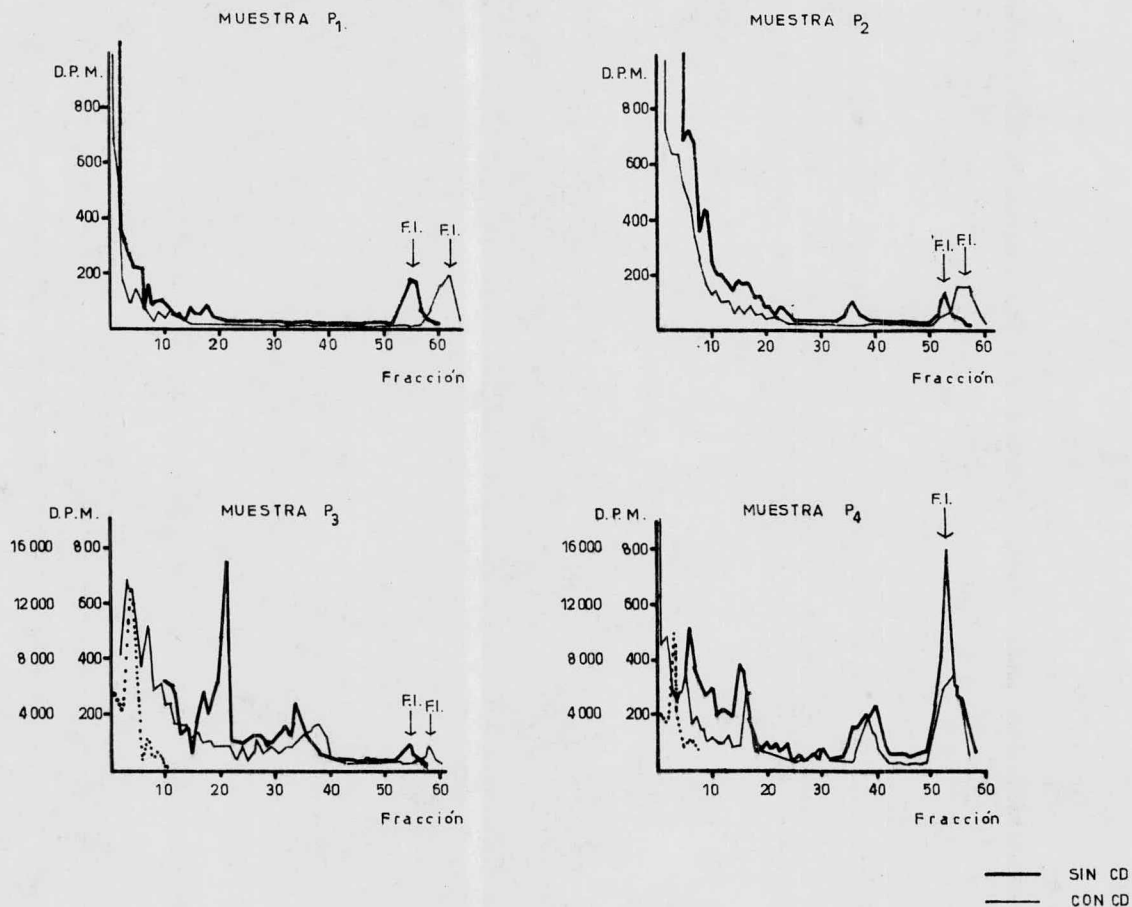


FIG. 10

GRAFICAS DE LA LOCALIZACION ELECTROFORETICA DE LA RADIOACTIVIDAD COMO DHT ^3H
EN EGPA ALCALINA DE LAS MUESTRAS P₅, P₆ Y P₇

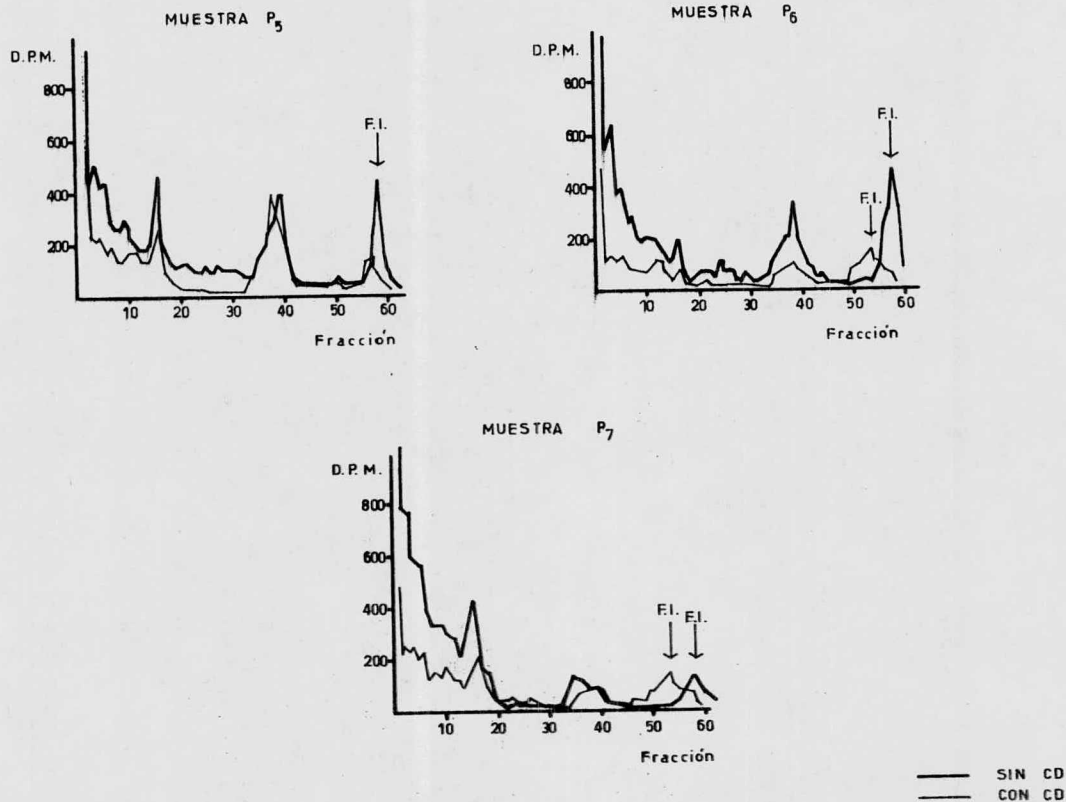


FIG. 11

Puesto que la captación del esteroide marcado está en función de la concentración endógena del mismo, se efectuó una determinación por radioinmunoanálisis para conocer ésta concentración.

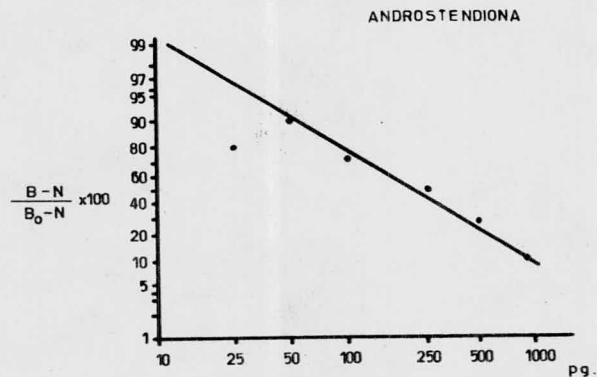
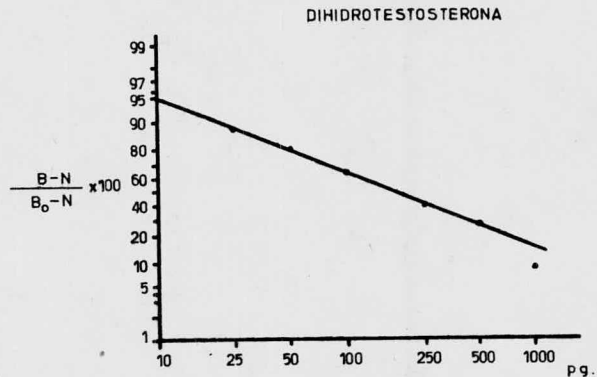
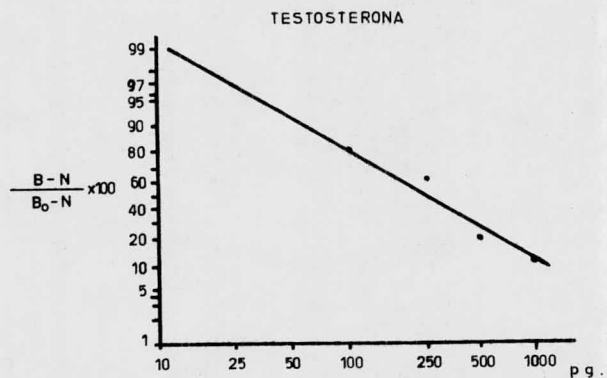
Se prepararon curvas tipo para testosterona, dihidrotestosterona y androstendiona con un límite de sensibilidad de 10 a 1,000 pg. , obteniéndose valores menores de 5 pg. de esteroide endógeno por ml. de homogeneizado para todas las muestras y las tres hormonas cuantificadas. Las curvas patrón se muestra en la figura 12.

Después se efectuó una purificación parcial del "receptor" para lo que se hizo una poza de homogeneizados y se sometió a un fraccionamiento salino con sulfato de amonio, según se describió en la sección de métodos. Cada fracción obtenida fue dializada contra solución Ringer e incubada con el esteroide radiactivo y sometida a EGPA básica. Los resultados se muestran en las gráficas 13, 14 y 15, pudiendo observarse fácilmente que en el precipitado de proteínas obtenido a las concentraciones de 65% de sulfato, 70% y 80% aparece un "pico" con un alto índice de radiactividad.

Para conocer la concentración de sitios activos de la proteína receptora se hizo una determinación de la unión del esteroide a la proteína manteniendo su concentración constante y variando la concentración del esteroide marcado. Los resultados se expresaron en una gráfica de proporciones. En la figura 16 se muestra dicha gráfica.

Por último, se hizo la determinación de la especi-

CURVAS PATRON DE RADIOINMUNOANALISIS.



B = UNIDO
 N = UNIDO NO ESPECIFICO.
 B₀ = UNIDO A LA CONCENTRACION REAL DE MASA

FIG. 12

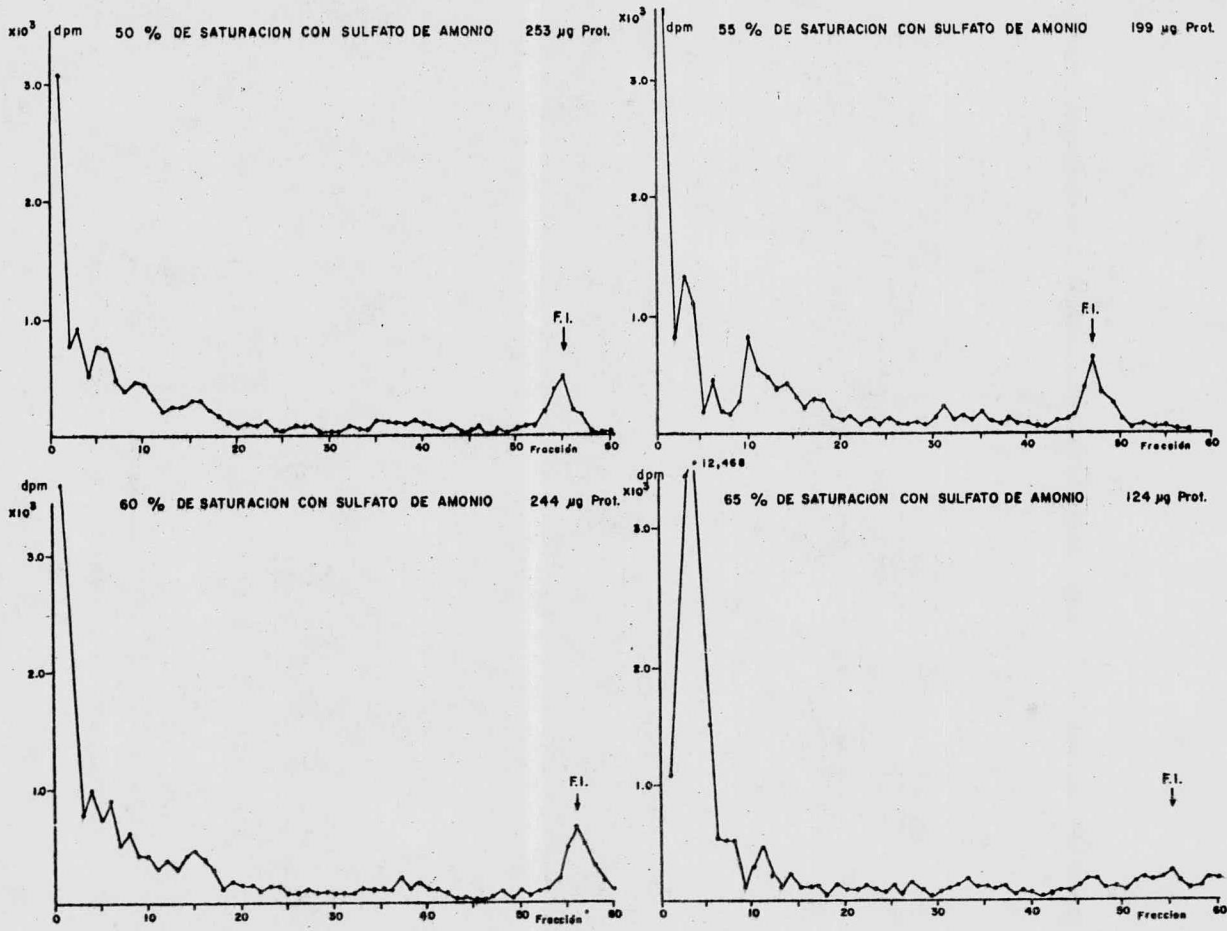


FIG. 13

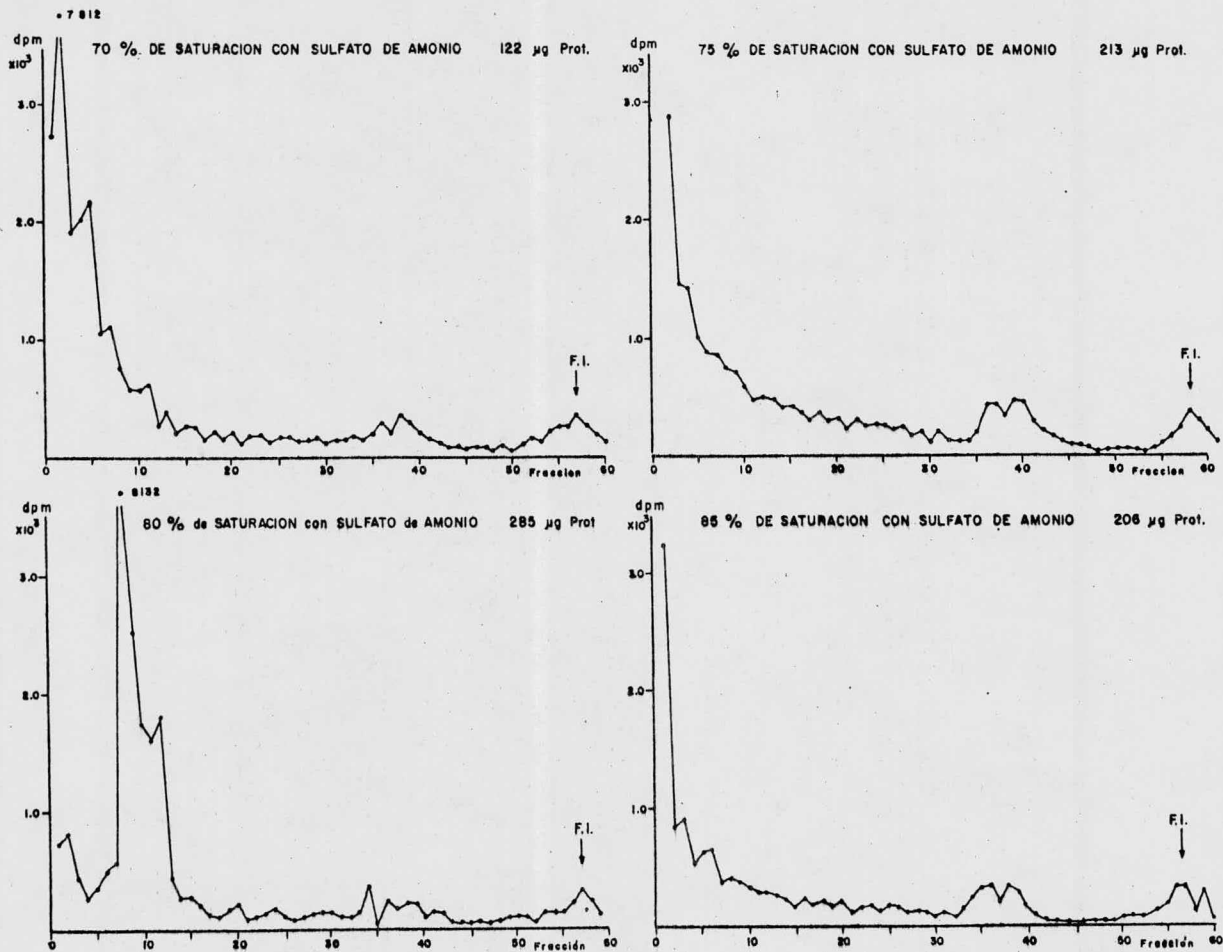


FIG. 14

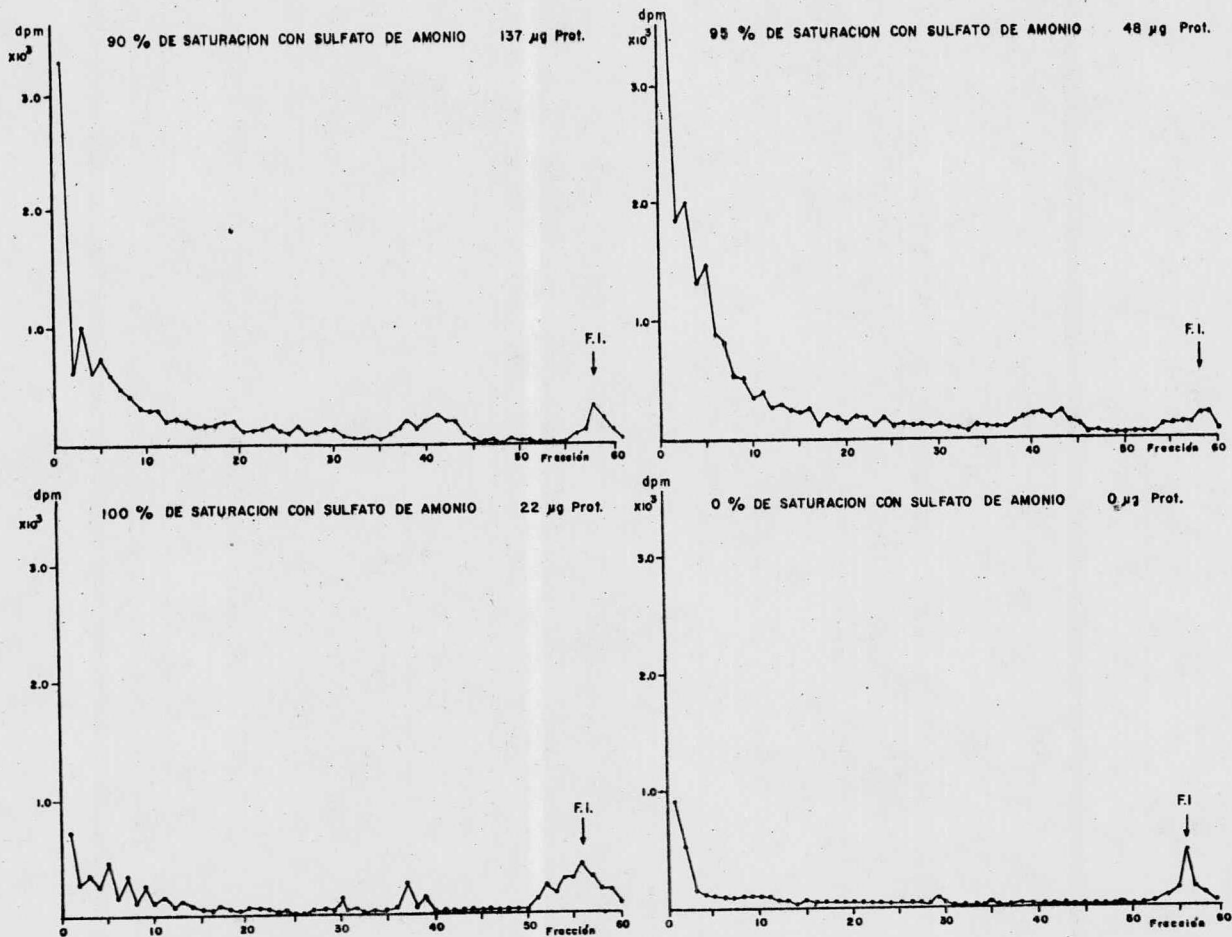


FIG. 15

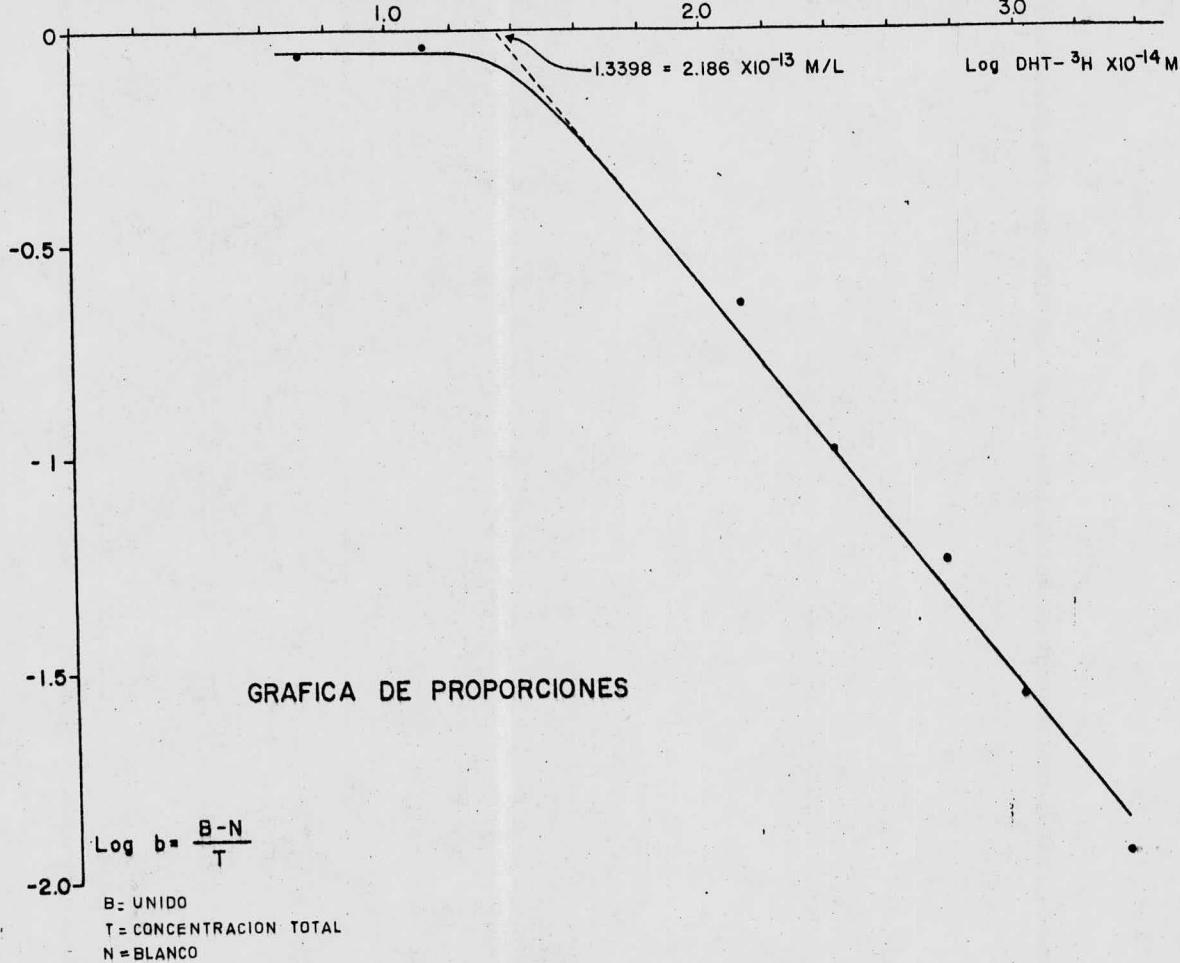


FIG. 16

ficidad de la protefna y los resultados se muestran a conti-
nuación:

5 α dihidrotestosterona	100 00%
Testosterona	4.60%
Androstendiona	4.00%
Dehidroepiandrosterona	0.90%
Progesterona	0.30%
17 - hidroxiprogesterona	0.30%
Corticosterona	0.20%
Cortisol	0.10%
Estrona	0.10%
Estradiol	0.10%

5. D I S C U S I O N .

Para la estandarización del método de electroforesis se utilizaron proteínas químicament puras, ya que su criterio de pureza mínimo fue de dos recristalizaciones, sin embargo el desarrollo en EGPA mostró que no eran pura electroforéticamente, por lo que se tomó como banda principal la de mayor intensidad.

La estandarización del método electroforético para las muestras fue satisfactoria ya que, como se puede observar en la gráfica 7 , se obtuvieron bandas de proteína perfectamente definidas y reproducibles. Es de hacer notar que la banda principal, en concentración, en la EGPA de las muestras fue la de la albúmina a un R_f promedio de 0.6 . Debido a que la testosterona y la dihidrotestosterona son los andrógenos por excelencia, fueron probados ambos para localizar

el receptor de la hormona que, presumiblemente, actúa en el tejido prostático. Como se puede observar en la figura 8, al expresar gráficamente los datos obtenidos de la EGPA alcalina de la muestra prostática incubada con DHT ^3H , se encontraron zonas de unión a R_f de 0.09, 0.174, 0.26, 0.62 y 1.0 lo que nos muestra una unión significativa del esteroide radiactivo. Los picos con R_f de 0.09, 0.174 y 0.26 persistieron a través de los pasos de centrifugación y después del tratamiento con la suspensión de carbón-dextrán. También se puede observar, en la misma gráfica, que a R_f de 0.62, correspondiente a la banda de albúmina, existe lo que podría llamarse "unión inespecífica" de la marca, la cuál baja notablemente después del tratamiento con carbón-dextrán. Esto mismo sucede con la marca dada por testosterona, es decir, la poca captación del esteroide por las proteínas del homogeneizado desarrolladas en la EGPA, desaparece con el tratamiento con el carbón-dextrán. De estos hechos podemos decir que se observa una mayor afinidad del receptor por la dihidrotestosterona sobre la testosterona. En la misma gráfica se observa que al utilizar muestras con menor contenido de proteínas, es decir, obtenidas de una centrifugación a mayor velocidad, se obtiene una mayor captación de la marca, debida, obviamente, a la menor interferencia por la unión inespecífica a otras proteínas.

En todas las gráficas mostradas se observa un pico radiactivo en el frente iónico debido a un ligero arrastre del esteroide por el frente iónico. Esto se puede probar fácilmente en la gráfica 15 donde se muestra un desarrollo e-

lectroforético a una muestra sin proteínas.

Otro aspecto interesante fue el no detectar, prácticamente ninguno de los tres andrógenos, (testosterona, dihidrotestosterona y androstendiona), probados a través del RIA. Consideramos que fue debido a que las próstatas se obtuvieron de cadáveres con po lo menos, 8 horas de muerte, - puesto que es el tiempo mínimo legal requerido para la realización de la autopsia. Sin embargo la muerte clínica considerada como el cese de la actividad cerebral, de ningún modo es el término de otros procesos metabólicos, para nuestro caso creemos que continuó el metabolismo del complejo receptor-esteroide sin reposición de la hormona dando por resultado - que el esteroide endógeno fuera muy difícil de cuantear.

Los datos obtenidos del fraccionamiento salino con sulfato de amonio nos llevan a pensar que se puede tratar de un receptor formado por tres estructuras protéicas diferentes o que , en función de sus R_f (0.08, 0.18 y 0.26, casi múltiplos de 0.08), sean formas de agregación del receptor. El - hecho de que precipite a una "alta" concentración de sulfato de amonio nos indica que esta estructura proteica contiene - numerosas cargas, lo que va de acuerdo con las características de una molécula transportadora. Además es una proteína bastante específica pues, como se observa en la tabla de especificidad, une con gran preferencia a la dihidrotestosterona sobre la testosterona, siendo que entre ambas sólo existe una mínima diferencia estructural dada por un par de hidrógenos. El analizar la gráfica de proporciones nos muestra que

se trata de una s3la prote3na receptora pues s3lo se observa una pendiente en la curva, en caso de que fueran tres estructuras prot3icas diferentes obtendr3amos tres variaciones en la pendiente de la curva de dicha gr3fica.

6 . C O N C L U S I O N .

Existe una proteína receptora en el tejido próstático normal humano, que tiene la capacidad de unir dihidrotestosterona, la cuál precipita entre el 65 y 80% de saturación con sulfato de amonio, que es altamente específica y se encuentra en una concentración sumamente pequeña.

B I B L I O G R A F I A .

- 1.- Greep R.O.- The spermatogenic and secretory function of the gonads of hypophysectomized adults rats treated with pituitary FSH and LH. .- Endocrinology 21:611-618. 1937.
- 2.- Greep R.O., H.L. Fevol and F.L. Hisaw. .- Effects of two hypophyseal ganadotrophic hormones on reproductive sistem of male rats. .- Anat. Record. 65:261-271. 1936.
- 3.- Berswordt-Wallrabe, R. von, and F. Neumann. .- Failure to induce effects in the testes of hypophysectomized rats -- concomitantly treated with a FSH preparations and anti-androgen, cyproterone acetate. .- Proceedings of the fifth world congress on fertility and sterility. .- Amsterdam, Excerpta med, Found.,581-584. 1967.
- 4.- Shikita M., Kakizaki H. and Tamaoki B.I. .- The pathways of formation of testosterone from 3 -hidroxi-pregn-5-en-20-

- one by rat testicular microsomes. .- Steroids 4:521. 1964.
- 5.- Seal U.S. and Doe R.P. .- Endocrinology 73:371. 1973.
- 6.- Eik-Nes K., Schellman J.A. .- J. Biol. Chem. 206:411 1954.
- 7.- David Feldman, John W. Funder, Isidore S. Edelman.- Subcellular mechanisms in the action of adrenal steroids. .- The American Journal of Medicine 53:545-560. 1972.
- 8.- Liao S., T. Liang. .- Steroid structure and androgenic activity. .- J. Biol. Chem. 248:6154-6162. 1973.
- 9.- Rao B.R. .- Receptors for progesterone. Gynecol. Oncol. 2(2-3):239-248. 1974.
- 10.- Deanna J. Talley, Jonathan J. Li, Sara A. Li, and Claude A. Villee. .- Biochemical comparison of estrogen receptors of the Hamster hypothalamus and uterus. .- Endocrinology 96(5): 1135-1144. 1975.
- 11.- Richards J.E. .- Estrogen receptor in normal and neoplastic mouse mammary tissues. .- Cancer.Res. 34(10):2764-2772. 1974.
- 12.- Blaquier J. .- Androgen receptors from the epididymis of rhesus monkey. .- Endoc. Res. Comunn. 1(2):155-167. 1974.
- 13.- Smith A.A. .- Androgen receptor in nuclei of rat testis. .- Steroids 25(5):569-586. 1975.
- 14.- Boesel R.W.- A rapid, specific protocol for determination of available androgen receptor sites in unfractionated rat ventral prostate cytosome preparations. .- Biochem. Biophys. Res. Comunn. 61(3):1004-1011. 1974.
- 15.- Lowry O.H., Roosenbroogh N.J., Farr A.L. and Randal R.J. .- Protein measurement with the Folin phenol reagent. .- J. Biol.Chem. 193:265. 1951.

- 16.- Dan H. Campbell, Justine S. Garvey, Natalie C. Cremer, Dieter H. Sussdorf. .- Methods in Immunology. New York. 79-104. 1970
- 17.- Lehninger Albert. Bioquímica. Ed. Omega S.A. Baercelona, España. Cap. 7 Proteínas: comportamiento en disolución. 156. 1972.
- 18.- Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology. Steroid Assay by Protein Binding. E. Diczfalusy. Stockholm. 104-121. 1970.
- 19.- Baulieu and Raynaud. Europ. J. Biochem. 13:293. 1970.

TESIS HERRERA
UNICO SISTEMA EN EL PAIS
TESIS POR COMPUTADORA
PASEO DE LAS FACULTADES
No. 32-C
548-62-29 548-32-17
CIUDAD UNIVERSITARIA