

00361



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIOS BIOQUÍMICOS EN LOS
SÍNDROMES DE RESISTENCIA A
LA ACCIÓN DE ANDRÓGENOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A:

QFB. BERTHA ALICIA CHAVEZ CANO

DIRECTOR DE TESIS: DR. GREGORIO A. PEREZ PALACIOS

MÉXICO, D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los integrantes del Departamento de Biología de la Reproducción, del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, por las facilidades brindadas para la realización del presente trabajo de tesis. Asimismo deseo agradecer a los integrantes de mi jurado (Dr G. Pérez Palacios, Dr E. Pedernera, Dra S. Kofman-Alfaro, M en C.M. Asai, Dr J.P. Méndez, Dr I. Camacho y Dr J Pedraza), por la revisión y críticas hechas a este trabajo.

INDICE

página

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Antecedentes.....	3
I. Hormonas esteroides.....	3
II. Andrógenos.....	6
III. Mecanismo de acción de andrógenos.....	9
IV. Receptor intracelular de andrógenos.....	10
V. Diferenciación sexual.....	11
VI. Alteraciones en la diferenciación sexual fenotípica en el embrión masculino.....	15
1. Defectos pre-receptor.....	16
2. Defectos a nivel receptor y post-receptor..	17
a) Síndrome de feminización testicular completa.....	18
b) Síndrome de feminización testicular incompleta.....	19
c) Resistencia parcial a la acción de andrógenos.....	20
Planteamiento del estudio.....	22
Hipótesis de trabajo.....	23
Objetivo.....	24
Objetivos específicos.....	24
Materiales y métodos.....	25
Resultados.....	32
Discusión.....	46
Referencias.....	53
Publicaciones	

RESUMEN

El Síndrome de Feminización Testicular Completa (SFTC) se presenta en individuos con cariotipo XY y fenotipo femenino; la masculinización no se efectúa, debido a una falla en la acción de andrógenos durante el desarrollo embrionario y etapas posteriores. La acción de los andrógenos depende de su unión a receptores específicos; estas macromoléculas son de naturaleza proteica y tienen alta afinidad y baja capacidad por la hormona, una vez unido formará un complejo hormona-receptor el cual al unirse a la cromatina dará como respuesta la síntesis de RNA el cual será traducido a proteínas andrógeno-reguladas. El gen del receptor de andrógenos se encuentra en el cromosoma X. El receptor de andrógenos pertenece a una familia de factores transcripcionales entre los que se encuentran los receptores para otras hormonas esteroides así como los receptores de hormonas tiroideas y vitamina D, y tienen una estructura con tres dominios principales; que son la región N-terminal, el dominio de unión al DNA y el dominio de unión al esteroide. En el presente trabajo se estudió el mecanismo de acción de andrógenos en pacientes diagnosticados clínicamente como resistentes a la acción de andrógenos. Los estudios se efectuaron en fibroblastos provenientes de piel de área genital, mantenidos en cultivo, empleándose como ligandos dihidrotestosterona (DHT) y dimetilnortestosterona (DMNT) marcados con tritio. Se probó la captación de andrógenos en células completas, mediante incubaciones de fibroblastos a 37°C durante 1 h, con andrógeno radiactivo a diferentes concentraciones (0.2-3.0 nM), con o sin andrógeno radioinerte en exceso (200X); el esteroide libre se separó lavando cuatro veces el precipitado celular. La captación nuclear, se estudió efectuando una técnica similar a la anterior y obteniendo la fracción nuclear mediante el rompimiento celular, exponiendo a las células a una solución hipotónica y homogeneizándolas posteriormente. Se efectuaron estudios de saturación del receptor de andrógenos en citosol de fibroblastos, y se analizó la conducta de sedimentación del complejo hormona-receptor en gradientes lineales de sacarosa. Basados en los resultados obtenidos se formaron cuatro grupos (A,B,C y D) de acuerdo a las características de unión del andrógeno con su receptor. En el grupo A no se detectó unión del esteroide al receptor de andrógenos; en el grupo B se demostró unión al receptor citoplasmático con afinidad normal pero con una retención nuclear extremadamente baja; en el grupo C se observó que en las células completas la retención intracelular del andrógeno marcado fue baja, sin embargo cuando se estudio la unión del andrógeno a su receptor en citosol esta fue normal; finalmente, en el grupo D se observó en todos los estudios efectuados un resultado similar al control normal. Estos datos demuestran que el Síndrome de Feminización Testicular Completa no es el resultado de un tipo único y universal de alteración en la acción de los andrógenos y que es posible localizarla en cualquiera de las etapas involucradas en este mecanismo.

INTRODUCCION

Las hormonas esteroides son moléculas de bajo peso molecular, que son sintetizadas en glándulas endócrinas (ovario, testículo y glándulas suprarrenales) y que regulan una gran variedad de diferentes funciones celulares. Su mecanismo de acción es mediado por receptores intracelulares de naturaleza peptídica, los cuales pertenecen a una familia de factores transcripcionales en la cual también se incluyen a los receptores de vitamina D, receptores de hormonas tiroideas y receptores de ácido retinoico. La interacción no covalente de la hormona esteroide con su receptor, que ocurre en un sitio específico de la molécula (dominio de unión del esteroide), representa el primero de una larga serie de eventos, y culmina con la activación de secuencias específicas de la cromatina (genes hormono-dependientes) inducida por el complejo receptor (factor de transcripción-hormona). Estos mecanismos regulados por hormonas esteroides han sido ampliamente estudiados, y en algunas circunstancias como en el estudio del mecanismo de acción de los andrógenos, se ha tomado ventaja de la existencia de modelos naturales, en los que existe una resistencia o refractariedad a hormonas, como es una forma heredada de pseudohermafroditismo masculino que ocurre espontáneamente en varias especies de mamíferos incluyendo al humano. El estudio de las diversas formas clínicas de esta insensibilidad a la acción de los andrógenos, ha permitido no sólo identificar la naturaleza molecular de esta anomalía de la diferenciación sexual, sino también ha contribuido a la dilucidación del modo de acción al nivel celular de las hormonas esteroides con actividad androgénica. El presente estudio se realizó utilizando células mantenidas en cultivo, provenientes de individuos con cariotipo 46 XY, con la forma completa del Síndrome de Feminización Testicular.

ANTECEDENTES

Las hormonas en cuanto a su estructura química, se pueden dividir en dos grandes categorías: 1) en la que la mayoría son péptidos o derivados de aminoácidos, esta categoría incluye polipéptidos complejos (como la hormona luteinizante), péptidos de tamaño intermedio (como la insulina y el glucagon), péptidos pequeños (como la hormona liberadora de tirotropina), dipéptidos (como la tiroxina y la triiodotironina) y derivados de aminoácidos (como las catecolaminas, la serotonina y la histamina), y 2) en la segunda categoría están los esteroides. Debido a sus características fisicoquímicas, las hormonas de estos grupos ejercen sus efectos a través de diferentes mecanismos, un mecanismo es interactuando con receptores específicos en la superficie celular y produciendo señales rápidas a través de la membrana celular, como lo hace la hormona luteinizante, mientras que otras hormonas interactúan con receptores intracelulares, lo que les permite ejercer sus efectos a nivel genómico, como lo hacen los esteroides y la triiodotironina.

I. Hormonas esteroides.

Las hormonas esteroides son moléculas de naturaleza lipídica, y comprenden a las hormonas sexuales masculinas (andrógenos), a las hormonas sexuales femeninas (estrógenos y progestinas) y a las hormonas secretadas por la corteza suprarrenal (gluco- y mineralo-corticoides) (Fig 1). Estas moléculas tienen un peso molecular bajo (alrededor de 300 D), y su estructura química esta constituida por cuatro anillos

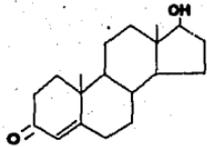
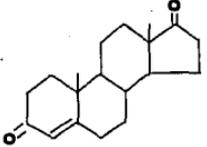
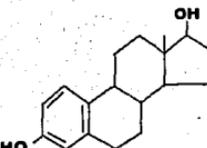
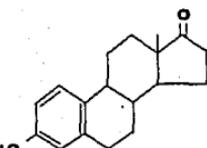
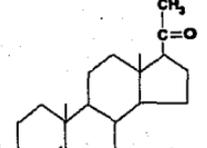
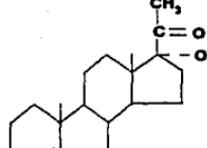
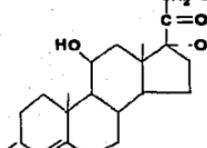
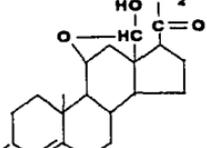
 <p>Testosterona</p>	 <p>Androstendiona</p>	<p>Andrógenos</p>
 <p>Estradiol</p>	 <p>Estrona</p>	<p>Estrógenos</p>
 <p>Progesterona</p>	 <p>17α-OH Progesterona</p>	<p>Progestinas</p>
 <p>Cortisol</p>	 <p>Aldosterona</p>	<p>Gluco- y mineralo- corticoides</p>

Figura 1

fusionados, tres de los cuales tienen seis átomos de carbono y el otro tiene cinco átomos de carbono. Existe una similitud estructural muy marcada en todas las moléculas esteroides, esto es debido a que en su ruta biosintética todas ellas se originan del mismo precursor químico, que es el colesterol (Fig 2). Las hormonas esteroides, se producen por modificaciones en la molécula del colesterol, estas modificaciones se efectúan por la acción catalítica de enzimas específicas, presentes en las células de las glándulas endócrinas que las producen (testículo, ovario, suprarrenales). Además, la bio-conversión e incluso la síntesis de esteroides puede tener lugar en tejidos no endócrinos, por ejemplo, los andrógenos pueden aromatizarse en el tejido adiposo o en el sistema nervioso central (SNC), dando como producto el estradiol, y algunas hormonas se pueden sintetizar en el SNC (neuroesteroides) (1).

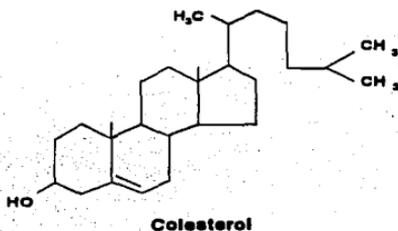


Figura 2

Aunque la estructura de los esteroides es muy parecida, cada hormona tiene una

actividad específica, así la progesterona que es secretada por el ovario (cuerpo lúteo) y la placenta, es la encargada de preparar al útero para la implantación del embrión, y de mantener el embarazo, también contribuye al desarrollo del sistema alveolar en la glándula mamaria; el estradiol secretado por el ovario y la placenta, mantiene las características sexuales secundarias femeninas, la función cíclica normal de los órganos sexuales accesorios femeninos y el desarrollo del sistema de ductos en las glándulas mamarias; la testosterona que se sintetiza en el testículo, permite la maduración y el funcionamiento normal de los órganos sexuales accesorios masculinos, así como la adquisición durante el desarrollo embrionario de las características sexuales masculinas; el cortisol y la corticosterona, secretados por la corteza suprarrenal tienen efecto sobre el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas; y la aldosterona secretada también en la glándula suprarrenal mantiene la homeostasis hidroelectrolítica.

La biosíntesis de las hormonas esteroides en las glándulas de secreción interna (ovario, testículo, corteza suprarrenal), es regulada a su vez por hormonas de naturaleza polipeptídica, que provienen de la hipófisis o de la placenta, los esteroides a su vez modulan la liberación de estas hormonas, este proceso es conocido como retroalimentación, y puede ser positiva o negativa (2).

II. Andrógenos.

Los andrógenos son biosintetizados fundamentalmente en el testículo (Fig 3). Las células de Leydig del intersticio testicular primario, forman y secretan la testosterona, en respuesta a la acción de la hormona luteinizante (LH*), proveniente de la hipófisis. Esta última hormona pertenece a una familia de glicoproteínas, en la que se incluyen, la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona estimulante de

* Las abreviaturas usadas corresponden a los nombres de las hormonas en idioma inglés, se usaron de esta forma ya que es la manera en que generalmente se conocen.

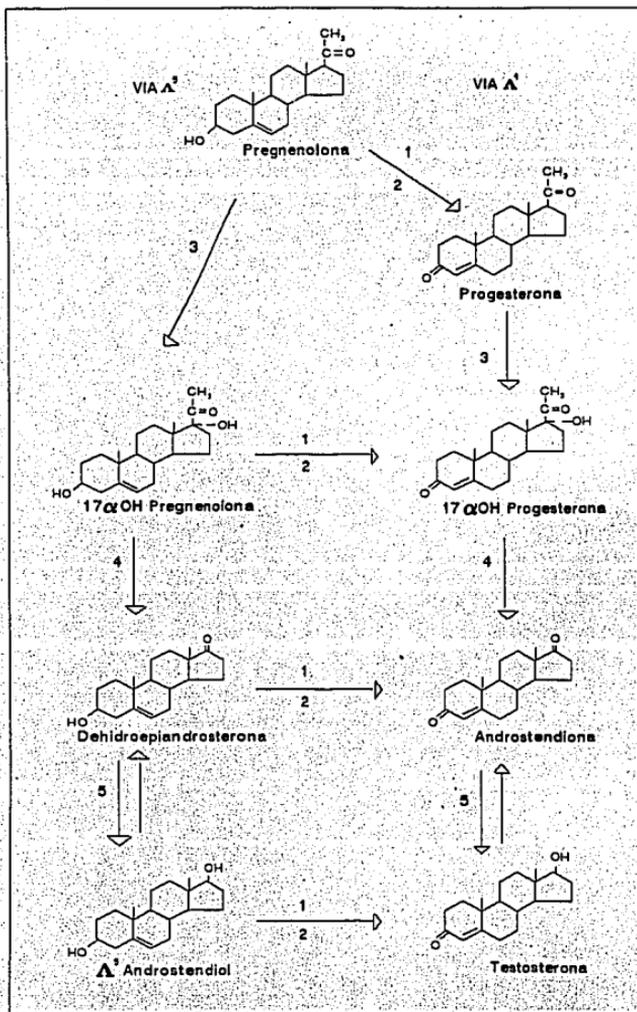


Figura 3. Biosíntesis de testosterona a partir de pregnenolona en testículo. La formación de testosterona puede ocurrir a través de dos vías, la vía Δ^4 (izquierda) o la vía Δ^5 (derecha). Los números indican las enzimas que actúan en la biosíntesis. 1) 3 β hidroxisteroide deshidrogenasa; 2) Δ^4 - Δ^5 isomeriása; 3) 17 α esteroide hidroxilasa; 4) 17,20-esteroide liasa (desmolasa); 5) 17 β -hidroxisteroide deshidrogenasa.

de la tiroides (TSH), y la gonadotropina coriónica (CG), estas hormonas están constituidas por dos unidades, la subunidad α , que es la misma para todas las glicoproteínas y está codificada por un solo gen; y la subunidad β que es diferente en cada glicoproteína, y es la que determina la especificidad biológica en cada hormona (2), la LH debido a su naturaleza proteica y a su tamaño, no puede penetrar a las células blanco, por lo que se une a receptores membranales específicos, e induce la activación de la adenilil ciclasa, dando como resultado un aumento en la concentración del 3', 5' adenosin monofosfato cíclico (AMPc) dentro de la célula (3), el aumento del AMPc permite que existan cambios en la actividad de una proteína cinasa (4), y facilita la conversión de colesterol a testosterona (5).

Una vez estimuladas las células de Leydig, las concentraciones de testosterona circulante se incrementan, y al actuar en el hipotálamo inhiben la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) modulando la síntesis y liberación hipofisaria de LH, de esta manera se cierra un "circuito" en la regulación de la producción de andrógenos.

La testosterona, viaja en el torrente sanguíneo unida a una glicoproteína llamada globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG), la cual tiene alta afinidad por los andrógenos y por los estrógenos (6), tiene un peso molecular de 94 000 D (7) y se ha observado que tiene un sitio de unión para testosterona por molécula (8). Cuando los andrógenos viajan unidos a la SHBG se encuentran menos disponibles tanto para su metabolismo como para su actividad, en comparación con los que viajan libremente (9), por lo que se ha propuesto que la función de la SHBG es la de mantener por un mayor tiempo a los esteroides en circulación, y la de regular su actividad.

III. Mecanismo de acción de andrógenos.

Los andrógenos atraviesan pasivamente la membrana celular, y una vez dentro de las células blanco, son retenidos debido a su unión a sus receptores intracelulares de naturaleza proteica. En la mayor parte de los tejidos andrógeno-sensibles o andrógeno-dependientes la molécula de testosterona, una vez dentro de las células blanco, es reducida en su anillo A, en la posición 5, dando como resultado la formación de un andrógeno de mayor potencia biológica: la 5α -dihidrotestosterona (DHT); la reducción se efectúa tanto a nivel nuclear como en el retículo endoplásmico (10), por una enzima, la 5α -esteroide reductasa, cuya actividad es dependiente del cofactor NADPH (11). Una vez que la DHT se ha unido al receptor intracelular, forma un complejo hormona-receptor que es capaz de atravesar la envoltura nuclear, y en el interior del núcleo se une a sitios específicos dentro de la cromatina, dando como resultado el inicio de la transcripción de genes, que se expresan solo en presencia de andrógenos. Los RNA mensajeros específicos formados debido a la estimulación de la hormona, se dirigen al citoplasma en donde serán traducidos, de esta manera se sintetizan las proteínas andrógeno-dependientes (Fig 4).

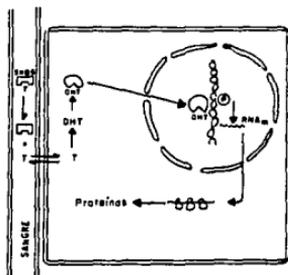


Figura 4

IV. Receptor intracelular de andrógenos.

El receptor de andrógenos, es una molécula de naturaleza polipeptídica que se encuentra localizado dentro de las células de los tejidos blanco para andrógenos, los estudios fisicoquímicos revelan un peso molecular de aproximadamente 110 kilodaltones (kD), sedimenta en gradientes de sacarosa con un coeficiente de 8 unidades Svedberg (S) en condiciones de baja fuerza iónica, en presencia de molibdato de sodio, y con un coeficiente 4S en presencia de KCl 0.5 M (12). El receptor presenta una alta afinidad por las hormonas androgénicas ($K_d = 0.2-1.0$ nM) y baja capacidad de unión (20-70 fmol/mg de proteína). En ausencia de andrógenos, el receptor se puede extraer de la fracción soluble de la célula, mientras que en presencia de hormona, el complejo hormona-receptor se activa para unirse al receptor nuclear y se le puede extraer del núcleo con altas concentraciones de sal (13).

El gen que regula el receptor de andrógenos se ubica en el cromosoma X (14), a partir de experimentos con células híbridas somáticas (15) y de estudios de hibridación con fragmentos de DNA clonados específicamente, se ha encontrado que la localización de este gen es entre las regiones Xq11 y Xq12 (16).

Los estudios del receptor de andrógenos se dificultaron por su extrema labilidad y baja concentración en los tejidos, lo que no permitía una purificación adecuada. Con el advenimiento de técnicas en biología molecular fue posible analizar el receptor de andrógenos, el paso inicial fue la clonación de DNAs complementarios para este receptor. En 1988 los grupos de French (16) y Liao (17) lograron en forma simultánea la clonación del receptor de andrógenos, así como su expresión *in vitro*, originando una proteína con alta afinidad por los andrógenos y con especificidad correspondiente al receptor de andrógenos nativo.

El análisis de la secuencia de aminoácidos deducida para el receptor de andrógenos,

demuestra que posee un dominio amino terminal, un dominio de unión al DNA y otro dominio de unión a los esteroides, y tiene una gran similitud con los receptor de progesterona, glucocorticoides y mineralocorticoides, y en menor grado con los receptores de estrógenos, vitamina D y de hormonas tiroideas.

En estudios recientes (18), se ha logrado aislar de una biblioteca genómica, la región del gen que codifica completamente para el receptor de andrógenos humano, y se demostró, que la información para el receptor de andrógenos, esta dividida en 8 exones y que el tamaño total es mayor de 70 Kb. La secuencia que codifica para la región N-terminal esta presente en un exón muy grande, las dos regiones de unión al DNA (Zn-fingers) estan codificadas separadamente en dos exones pequeños, la información para el dominio de unión a la hormona esta cortada en cinco exones, y la posición de los intrones es idéntica a la informada para los genes del receptor de progesterona de pollo (19) y del receptor de estrógenos humano (20). El análisis del DNA del gen del receptor de andrógenos humano utilizando varias sondas específicas ha revelado que el receptor de andrógenos humano es codificado por un gen de copia simple (18).

V. Diferenciación sexual.

La diferenciación sexual en el humano al igual que en todos los mamíferos es un proceso biológico complejo muy trascendente ya que asegura la perpetuación de las especies, que se efectúa de una manera precisa, en tres etapas sucesivas; la diferenciación cromosómica, la diferenciación gonadal y la diferenciación fenotípica. El proceso de diferenciación cromosómica se ocurre en el momento de la fertilización, ya que cada célula germinal posee un número haploide de cromosomas.

El óvulo contiene el cromosoma sexual X y los espermatozoides aportan el cromosoma Y o un cromosoma X, al unirse dan como resultado un complemento cromosómico XX para la hembra o un complemento cromosómico XY en el macho. El cromosoma Y juega un papel esencial en la diferenciación sexual (21), ya que su presencia es necesaria para la formación del testículo a partir de la gónada primitiva, y esto se efectúa independientemente del número de cromosomas X presentes (22), además el cromosoma Y posee genes que regulan otros procesos tales como la espermatogénesis (23), el crecimiento corporal (24), y la maduración ósea y dental (25).

En la especie humana el dimorfismo gonadal se establece hasta la 6a o 7a semana de vida intrauterina (26). La gónada se forma por dos tipos celulares: las células somáticas de origen mesodérmico y las células germinales primordiales, que por su temprana diferenciación pueden considerarse de origen autónomo.

La aparición de las células germinales primordiales se detecta a los 22 días de vida embrionaria y se localizan en el endodermo de la alantoides, alrededor de la 4a semana de vida intrauterina, estas células inician su migración desde el endodermo del intestino y el epitelio dorsal del saco vitelino a través del mesenterio dorsal para arribar en la 5a semana al primordio gonadal (27). Se ha postulado que las futuras crestas genitales poseen y/o emiten señales específicas que atraen y retienen a las células germinales. Las células germinales, una vez localizadas en la región urogenital, inician un proceso activo de proliferación, las células somáticas mesenquimatosas y del epitelio celómico proliferan simultáneamente, y de esta manera se llega a formar el blastema gonadal. El blastema gonadal en el varón se organiza en dos tipos de tejidos, uno que contiene a las células germinales rodeadas de células somáticas que darán origen a las células de Sertoli, y el tejido estromático que darán origen al tejido conectivo, vasos sanguíneos y tejido intersticial

esteroidogénico. Las células germinales femeninas se rodean de células epiteliales que darán lugar a las células de la granulosa, y las células del mesénquima del ovario se diferencian a células tecales. Las células de la granulosa y de la teca forman los folículos que envuelven a las células germinales y secretan hormonas esteroides. El estado indiferenciado de la gónada femenina persiste durante un tiempo mas largo en comparación con el testículo, sin embargo George y Wilson (28) han observado que a las ocho semanas de gestación las gónadas masculinas y femeninas son capaces de sintetizar hormonas sexuales (el testículo sintetiza testosterona y el ovario sintetiza estradiol).

La diferenciación de los dos tipos celulares fundamentales del testículo: las células de Sertoli y las células de Leydig, ocurre tempranamente. En las células de Sertoli se desarrolla notablemente el retículo endoplásmico rugoso, que caracteriza a las células con capacidad de secretar polipéptidos, y las células de Leydig que aparecen en el estroma después del establecimiento de los cordones seminíferos, se caracterizan por tener un gran desarrollo del retículo endoplásmico liso y presencia de crestas tubulares en sus mitocondrias, ambas estructuras son típicas de células activas en la secreción de esteroides (29). Estos elementos constituyen la base estructural de las dos actividades secretoras con carácter morfogenético del testículo fetal: la hormona antimülleriana y la testosterona.

La diferenciación fenotípica en el humano se inicia en una etapa posterior a la diferenciación gonadal, ya que la secreción de hormonas por el testículo fetal (30), responsables de la inducción del fenotipo masculino se inicia hacia la 6a y 8a semana de vida intrauterina. El fenotipo en el embrión femenino por el contrario no requiere de la participación de hormonas fetales.

Las estructuras primordiales del tracto genital que darán origen a los genitales internos incluyen dos sistemas de conductos presentes en embriones de ambos sexos:

los conductos wolffianos (de origen mesonéfrico) y los conductos müllerianos (de localización paramesonéfrica). En cambio, los genitales externos se desarrollan a partir de un primordio común (tubérculo genital, pliegues genitales y engrosamientos labioescrotales).

El desarrollo del fenotipo masculino se inicia con la involución de los conductos müllerianos, este proceso se inicia entre la 8a y 9a semana de gestación y concluye en la 11a semana con la desaparición de este sistema, en este proceso interviene por la hormona antimülleriana, la cual es una proteína secretada por la célula de Sertoli fetal (32,32). Posteriormente al inicio de la síntesis de la hormona antimülleriana, las células intersticiales del testículo fetal se citodiferencian en células de Leydig, las cuales poseen los sistemas enzimáticos requeridos para la síntesis de testosterona, que es la segunda hormona fetal que participa en la construcción del fenotipo masculino. El efecto de la testosterona se ejerce particularmente sobre el desarrollo de los conductos wolffianos que formaran los ductos eferentes, el epididimo, vas deferens, vesícula seminal y el ducto eyaculador. La testosterona de origen testicular, ejerce su efecto en forma local, promoviendo la maduración de los túbulos espermatogénicos y también es secretada a la circulación fetal sistémica, lo que permite ejercer un papel esencial en el desarrollo del tracto genital masculino. La testosterona secretada llega a las células blanco, en donde generalmente se bioconvierte a su forma reducida, la DHT, esta hormona ejerce su acción virilizando los genitales externos durante la embriogénesis. La DHT estimula el crecimiento del tubérculo genital e induce la fusión de los pliegues labioescrotales, y como resultado de esta fusión se forma el escroto bilobulado que servirá como receptáculo de los testículos al momento del descenso. Además la DHT estimula el desarrollo prostático, que es un órgano sexual accesorio que deriva del seno urogenital, e inhibe el crecimiento del septum vesicovaginal (33).

La ausencia de testículos o de actividad endócrina testicular en el embrión conduce al desarrollo del fenotipo femenino. La ausencia de la hormona antimülleriana permite el desarrollo de los conductos, para formar las trompas de Falopio, el útero y la porción superior de la vagina. La ausencia de testosterona y DHT dan como resultado la regresión y desaparición de los conductos wolffianos y la feminización de genitales externos.

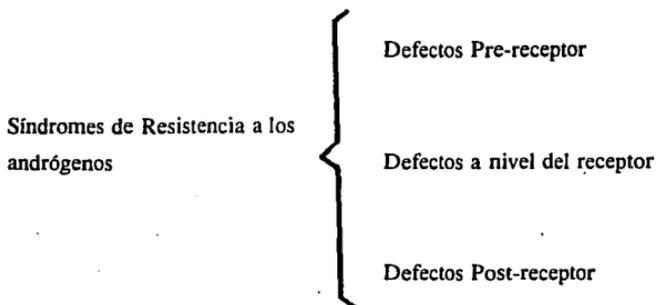
En conclusión, en la diferenciación del fenotipo masculino, es necesaria la presencia del testículo, así como de las hormonas que produce, mientras que la formación del fenotipo femenino, es un proceso que ocurre en ausencia de testículos y de andrógenos.

VI. Alteraciones en la diferenciación sexual fenotípica en el embrión masculino.

Como se mencionó anteriormente, la construcción del fenotipo masculino, depende de las hormonas secretadas por el testículo fetal. Cualquier circunstancia espontánea o inducida, que impida la síntesis o el mecanismo de acción de las hormonas fetales, necesariamente resultará en el embrión masculino, en una alteración de su diferenciación fenotípica.

La condición en la cual un embrión masculino (complemento cromosómico 46,XY), cuyas gónadas se han diferenciado adecuadamente a testículos y son capaces de biosintetizar andrógenos, pero la acción de estas hormonas no ocurre normalmente, da como resultado individuos con fenotipo femenino o individuos con diferentes grados de virilización. Cuando la causa fundamental de esta forma de inter-sexo en el humano, es la falta de respuesta de los órganos blanco a la acción de los andrógenos, los individuos afectados presentan diversas formas de ambigüedad genital

que han sido agrupadas bajo el nombre genérico de Síndromes de Resistencia a los Andrógenos. Nuestro grupo de investigación propuso una clasificación (34) que topográficamente ubica la alteración del modo de acción de los andrógenos:



1. Defectos pre-receptor.

En esta condición, el defecto que origina la resistencia a la acción de los andrógenos, se localiza antes de la interacción de estas hormonas con su receptor intracelular. Su patogenesis reside, en la incapacidad de formar DHT a partir de la testosterona formada en el testículo fetal, lo cual es debido a una falla en la actividad de la 5α -esteroide reductasa (35,36). Las características clínicas de estos pacientes son: hipospadias perineoescrotal con prepucio dorsal cubierto y una uretra que llega a la base del falo, formando una pseudovagina de tamaño variable, la cual abre en el seno urogenital o en el perineo inmediatamente abajo del orificio uretral. Los pacientes tienen testículos, que aunque bien desarrollados e histológicamente diferenciados frecuentemente son criptorquídicos; también poseen epidídimo, vas deferens y

vesículas seminales, pero no existen derivados ni remanentes müllerianos. Los individuos afectados presentan al nacimiento ambigüedad genital severa, por lo que frecuentemente se les asigna sexo femenino, y así son orientados psicológica y socialmente (37). Al inicio de la pubertad, la cual ocurre al tiempo esperado, y bajo el efecto de la descarga de LH, FSH, y por el aumento en los niveles de testosterona, los pacientes experimentan un desarrollo masculino de su masa muscular corporal, los testículos descienden y progresiva y espontáneamente ocurre un cambio de femenino a masculino en su identidad psico-sexual. Algunas características sexuales secundarias de la pubertad, como desarrollo del vello sexual facial o acné no se presentan en estos individuos. El síndrome debido a la deficiencia de 5α -esteroide reductasa, es hereditario y su transmisión es autosómica recesiva. La 5α -esteroide reductasa que cataliza la 5α -reducción de muchos esteroides C_{19} y C_{21} incluyendo el cortisol ha sido ampliamente estudiada (37,38,39). Existen dos tipos de 5α -reductasa, la 5α -reductasa 1 y la 5α -reductasa 2, el número se les asignó en orden cronológico de la clonación del gen (40,41). La enzima tipo 1 se expresa a bajos niveles en la próstata, tiene un pH óptimo neutral o básico, y es prácticamente insensible a la inhibición con finasteride ($K_i \geq 300$ nM). El gen que codifica para la 5α -reductasa 1 se encuentra en el cromosoma 5 y tiene 5 exones separados por cuatro intrones, y se ha visto que es normal en pacientes con deficiencia de 5α -reductasa. La 5α -reductasa tipo 2 es expresada en altos niveles en la próstata, tiene un pH óptimo ácido y es altamente sensible a la inhibición por finasteride ($K_i = 3-5$ nM). El gen que codifica la 5α -reductasa 2 se encuentra en el cromosoma 2 y tiene 5 exones separados por 4 intrones (42).

2. Defectos a nivel receptor y post-receptor.

En el defecto a nivel de receptor, la resistencia a la acción de andrógenos se origina

en la falta de unión del andrógeno a su receptor, o a que esta unión este afectada cualitativa- o cuantitativamente. En el defecto a nivel post-receptor, las características de unión del andrógeno a su receptor, son similares a las encontradas en individuos normales, y se cree que la alteración se encuentra en etapas posteriores del mecanismo de acción de la hormona. Estas condiciones dan como resultado una diversidad de cuadros clínicos, en los que los individuos afectados presentan fenotipos que van desde el totalmente femenino, hasta el masculino con virilización incompleta. Dentro de este grupo, se incluyen a las formas completa e incompleta del Síndrome de Feminización Testicular, y a las diversas formas de resistencia parcial a la acción de los andrógenos. Todas estas alteraciones se transmiten hereditariamente con un patrón recesivo ligado al sexo.

a) Síndrome de Feminización Testicular Completa.

El primer caso en la literatura de esta forma de pseudohermafroditismo masculino (individuos con fenotipo femenino y gónadas masculinas), fue informado en 1817 por Steglehner, quien al realizar una autopsia de una mujer de 23 años de edad, sorprendentemente encontró testículos bilaterales y ausencia de útero, a partir de entonces se han informado un gran número de casos similares, y en 1953 Morris (43) después de una exhaustiva revisión de 98 casos clínicos, propuso el término de Síndrome de Feminización Testicular para esta condición, que constituye una entidad clínica bien definida, relativamente frecuente y que representa la forma completa de resistencia a la acción de los andrógenos. Los individuos afectados tienen un cariotipo 46XY, pero un habitus exterior (fenotipo) completamente femenino, sus genitales externos son femeninos, con una vagina ciega terminada en fondo de saco (ausencia de la porción mulleriana). Los pacientes con el Síndrome de Feminización Testicular Completa, son desde el nacimiento psicológicamente orientados como mujeres, y al llegar a la pubertad, presentan telarquia (desarrollo de glándulas mamarias) normal

sin presentar menarquia. Una característica distintiva de estos pacientes, es la ausencia completa vello sexual (axilar y púbico) (44), y muy frecuentemente presentan hernias inguinales uni o bilaterales, ya que los testículos criptorquídicos se insinúan en los conductos inguinales. En la cavidad pélvica de estos pacientes, no existen derivados de los conductos müllerianos, ni de los conductos wolffianos, aunque se ha informado la presencia de remanentes de ambos conductos (45).

Los resultados de estudios iniciales tendientes, a esclarecer la naturaleza de la resistencia completa a los andrógenos sugirieron que en algunos agregados familiares, existían alteraciones cuantitativas y cualitativas en la unión de testosterona y de DHT (o ligandos sintéticos) a su receptor intracelular (citoplasmático y/o nuclear). En efecto, se logró demostrar en algunos casos, una interacción andrógeno-receptor completamente ausente (46,47) o bien significativamente disminuida. Además en algunos estudios se informaron alteraciones cualitativas del receptor de andrógenos, tales como termolabilidad incrementada (48), inestabilidad en presencia de molibdato (49), velocidad de disociación incrementada (50), así como labilidad del receptor bajo condiciones transformantes (52).

b) Síndrome de Feminización Testicular Incompleta.

Esta variante se distingue de la forma completa de resistencia a los andrógenos, en que los individuos afectados presentan al inicio de la pubertad, aparición de vello axilar y púbico, acné facial y frecuentemente hipertrofia discreta de clítoris, denotando una acción mínima de andrógenos. El desarrollo mamario en estos pacientes, puede ser similar o ligeramente menor que en la forma completa (52). Es interesante señalar que no se han informado agregados familiares de esta variante, y generalmente se trata de casos aislados (34), tampoco se ha informado de coexistencia de formas completa e incompleta en una misma familia, lo que sugeriría se trata de

se trata de una entidad diferente. La baja prevalencia de esta forma incompleta del síndrome de feminización testicular, no ha permitido la identificación clara de su naturaleza. Existen sin embargo, algunos estudios experimentales, en los cuales se ha demostrado que la biosíntesis testicular de andrógenos, y la formación extragonadal de DHT ocurre normalmente y es similar a lo informado en pacientes con la forma completa (53). Por otra parte, se ha informado que la interacción de los andrógenos con su receptor es anormal, y que estas alteraciones también son de tipo cuantitativo y/o cualitativo.

c) Resistencia Parcial a la Acción de Andrógenos.

En esta condición, se agrupan algunos cuadros clínicos con manifestaciones variables de virilización, lo que indica, que los andrógenos tienen cierto grado de actividad, la cual se refleja en que los pacientes presentan fenotipos con diferentes grados de masculinización. Pero a pesar de estas diferencias en las manifestaciones clínicas, los individuos afectados presentan similitudes endocrinológicas y genéticas. En efecto, estas diversas formas pueden coexistir en una sola familia. Aunque el fenotipo usual tiende a ser masculino, varía desde fallas severas en la virilización, hasta una masculinización casi completa. Dentro de este grupo se han descrito diversos síndromes bajo una variedad de epónimos como: Síndrome de Reifenstein (54), Síndrome de Lubs (55), Síndrome de Gilbert-Dreyfus (56), Síndrome de Rosewater (57) y el informado por Larrea y cols (58).

Las características clínicas principales incluyen: hipospadias perineoescrotal, escroto bífido, azoospermia, ginecomastia puberal familiar, el criptorquidismo es común y los testículos son pequeños, la infertilidad como en todos los síndromes de resistencia a los andrógenos, es una característica general (59).

En estos pacientes ha sido muy difícil correlacionar los hallazgos bioquímicos con su fenotipo. En ellos se han descrito anomalías cualitativas y cuantitativas

(60,61,62), sin embargo, no se ha observado correlación entre el grado de anomalía del receptor de andrógenos con sus características clínicas, por ejemplo se han encontrado pacientes con ginecomastia con niveles de receptor de andrógenos muy bajos, similares pacientes con el síndrome de feminización testicular completa (63), así también se han encontrado concentraciones de receptor de andrógenos disminuido a un 50% en algunos pacientes así como en hombres con fenotipo normal pero con azoospermia idiopática como único signo de insensibilidad a los andrógenos.

PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

Los andrógenos juegan un papel muy importante en la diferenciación sexual del humano, ya que su acción permite el desarrollo de los derivados wolfianos y la masculinización de los genitales externos.

Para que los andrógenos puedan actuar, es necesario que se unan a su receptor intracelular específico, formando un complejo hormona-receptor, el cual al unirse a la cromatina, dará como resultado la síntesis de RNAs mensajeros específicos, los cuales serán traducidos a proteínas cuya síntesis es dependiente de los andrógenos.

Los pseudohermafroditas masculinos, individuos con sexo cromosómico y gonadal masculinos, y con fenotipo femenino, constituyen un buen modelo natural, que permite estudiar diversas alteraciones del receptor de andrógenos, y de su capacidad de interactuar con diferentes ligandos.

Para la elaboración de este trabajo experimental se contó con material biológico proveniente de un grupo diagnosticado clínicamente con el Síndrome de Feminización Testicular Completa, sus características principales son: cariotipo XY, fenotipo femenino, ausencia de vello axilar y púbico, desarrollo mamario normal, presencia de testículos bilaterales, vagina terminada en fondo de saco ciego y las cuantificaciones hormonales se encuentran dentro de los niveles normales o ligeramente elevados en comparación con los observados en hombres normales.

El objetivo general del estudio es el de delinear la(s) alteraciones en el mecanismo de acción de los andrógenos en estos individuos, que son las responsables del estado intersexual.

Como modelo experimental, se utilizaron fibroblastos mantenidos en cultivo, provenientes de piel genital de estos pacientes y de individuos normales.

La detección de alteraciones, en la acción de los andrógenos a diferentes niveles de su mecanismo de acción, dará información relevante, para conocer con mayor precisión los mecanismos normales de la acción molecular de los andrógenos.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La insensibilidad total a la acción de los andrógenos conduce en el humano a una entidad clínica bien definida, conocida como Síndrome de Feminización Testicular Completa. A pesar de que las características clínicas de estos individuos, así como sus perfiles endócrinos son similares, y denotan una falta de actividad androgénica, la falla en la actividad de los andrógenos puede ser a diferentes niveles del mecanismo de acción de estas hormonas.

OBJETIVO

Mediante estudios de unión del receptor de andrógenos con su ligando marcado radiactivamente, localizar a que nivel existe la falla en la actividad de los andrógenos, en pacientes con el Síndrome de Feminización Testicular Completa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Efectuar estudios de retención intracelular de andrógenos marcados radiactivamente, en fibroblastos derivados de piel de área genital, de pacientes diagnosticados clínicamente con el SFTC.
2. Analizar al receptor de andrógenos, obtenido en la fracción soluble celular (citosol), mediante su unión a andrógenos marcados radiactivamente, y estudiar el comportamiento del complejo hormona-receptor a través de gradientes lineales de sacarosa.
3. Estudiar la translocación del complejo andrógeno-receptor al núcleo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes: Los pacientes estudiados fueron diagnosticados con el Síndrome de Feminización Testicular Completa en la Unidad Metabólica del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Los datos se describen en el cuadro No.1.

Reactivos para cultivo celular.

Los reactivos usados en el cultivo de células se adquirieron de Grand Island Biological Co. (GIBCO, NY): Medio mínimo esencial de Eagle (MEM) con sales de Earle (CaCl_2 200 mg/L, KCl 400 mg/L, MgSO_4 97.6 mg/L, NaCl 6800 mg/L, NaH_2PO_4 140 mg/L), con glutamina y aminoácidos no esenciales, sin bicarbonato de sodio; Penicilina-Estreptomicina liofilizadas, con 10 000 U/ml de penicilina base y 10 000 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina; Tripsina-EDTA, 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 (100X); suero fetal de ternera.

Cultivo de Fibroblastos

Para obtener los cultivos de fibroblastos, se partió de biopsias de piel de área genital. La región en donde se tomó la biopsia se lavó con jabón neutro, gasas estériles y agua estéril, se aplicó xilocaína al 1% en forma subdérmica y con pinzas y tijeras estériles se tomó un trozo de piel de aproximadamente 3 mm^2 , el cual se depositó en MEM. La piel se cortó en trozos pequeños los cuales se depositaron en la pared de

Paciente	EMB	NVAI	CoQR	CQR	SQR	ADMC	AMC	GC	CC	RC	DSP	AOB	SOB
#de línea celular	44	178	198	205	274	471	472	276	277	278	280	299	303
Fenotipo	Fem	Fem	Fem	Fem	Fem	Fem	Fem						
Cariotipo	46XY	46XY	46XY	46XY	46XY	46XY	46XY						
Edad (años)	18	16	26	7	19	23	36	10	12	16	18	23	13
LH mUI/ml	20.0	29.4	23.6	2.2	23.9	29.5	42.4 *	1.2	17.5	23.2	20.2	30.8	22.0
FSH mUI/ml	3.7	4.3	2.0	4.0	2.9	4.3	44.3 *	0.6	4.9	4.0	4.0	3.5	3.0
T ng/ml	14.0	4.91	5.35	--	--	3.36	0.26 *	--	--	--	3.63	3.07	2.7

* Mediciones postcastración.

-- Datos no disponibles.

T testosterona

VALORES NORMALES EN HOMBRE ADULTO

LH = 3.0 a 12.0 mUI/ml

FSH = 1.0 a 5.0 mUI/ml

T = 3.7 a 9.5 ng/ml

Cuadro 1

botellas de cultivo (Falcon, 25 cm²), se agregaron 6 ml de MEM-A (medio mínimo esencial 0.98 % p/v, pH 7.4, adicionado con tricine (Sigma Chemical Co. MO), bicarbonato de sodio 24 mmol/L, aminoácidos no esenciales 1 % v/v, estreptomycin 100 ug/ml, penicilina 100 U/ml y suero fetal de ternera 20 % v/v) y se incubaron a 37°C en un ambiente de 95 % aire y 5 % CO₂, hasta obtener un crecimiento celular superior a un 50 % en la superficie de la botella. Las biopsias se tomaron con el consentimiento de los pacientes. Las muestras control se obtuvieron de prepucios obtenidos en circuncisiones de individuos normales. Los fibroblastos obtenidos en el cultivo se subcultivaron a botellas nuevas. Este procedimiento se realizó desprendiendo las células de la botella, agregando tripsina y calentando la botella a 37°C durante 3 minutos. Los subcultivos se repitieron hasta obtener un numero adecuado de células para efectuar los estudios; o bien para guardarlas en congelación.

Congelación celular.

Para el congelamiento, las células se desprendieron de las botellas por el procedimiento de tripsinización previamente descrito. La suspensión celular se depositó en tubos de centrifuga y se centrifugaron a 800 g a 4°C durante 3 min., el precipitado celular se resuspendió en MEM-C (MEM-Eagle 0.98 % p/v, tricine 20 mmol/L, bicarbonato de sodio 24 mmol/L, aminoácidos no esenciales 1 % v/v, estreptomycin 100 ug/ml, penicilina 100 U/ml, suero fetal de ternera 10 %, glicerol 10 %, pH 7.4) y se transfirió a frascos estériles. El proceso de congelación se realizó en forma gradual con la finalidad de evitar daño y/o muerte celular, hasta lograr una temperatura de -80°C.

Material Químico y Radiactivo.

[1,2,4,5,6,7,³H] Dihidrotestosterona (DHT; ae=148 Ci/mmol), [17 α -metil-³H] dimetilnortestosterona (DMNT; ae=89 Ci/mmol) se adquirieron de Amersham International (Inglaterra). La DMNT (7 α ,17 α -dimetil-17 β -hidroxi-4-estren-3-ona) y DHT (17 β -hidroxi-5 α -androstano-3-ona) radioinertes se obtuvieron de Amersham International y de Steraloids Inc. (NY).

La pureza química de los esteroides marcados con tritio se comprobó usando cromatografía en capa fina (cloroformo:metanol [95:5] o benceno:acetato de etilo [2:1] y/o cromatografía en papel, sobre papel Whatman No. 1, usando heptano:benceno/metanol:agua (2:1/4:1).

Los esteroides no radiactivos se purificaron con recristalizaciones sucesivas y para verificar su pureza se obtuvieron sus puntos de fusión. La radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido Packard Tri-Carb (modelo 2660) y como líquido de centelleo se usó Instagel (Packard,IL). La eficiencia del conteo fue de un 40% y el apagamiento (quenching) se corrigió en todas las muestras por estandarización externa, los resultados se expresaron en dpm.

Captación de esteroides en células completas.

Los fibroblastos se obtuvieron por tripsinización, la suspensión celular se depositó en tubos de centrífuga (50 ml) conteniendo 2 ml de inhibidor de tripsina (1mg/ml), los tubos se centrifugaron a 1000 g a temperatura ambiente durante 5 minutos. El precipitado celular se lavó una vez con 5 ml de MEM y se centrifugó en las mismas condiciones. El precipitado celular se resuspendió en MEM y se tomó una alícuota para medir el número de células (en cámara de Neubauer). Se tomaron un millón de células para cada incubación y se obtuvieron alícuotas por triplicado para la medición de proteínas (método de Bradford (64)), la incubación se efectuó a 37°C durante 60

minutos con agitación continua (Incubador Metabólico Dubnoff, Precision Scientific), en presencia de esteroide marcado radiactivamente (DHT-³H o DMNT-³H) a diferentes concentraciones (0.25-2.0 nmol/L) o bien sólo a concentración de saturación (2.0 nmol/L), con o sin esteroide radioinerte en un exceso de 100 veces en relación al marcado radiactivamente. Al terminar la incubación los tubos se transfirieron a hielo y se agregaron 6 ml de solución TS fría (Tris-Base 200 mmol/L, pH 7.4 a 4°C, NaCl 0.9%) y se agitaron, se centrifugaron a 1200 g durante 5 minutos a 4°C, el precipitado celular se lavó tres veces mas usando 5 ml de la solución TS y centrifugando en las mismas condiciones, finalmente el precipitado celular se resuspendió en 0.5 ml de agua desionizada y se transfirió a frascos limpios, cada tubo se lavó con 0.5 ml de etanol absoluto el cual se transfirió a los mismos frascos, a cada frasco se le añadieron 5 ml de Instagel, se agitaron, se limpiaron y se dejaron en reposo en obscuridad durante toda la noche, finalmente se midió la radiactividad.

Captación de esteroides en los núcleos celulares

La captación de esteroides en los núcleos celulares se efectuó en una manera similar a la descrita para la captación de esteroides en células completas hasta el momento de lavar las células. Posteriormente el precipitado celular se resuspendió en 1.4 ml de solución hipotónica (Tris-Base 200 mmol/L, pH 7.4 a 4°C, cloruro de magnesio 0.5 mmol/L, cloruro de calcio 1.0 mmol/L) y se dejó en reposo sobre hielo durante 15 minutos, la suspensión celular se homogeneizó en un homogeneizador de vidrio con pistilo de teflón, se agregaron 0.2 ml de solución hipertónica (Tris-base 200 mmol/L, pH 7.4 a 4°C, sacarosa 2.2 mol/L, cloruro de magnesio 0.5 mmol/L, cloruro de calcio 1.0 mmol/L) y se agitó, el homogenado se centrifugó a 800 g durante 15 min. a 4°C, el precipitado se resuspendió en 3 ml de solución isotónica

(Tris-Base 200 mmol/L, pH 7.4 a 4°C, sacarosa 0.32 mol/L, cloruro de magnesio 1.0 mmol/L) y se centrifugó en las mismas condiciones, el precipitado se resuspendió en solución Isotónica-T (solución isotónica con tritón X100 al 0.2 %), se dejó reposar sobre hielo durante 10 min y se centrifugó en las mismas condiciones, finalmente el precipitado se lavó una vez con solución TE (Tris-Base 2 mmol/L, pH 7.4 a 4°C, EDTA 0.15 mmol/L), cada precipitado nuclear fue resuspendido en 0.5 ml de agua desionizada y para medir la radiactividad se tomaron alícuotas de 0.1 ml a los cuales se les agregó 0.5 ml de etanol, se agitaron y se agregaron 5 ml de Instagel. De la misma suspensión nuclear se tomaron alícuotas de 0.02 ml para medir el contenido de DNA (Método de Santoianni y Ayala (65)).

Obtención de Citosol

Los fibroblastos se obtuvieron por tripsinización (al menos 50 millones de células por línea) y se depositaron en tubos que contenían inhibidor de tripsina (1 mg/ml) y se centrifugaron a 1000 g durante 5 min a 4°C. El precipitado celular se lavó con solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS, KCl 2.7 mmol/L, KH_2PO_4 1.47 mmol/L, NaCl 140 mmol/L, Na_2HPO_4 15 mmol/L, pH de 7.4) y se centrifugó en las mismas condiciones, el precipitado obtenido se resuspendió en solución TEDG (Tris-HCl 200 mmol/L pH 7.4 a 4°C, EDTA 1.5 mmol/L, ditioneitol (DTT) 0.25 mmol/L, glicerol 10 % v/v con o sin Na_2MO_4 10 mmol/L y aprotinina 5000 UK/ml), y se homogeneizó en un homogeneizador de vidrio con pistilo de teflón sobre hielo, el homogenado se centrifugó a 105 000 g durante 60 min a 4°C, el sobrenadante (citosol) se utilizó para hacer diversas incubaciones.

Curva de Saturación con Citosol

El citosol proveniente tanto de células normales como de los pacientes se incubó (volumen de incubación 200 μ l) con el esteroide marcado radiactivamente a diferentes concentraciones (0.25-2.0 nmol/L) con o sin un exceso de 100 veces del esteroide radioinerte, a 4°C durante 18 h, al terminar la incubación se separó lo libre de lo unido usando 800 μ l de carbón-dextran (250 mg de carbón, 25 mg de dextran (T-70) en 100 ml de TEDG), se incubó en hielo con agitación continua durante 5 min y se centrifugó a 2000 g durante 15 min a 4°C. Del sobrenadante se tomaron alícuotas de 200 μ l por triplicado, se agregaron 5 ml de Instagel y se midió la radiactividad. Los resultados se graficaron como curvas de saturación y para obtener las constantes fisicoquímicas se graficaron a la manera de Scatchard (66).

Gradientes de Sacarosa

El citosol obtenido de las células incubó con hormona radiactiva en una concentración de 2 nmol/L con o sin un exceso de 100 veces del esteroide radioinerte, durante 18 h a 4°C. Una vez efectuada la incubación se separó la hormona libre incubando con carbón-dextran (se centrifugaron 2 ml de la mezcla carbón-dextrán a 2000 g durante 15 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante por decantación y el precipitado se resuspendió en el citosol de la incubación, la suspensión se agitó durante 5 min sobre hielo y se centrifugó a 2000 g durante 15 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante). Se tomaron 400-500 μ l de citosol tratado con carbón dextran y se depositaron sobre gradientes lineales de sacarosa de 20 a 35% (20 o 35 g de sacarosa en 100 ml de solución TEDG), los gradientes se centrifugaron a 400 000 g durante 2.5 h a 4°C, al terminar la centrifugación cada gradiente se fraccionó y en cada fracción se midió la radiactividad.

RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos en los estudios de unión del andrógeno marcado radiactivamente con su receptor, los datos se ordenaron en cuatro grupos (A,B,C y D), reuniendo en cada grupo a las líneas celulares (pacientes) que comparten características similares.

Grupo A.

Las líneas celulares de este grupo son:44,178,(198,205,274),(471 y 472). Las líneas celulares agrupadas en paréntesis pertenecen a individuos de una misma familia.

Los resultados de estudios de retención de [³H]-DMNT en fibroblastos intactos de estos individuos, indicaron que las células no fueron capaces de mantener el andrógeno radiactivo intracelularmente, obteniéndose concentraciones de 0-1.7 fmol/mg proteína, los fibroblastos de individuos normales utilizados como controles, lograron retener al esteroide en una concentración de 34.5 fmol/mg P (± 20.5 fmol/mg proteína).

Al someter a ultracentrifugación en gradientes de sacarosa, los citosoles de fibroblastos previamente incubados con [³H]-DMNT, se observó que en el caso de individuos normales, la presencia de una zona de mayor radiactividad entre las fracciones 20 a 35 con un pico máximo en la fracción 27-28 como se observa en la figura 5. Este pico de radiactividad tuvo un coeficiente de sedimentación de 4.7 unidades Svedberg (S), estimado de acuerdo a la sedimentación observada para la albúmina sérica bovina (BSA), usada como marcador (coeficiente de sedimentación 4.6 S). El conteo de radiactividad de las fracciones del gradiente de los citosoles de

células mutantes (líneas celulares 44,198,471,472), no mostró radiactividad a través de todo el gradiente (línea celular 198 fig 5, línea celular 471 fig 6). Estos resultados permitieron establecer que en las células normales, hubo unión de $[H^3]$ -DHT a su receptor citoplasmático, mientras que en las células mutantes esta unión no se estableció.

En resumen, los hallazgos en las células mutantes provenientes de los pacientes 44,178,198,205,274,471 y 472, pertenecientes a cuatro familias fueron: a) ausencia de captación del andrógeno radiactivo en células completas, y b) ausencia de unión específica al receptor de andrógenos demostrada por la técnica de marcaje en gradientes.

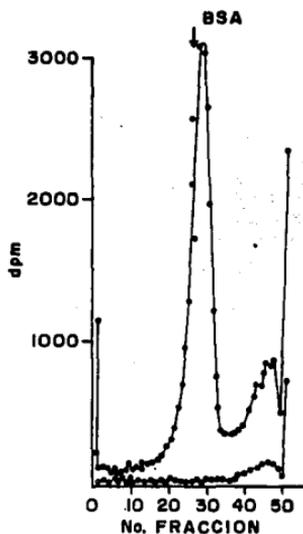


Figura 5. Análisis en gradientes de sacarosa de la unión del receptor de andrógenos en citosol de fibroblastos. Los citosoles se incubaron con $[H^3]$ -DHT 2 nmol/L, a 4°C, durante toda la noche y se depositaron en gradientes lineales de sacarosa conteniendo KCl 0.4 M, y se centrifugaron a 400 000 g, durante 2.5 h a 4°C. Se usó como marcador interno albúmina sérica bovina (BSA). (●-●) citosol de fibroblastos normales usado como control, (o-o) citosol de fibroblastos de paciente con feminización testicular completa (línea celular 198).

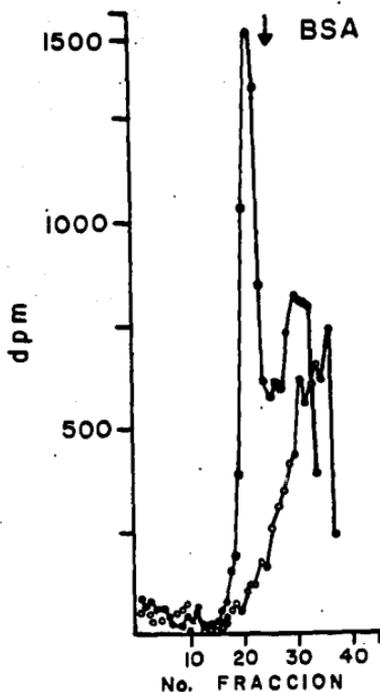


Figura 6. Sedimentación del complejo $[^3\text{H}]\text{-DHT-receptor}$ a través de gradientes lineales de sacarosa. El citosol extraído de fibroblastos se incubó con $[^3\text{H}]\text{-DHT}$ 2 nM, a 4°C durante toda la noche, y se depositó en gradientes lineales de sacarosa que contenían molibdato de sodio. Los gradientes se sometieron a centrifugación durante 2.5 h, a 4°C , a 400 000 g. (BSA) albúmina sérica bovina usada como marcador de sedimentación. (●) citosol de fibroblastos normales, (○) citosol de fibroblastos de una paciente con feminización testicular completa (línea celular 471).

Grupo B.

Las líneas celulares de este grupo: 276,277 y 278, provienen de una misma familia afectada con el SFT completo.

Los resultados de las incubaciones de fibroblastos intactos, en estas tres líneas celulares, con [³H]-DHT, indicaron que la hormona marcada radiactivamente era retenida intracelularmente, en una manera similar a los controles normales (fig 7), obteniéndose para la línea 276 de 28.39 fmol/mg proteína, para la 277; 28.74 fmol/mg proteína y para la 278; 20.73 fmol/mg proteína, mientras que en las células normales utilizadas como control la captación fue de 34.5 fmol/mg P (± 20.5 fmol/mg proteína).

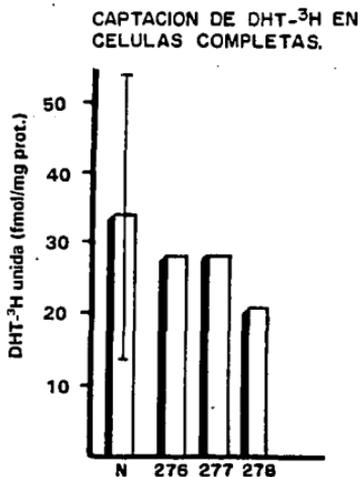


Figura 7

El análisis de la migración del complejo andrógeno tritiado-receptor a través de gradientes de sacarosa, mostró para la línea celular 278 una zona de mayor radiactividad entre las fracciones 12 a 20, tanto en gradientes que contenían molibdato de sodio, como en el que se omitió esta sal, indicando de esta manera la estabilidad de la unión entre la hormona y su receptor específico (fig 8). Los coeficientes de sedimentación fueron de 7.9 S para el complejo estabilizado con molibdato de sodio y de 8.2 S para el complejo que se formó en ausencia de esta sal. Resultados similares se observaron en células provenientes de individuos normales.

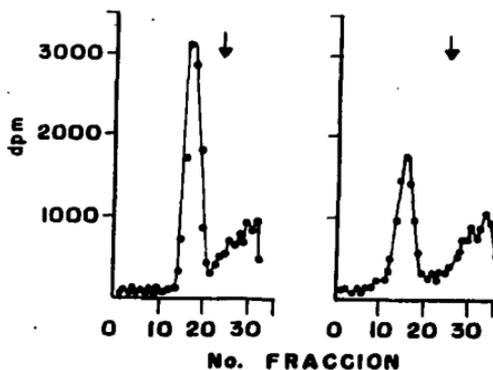


Figura 8. Sedimentación del complejo andrógeno-receptor a través de gradientes lineales de sacarosa. El citosol de la paciente con feminización testicular completa (línea celular 278), se incubó con [3 H]-DHT 2nM, en presencia (derecha), o en ausencia (izquierda), de molibdato de sodio 10 mM, a 4°C, durante 18 h. El citosol se depositó sobre gradientes de sacarosa (20-35%), y se centrifugó a 400 000 g durante 2.5 h a 4 C. (↓) sedimentación de albúmina sérica bovina. Resultados similares se encontraron en citosol de fibroblastos normales (datos no mostrados).

El análisis por saturación con hormona tritada del receptor de andrógenos en células de la línea celular 278, nos muestra una gráfica hiperbólica característica (fig 9), que al graficarse a la manera de Scatchard nos da una línea recta, en donde se calculó la constante de disociación ($K_d=1.32$ nmol/L), la cual es similar a la obtenida al incubarse citosol de células normales ($K_d=0.78$ nmol/L).

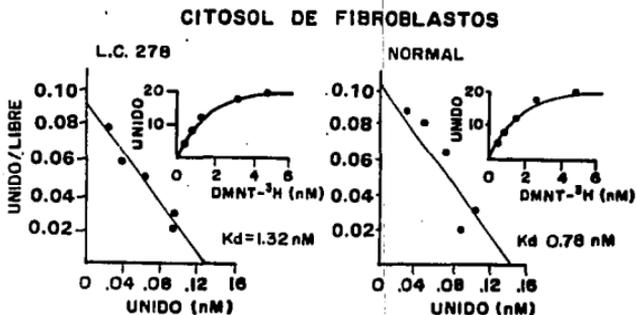


Figura 9. Análisis de saturación de la unión del receptor de andrógenos en citosol de fibroblastos. El citosol de fibroblastos se incubó con concentraciones crecientes de 3H -DMNT (indicados en el recuadro), en presencia, o en ausencia de DMNT radioinerte, en un exceso de 100 veces. Con los datos obtenidos se hicieron gráficas de Scatchard, calculándose las constantes de disociación (K_d) indicadas en la figura.

Los estudios efectuados en preparaciones nucleares de estos fibroblastos mutantes,

muestran en una curva de saturación (Línea 278), que la mayor captación es de 7.5 fmol/100 μ g DNA, mientras que los núcleos de células normales son capaces de unir hasta 30 fmol/100 μ g DNA (fig 10).

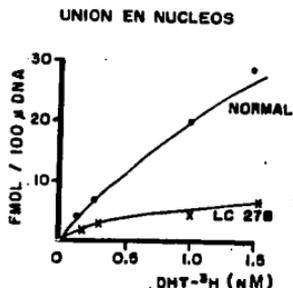


Figura 10. Análisis de saturación de la unión de [³H]-DHT en núcleos de fibroblastos. Los fibroblastos intactos se incubaron durante 1 h a 37°C con concentraciones crecientes de [³H]-DHT (0.125 a 1.5 nM), en presencia o ausencia de DHT radioinerte, en un exceso de 100 veces. Los núcleos se obtuvieron (ver material y métodos) y se midió la radiactividad retenida tanto en núcleos normales (●-●), como en núcleos de fibroblastos de una paciente con feminización testicular completa (línea celular 278).

En otros experimentos, al someter el extracto salino nuclear a ultracentrifugación en gradientes de sacarosa, los resultados indicaron, que en el extracto de núcleos normales se forma un pico de radiactividad con un coeficiente de sedimentación de 3.8 S, mientras que el perfil del extracto nuclear de la Línea 278, muestra una zona

de radiactividad significativamente menor que la observada en células normales, con un coeficiente de sedimentación similar (fig 11). Para demostrar que la unión en ambos casos fue específica, se realizaron gradientes con extractos nucleares incubados con hormona radiactiva, adicionados con hormona radioinerte en un exceso de 100 veces (DHT). La hormona radioinerte, desplazó en su totalidad la unión de la hormona marcada, en ambos experimentos.

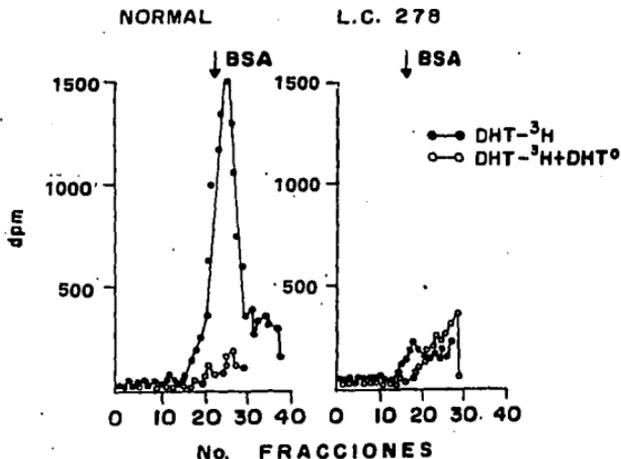


Figura 11. Sedimentación de $[^3\text{H}]$ -DHT unida a su receptor en extractos nucleares de fibroblastos. Fibroblastos intactos fueron incubados con $[^3\text{H}]$ -DHT 2 nM, con o sin DHT radioinerte, en un exceso de 100 veces a 37°C durante 1 h. Los núcleos se obtuvieron (ver material y métodos) y se incubaron a 4°C durante 1 h con solución amortiguadora conteniendo altas concentraciones de sal (KCl 0.5 M), el incubado se centrifugó a 105 000 g durante 1 h a 4°C y el sobrenadante se depositó en gradientes lineales de sacarosa 15 a 30 % y se centrifugaron a 400 000 g, durante 2.5 h, a 4°C . (♣) albúmina sérica bovina.

En resumen, los resultados obtenidos para el grupo B con tres individuos de una misma familia, fueron: a) la captación del andrógeno radiactivo en células intactas fue normal; b) el receptor citosólico fue similar al normal tanto en el coeficiente de sedimentación como en la Kd; c) la captación del andrógeno en núcleos de las células mutantes se encontró altamente disminuida; d) el complejo hormona-receptor nuclear analizado en gradientes de sacarosa, da un coeficiente de sedimentación similar al normal, pero en una cantidad mucho menor.

Grupo C

Este grupo incluyó únicamente a la línea celular 280.

La incubación de fibroblastos intactos con [^3H]-DHT en una concentración fija de 1 nmol/L, dio como resultado una baja incorporación de la hormona en las células provenientes de este paciente, con una concentración intracelular de 2.3 fmol/mg proteína (fig 12). Al hacer una curva de saturación con concentraciones crecientes (0.25-1.7 nmol/L) utilizando células intactas se obtuvieron resultados similares (fig 12).

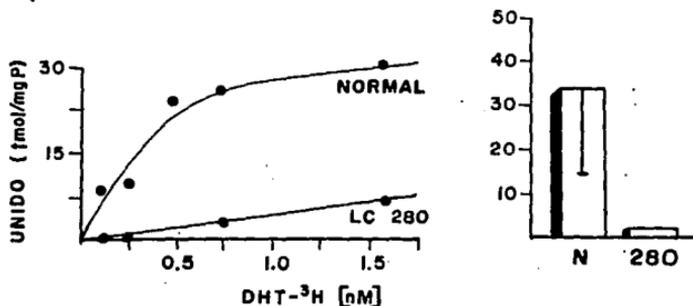


Figura 12. Captación de [^3H]-DHT en fibroblastos intactos. Fibroblastos intactos se incubaron a 37°C durante 1 h con [^3H]-DHT 2 nM (derecha), o con concentraciones crecientes (0.125 a 1.5 nM) (izquierda), en presencia o ausencia de DHT radioinerte en un exceso de 100 veces. Al terminar la incubación las células se lavaron y se midió la radiactividad retenida.

La incubación del citosol, obtenido de células de esta línea con [3 H]-DHT, a una concentración 1 nmol/L, y sometido a ultracentrifugación en gradientes de sacarosa, muestra la unión de la hormona a su receptor, dando un área de mayor radiactividad en las fracciones 19 a 26, con un coeficiente de sedimentación de 8S, similar a los obtenidos con los controles normales (fig 13).

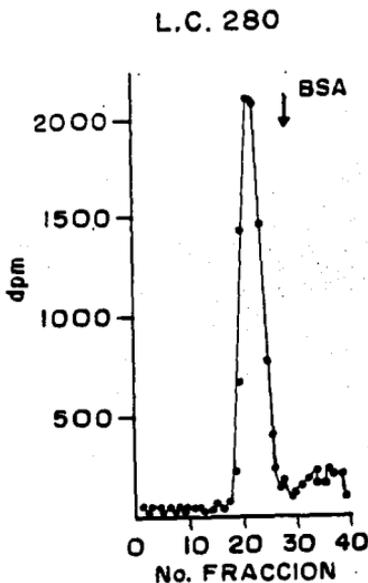


Figura 13. Patrón de sedimentación del complejo hormona-receptor a través de un gradiente lineal de sacarosa. El citosol de fibroblastos de una paciente con feminización testicular completa (LC 280) se incubó a 4°C durante 18 h con [3 H]-DHT 2 nM, y se depositó sobre un gradiente de sacarosa (20-35%). El gradiente se centrifugó a 400 000 g, durante 2.5 h, a 4 C. Un perfil similar se obtuvo con citosol de fibroblastos normales (no mostrado). BSA albúmina sérica bovina usado como marcador de sedimentación.

La curva de saturación incubando [^3H]-DMNT, en concentraciones de 0.25 a 4 nmol/L, muestra un aumento en la unión hasta llegar a la saturación, de una manera idéntica a la observada con preparaciones de citosol provenientes de células normales (fig 14).

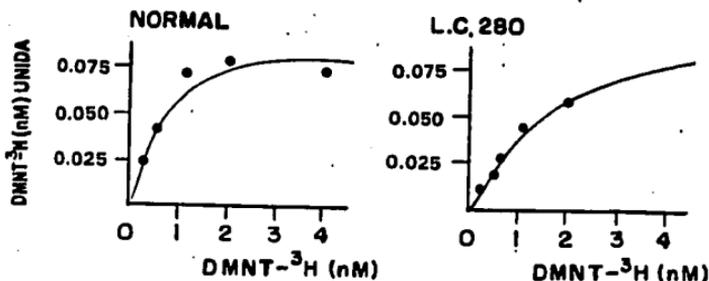


Figura 14. Análisis de saturación en la unión de [^3H]-DMNT al receptor de andrógenos. Los citosoles de fibroblastos normales y de la línea celular 280 se incubaron a 4°C , durante 18 h, con concentraciones crecientes de [^3H]-DMNT (0.25 a 4 nM), en presencia o en ausencia de DMNT radioinerte, en un exceso de 100 veces. El esteroide no unido se separó con carbón-dextran.

En resumen los hallazgos en este grupo son: a) en células intactas no hubo retención del andrógeno tritiado, b) en citosol la unión del complejo hormona-receptor fue similar al normal.

Grupo D

Este grupo incluyó a las líneas celulares 299 y 303, pertenecientes a una misma familia.

La incorporación de [³H]-DHT en células completas, en las líneas celulares estudiadas, fue similar a lo encontrado en células normales (299: 25.53 fmol/mg proteína, 303: 33.73 fmol/mg proteína) fig 15.

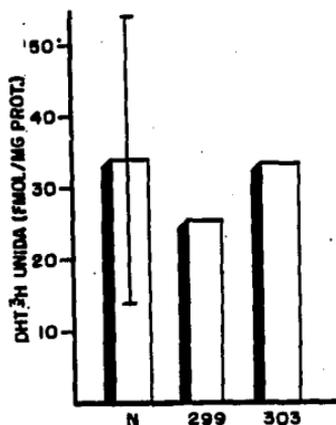


Figura 15. La captación de [³H]-DHT en fibroblastos intactos se estudió incubando los fibroblastos a 37°C durante 1 h con [³H]-DHT 2 nM, con o sin DHT radiométrica. Las células se lavaron repetidas veces y se midió la radiactividad retenida en ellas. 299 y 303; líneas celulares de pacientes con feminización testicular completa, N; promedio de captación encontrada en fibroblastos normales ± 1 DE.

El análisis del complejo hormona receptor a través de gradientes de sacarosa, resultó tanto para la línea celular 299 como para la 303 similar a los obtenidos con células normales (fig 16), obteniéndose un coeficiente de sedimentación para la línea 303 de 7.8 S y para la línea 299 de 8 S.

CITOSOL DE FIBROBLASTOS

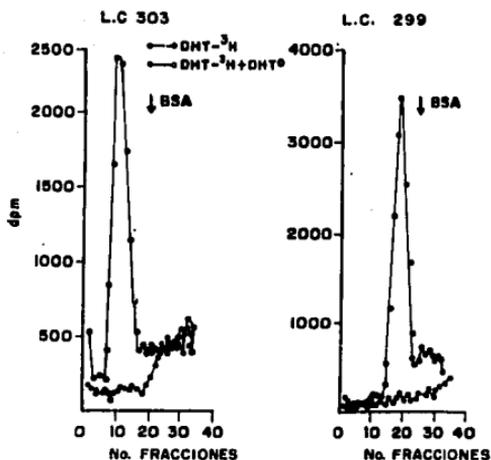


Figura 16. Patrón de sedimentación del complejo $[^3\text{H}]\text{-DHT}$ -receptor a través de gradientes lineales de sacarosa. Los citosoles de fibroblastos de la líneas celulares 303 y 299 se incubaron a 4°C , durante 18 h, con $[^3\text{H}]\text{-DHT}$ 2 nM, en presencia (o-o), o ausencia (●-●) de DHT radiactivo, en un exceso de 100 veces. El citosol incubado se depositó sobre gradientes lineales de sacarosa (20-35%), y se centrifugaron a 400 000 g, 2.5 h, a 4°C . BSA, albúmina sérica bovina, usada como marcador de sedimentación.

El estudio de captación nuclear se efectuó en la línea 303, observándose que al aumentar las concentraciones de $[^3\text{H}]\text{-DHT}$, se incrementó la captación hasta llegar a la saturación captándose hasta 46 fmol/ 100 μg DNA, que al compararse con lo obtenido en células normales, se encuentra dentro del rango normal (fig. 17).

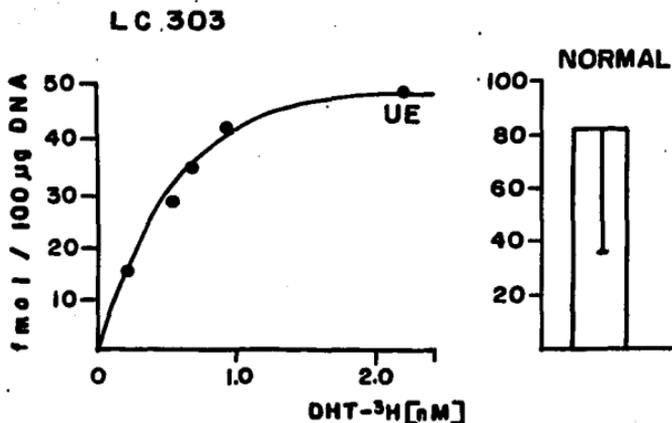


Figura 17. Captación de [³H]-DHT en núcleos de fibroblastos normales (derecha), y de la línea celular 303 (izquierda). Los fibroblastos intactos se incubaron con [³H]-DHT 2 nM, o concentraciones crecientes (0.125 a 2.4 nM), con o sin DHT radioinerte, en un exceso de 100 veces, a 37°C, durante 1 h. Posteriormente se obtuvieron los núcleos (ver material y métodos), y se midió la radiactividad retenida en ellos.

En resumen, este grupo estuvo caracterizado por no presentar diferencias en comparación con los normales, tanto en estudios en citosol como nucleares.

Resumen de los resultados:

Grupo A: No se detectó unión del andrógeno a su receptor.

Grupo B: Unión del receptor citoplasmático al andrógeno en forma normal. Retención nuclear muy baja.

Grupo C: Unión normal del andrógeno a su receptor citosólico. Unión en células completas, muy baja.

Grupo D: Todos los resultados fueron similares al control normal.

DISCUSIÓN

En este trabajo, se describen las características de unión del receptor de andrógenos, en un grupo de pacientes con Feminización Testicular Completa. Los resultados nos muestran, que estos pacientes a pesar de tener un mismo fenotipo, el origen en el bloqueo de la actividad de andrógenos se encuentra localizada a diferentes niveles. En el grupo A, el problema se localiza a nivel de la unión del andrógeno a su receptor, ya que no se logra retener la hormona tanto en células intactas, como al incubar citosol con la hormona. Estos datos concuerdan con los encontrados inicialmente por otros investigadores (67), y confirman que la presencia del receptor de andrógenos funcional, es una condición necesaria para la acción normal de la hormona. Con el conocimiento reciente de la estructura del gen del receptor de andrógenos, es posible elaborar teorías mediante las cuales se explique esta falta de unión del andrógeno a su receptor, así es sabido que el receptor andrógenos como todos los receptores para hormonas esteroides, pertenecen a una familia de factores de transcripción nuclear (68), y cada proteína tiene tres regiones especialmente importantes (fig 18): 1) La región amino terminal que es de tamaño variable, y que posiblemente tiene un papel de activador transcripcional, los epítopes de la mayoría de anticuerpos obtenidos contra receptores de esteroides están localizados en esta región hipervariable (69). 2) Un dominio central de unión al DNA rico en cisteínas, el cual está dividido en tres regiones (C1, C2 y C3), la región C1 contiene una homología mayor entre todos los receptores a esteroides, y consiste de 66-68 aminoácidos, en el cual 9 cisteínas están perfectamente conservadas, este dominio forma dos dedos de Zn, cada dedo está compuesto de cuatro cisteínas las cuales están coordinadas por una molécula de Zn, el asa del dedo contiene 12-13 aminoácidos y

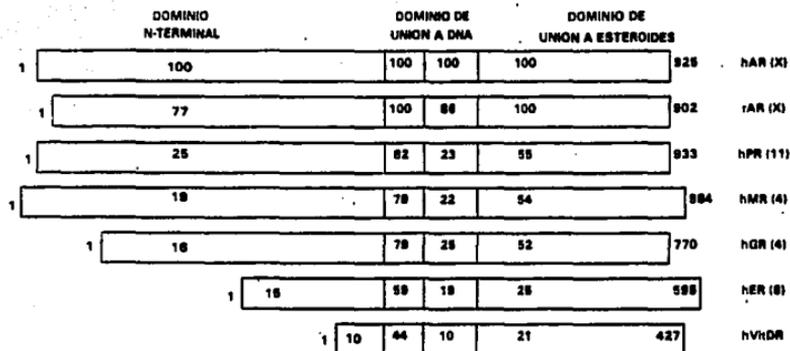


Figura 18. Esquema que representa la estructura de los receptores a hormonas esteroides. Los numeros a la derecha indican el número de aminoácidos de cada proteína receptora. Los numeros dentro de los rectángulos indican la homología en los diferentes dominios comparando con el receptor de andrógenos humano (hAR). Entre paréntesis se indica el cromosoma donde se encuentra el gen de cada uno de los receptores. rAR; receptor de andrógenos en rata, hPR; receptor de progesterona humano, hMR; receptor de mineralocorticoides humano, hGR; receptor de glucocorticoides humano, hER; receptor de estrógenos humano y hVitDR; receptor de vitamina D humano.

existe una región de 15-17 aminoácidos entre los dos dedos, las regiones C2 y C3 aunque están altamente conservadas existe menos homología entre los receptores a esteroides que la dada por la región C1 (70), estas regiones son hidrofóbicas y posiblemente tienen una participación en la unión de la hormona. 3) Las proteínas de los receptores tienen un dominio carboxilo terminal, en donde se encuentra la unión al ligando (71). Conocida la estructura del receptor, se puede pensar que, en los pacientes del grupo A en los cuales no se une el andrógeno a su receptor tienen, desde una delección completa del gen o alteraciones principalmente en la región carboxilo terminal donde se halla el dominio de unión a esteroides, estudios en otros pacientes han demostrado que la falta de unión puede ser debida a una delección completa del gen (72), de delección del dominio de unión de esteroides (73) o bien a mutaciones puntuales dentro de este dominio como se enlista en la siguiente tabla:

Posición del aminoácido	codón normal	codón mutado	Referencia
772	CGC (Arg)	TGC (Cis)	74
831	CGA (Arg)	CAA (Gln)	74
705	AAT (Asn)	AGT (Ser)	77
759	TCC (Ser)	TTC (Phe)	77
831	CGA (Arg)	TGA (Stop)	77
855	CGC (Arg)	TGC (Cis)	77
749	ATG (Met)	GTG (Val)	77
774	CGC (Arg)	TGC (Cis)	76
865	GTG (Val)	ATG (Met)	75

Las mutaciones puntuales, pueden originar el cambio de un aminoácido por otro, lo cual posiblemente altera la conformación del dominio de unión al esteroide, impidiendo que la molécula androgénica se acople debidamente, sin permitir la formación del complejo hormona receptor. En ausencia de hormona, el receptor no se une al DNA *in vitro*, ni afecta la transcripción *in vivo*, esta observación ha dado lugar a la hipótesis de que el dominio de unión a la hormona funciona como un represor de la función del receptor *in vivo* (78). Esta represión puede ser efectuada por diferentes mecanismos. El dominio por si mismo tal vez bloquea la unión a DNA y la activación del gen, manteniendo al receptor en un estado inactivo, la unión de la hormona podría resultar en un cambio conformacional del receptor, este cambio puede directamente exponer otros dominios funcionales o podría ser un efecto indirecto por transmisión de información a través de la molécula del receptor. El otro mecanismo posible de represión, podría involucrar la interacción del dominio de unión al esteroide con otras proteínas celulares, las cuales mantendrían al receptor en estado inactivo (70). Por otro lado, no se sabe si la acción del esteroide sobre la función del receptor es simplemente, la de proveer una señal inicial con la cual se activa el receptor, y si después de la activación ya no es requerido, o bien si es necesario en etapas posteriores.

En el grupo B, los resultados muestran que en estos individuos la unión de hormona al receptor citoplasmático es normal (figs 8,9) pero la retención nuclear está altamente disminuida (figs 10,11). Estos resultados concuerdan con la falta de actividad de los andrógenos en estos pacientes, ya que es necesario que el complejo hormona receptor llegue al núcleo para poder interactuar con el DNA y ejercer su acción. Como se sabe, en células eucariontes, existe un intercambio continuo de macromoléculas del citoplasma al nucleoplasma, y el transporte en ambas direcciones

se efectúa a través de los poros nucleares (79). La entrada de proteínas al núcleo es un proceso selectivo, las proteínas destinadas al núcleo, contienen sitios de localización nuclear (NLS), que es un pequeño trecho de aminoácidos específico y de características básicas, la secuencia de estos aminoácidos se ha encontrado que es: Pro-Lis-Lis-Arg-Lis-Val, estos aminoácidos interactúan con proteínas localizadas en el citoplasma, en la envoltura nuclear y/o en el complejo del poro nuclear. Después de la unión al complejo del poro nuclear, las proteínas son translocadas a través del poro al interior del núcleo, en una manera que requiere ATP. Estudios recientes (71), han demostrado que en ausencia de andrógenos el receptor se ubica en el área perinuclear, y al agregar andrógenos, el receptor se localiza exclusivamente en el núcleo, posiblemente la unión a la hormona da como resultado un cambio conformacional, permitiendo la exposición de grupos funcionales que permiten la entrada al núcleo. Sin embargo los estudios efectuados en los pacientes del grupo B indican que la unión del andrógeno a su receptor en el citoplasma es normal, pero el complejo hormona-receptor no se transloca al núcleo, una posibilidad puede ser que en estos pacientes se encuentren alterados los NLS, debido a una mutación en el gen que codifica para el receptor de andrógenos.

Los resultados encontrados en el paciente clasificado en el grupo C, indican que al exponer las células intactas a [³H]-DHT, estas no son capaces de retener la hormona intracelularmente, sin embargo al hacer estudios *in vitro* con la fracción citosólica, se observa que la unión del receptor de andrógenos, es igual que los controles normales. La diferencia en estos estudios, se encuentra en la presencia de la membrana celular (estudios en células completas) o su ausencia (estudios en citosol). Aunque es generalizada la teoría, de que los esteroides debido a su naturaleza lipídica son capaces de atravesar la membrana celular de una manera pasiva, los resultados

de estos estudios, indican que se tiene que considerar la posibilidad de que exista un tipo de transporte membranar específico para estas hormonas. Un caso similar, se ha observado en una línea celular mutante de linfoma de ratón (80), en donde las células no son capaces de responder a un glucocorticoide sintético; la dexametasona, pero responden normalmente a otro glucocorticoide muy parecido; el acetónido de triamcinolona. Los receptores de glucocorticoides en la línea mutante, no se asocian con dexametasona extracelular, pero se unen con una afinidad normal en extractos celulares. En relación a estos resultados, Yamamoto (81) concluye que la dexametasona atraviesa la membrana celular vía un acarreador de naturaleza proteica, más que por simple difusión. Sin embargo es necesario ahondar más en los estudios de la paciente del grupo C, para poder determinar la verdadera causa de este fenómeno.

Los pacientes del grupo D, presentan en los resultados, una unión normal del esteroide al receptor de andrógenos, inclusive su retención nuclear es normal, lo cual indica que no sólo la unión del andrógeno al receptor y la translocación del complejo hormona-receptor al núcleo, son eventos únicos para permitir la expresión del andrógeno. Se sabe que el complejo hormona-receptor, modula la transcripción de los genes de órganos blanco, mediante su interacción con secuencias específicas del gen. Estas secuencias son conocidas como elementos reguladores o de respuesta a hormonas (HRE), que actúan en cis. Los andrógenos interaccionan con una secuencia que se había probado para glucocorticoides y progesterona (82), por lo que el elemento de respuesta es común para los tres esteroides, la secuencia consenso es TGTTCT, además se encontraron 4 secuencias adicionales, separadas fuera de los sitios de unión a DNA, que fueron responsables para la activación diferencial de los tres tipos de hormonas (83), esto podría indicar que existen diferencias sutiles en los

sitios de contacto de los receptores con secuencias específicas de diferentes genes. La especificidad de la interacción del receptor con los HRE esta determinada en la región C1 en donde se encuentran los dedos de Zn. El acoplamiento del complejo hormona-receptor mediante los dedos de Zn es un paso indispensable para el inicio de la transcripción, se ha reportado una feminización testicular completa (84), con delección en el segundo dedo de Zn de aproximadamente 80 pares de bases que al recrearse *in vitro* y probarse en un ensayo de cotransfección, el receptor mutante no pudo activar la transcripción de un gen reportero andrógeno responsivo, lo que implica *in vivo* una dependencia del receptor de andrógenos por el segundo dedo de Zn y explica la insensibilidad completa a los andrógenos, mas aún la mutación puntual G--C que convirtió una arginina en prolina en la posición 615 (dentro del segundo dedo de Zn) encontrada en otro paciente con insensibilidad a andrógenos (85), da el mismo resultado, implicando de esta manera la importancia de esta zona del receptor altamente conservada. Los pacientes del grupo D, posiblemente tengan un defecto dentro de la zona de los dedos de Zn, lo que impide la expresión del andrógeno. Por otro lado estudios *in vitro* (86), suprimiendo el dominio amino terminal del receptor de andrógenos, dan como resultado un impedimento total en la actividad de activación transcripcional, sugiriendo que este dominio tiene un papel modular en la actividad promotora, al parecer se presentan interacciones proteína/proteína con factores de transcripción presentes en las células, lo que da especificidad a la célula blanco, debido a lo anterior otra posibilidad en los pacientes del grupo D es que tengan alguna alteración en la región amino terminal.

La caracterización del gen del receptor de andrógenos (87) hace posible desarrollar técnicas para identificar mutaciones o delecciones dentro del mismo. Estas técnicas incluyen el método de Southern blot para detectar alteraciones gruesas como una

delección; la amplificación de varios segmentos del gen del receptor de andrógenos mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa y el análisis de estos segmentos amplificados, mediante técnicas electroforéticas y métodos de secuenciación, dan como resultado la identificación de cambios sutiles en el gen como es la sustitución de un nucleótido.

Para comparar las capacidades de los receptores normales y mutantes de regular la transcripción génica, se pueden usar ensayos de genes reporteros responsivos al receptor de andrógenos.

La cuantificación del RNA mensajero permite, la detección de mutaciones en las cuales el funcionamiento de la proteína receptora no esta alterado, pero si influye en el estado de equilibrio del RNA mensajero del receptor de andrógenos (88).

Los estudios bioquímicos del receptor de andrógenos, en pacientes con Feminización Testicular Completa, presentados en este trabajo, indican una heterogeneidad en el origen de la falta de actividad de los andrógenos. Asimismo dan información acerca de la posible localización, de las alteraciones que impiden el funcionamiento adecuado de la proteína receptora, permitiendo enfocar, a regiones específicas del gen que codifica para el receptor de andrógenos, estudios a nivel molecular.

REFERENCIAS

1. Orchinik M, and McEwen B. (1993) Novel and classical actions of neuroactive steroids. *Neurotransmissions IX:1-6*
2. Pierce JG and Parsons TF (1981) Glycoprotein Hormones: Structure and Function. *Ann Rev Biochem* 50:465.
3. Mendelson C, Dufau ML and Catt KJ. (1975) Gonadotropin binding and stimulation of cyclic adenosine 3':5' monophosphate and testosterone production in isolated Leydig cells. *J Biol Chem* 250:8818.
4. Podesta EJ, Dufau ML and Catt KJ (1976) Cyclic adenosine 3':5' monophosphate dependent protein kinase of rat Leydig cells. Physical characteristics of two holoenzymes and their subunits. *Biochemistry* 17:1566.
5. Purvis K, Cusan L and Hansson V (1981) Regulation of steroidogenesis and steroid action in Leydig cells. *J Steroid Biochem* 15:77.
6. Mercier-Bodard C, Afsen A and Baulieu E-E. (1970) Sex steroid binding plasma protein (SBP). *Acta Endocrinol* 64:204.
7. Rosner W, Smith RN. (1975) Isolation and characterization of testosterone-estradiol-binding globulin from human plasma. Use a novel affinity column. *Biochemistry* 14:4813.
8. Bardin WC, Musto N, Gunsalus G, Kotire N, Cheng S-L, Larrea F and Becker R. (1981) Extracellular androgen binding proteins. *Annu Rev Physiol* 43:189.
9. Vermeulen A, Verdock L, Straeten MV, Opie N. (1969) Capacity of the testosterone-binding globulin in human plasma and influence of specific binding of testosterone on its metabolic clearance rate. *J Clin Endocrinol Metab* 29:1470.
10. Moore RJ and Wilson JD (1972) Localization of the reduced Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: 4-3-ketosteroid 5 α reductase in the nuclear membrane of the rat ventral prostate. *J Biol Chem* 247:958.
11. Bruchovsky N, Wilson JD (1968) The conversion of testosterone to 5 α -androstan-17 β -ol-3-one by rat prostate *in vivo* and *in vitro* *J Biol Chem* 243:2012.
12. Wilson EM and French FS (1979) Effects of proteases and protease inhibitors on the 4.5 S and 8 S Androgen Receptor. *J Biol Chem* 254:6310.

13. Liao S (1976) Receptors and mechanism of action of androgens. In: Receptors and mechanism of action of steroid hormones. Part I. Pascualini JR (Editor) Modern pharmacology-toxicology, Vol 8. Marcel Dekker Inc, New York and basel.
14. Meyer WJ III, Migeon BR and Migeon CJ (1975) Locus on human X chromosome for dihydrotestosterone receptor and androgen insensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* **72:1469**.
15. Migeon BR, Brown TR, Azelman J and Migeon CJ (1981) Studies on the locus for androgen receptor: localization on the human X chromosome and evidence for homology with the Tfm locus in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* **78:6339**.
16. Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS and Wilson EM (1988) Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* **240:327**.
17. Chang C, Kokontis J and Liao S (1988) Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* **240:324**.
18. Kuiper GGJM, Faber PW, van Rooij HCJ, van der Korput JAGM, Ris-Stalpers C, Klaassen P, Trapman J and Brinkmann AO (1989) Structural organization of the human androgen receptor gene. *J Mol Endocrinol* **2:R1**.
19. Huckaby CS, Conneely OM, Beattie WG, Dobson ADW, Tsai MJ and O'Malley BW (1987) Structure of the chromosomal chicken progesterone receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **84:8380**.
20. Ponglikitmongkol M, Green S and Chambon P (1988) Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *EMBO Journal* **7:3385**.
21. Welshons WJ and Russel LB (1959) The Y-chromosome as the bearer of male determining factors in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* **45:560**
22. Kofman-Alfaro S, Merchant-Larios H y Pérez-Palacios G (1982) Diferenciación sexual I. Bases biológicas del dimorfismo sexual. *Rev Invest Clin* **34:349**.
23. Tiepolo L and Zuffardi O. (1976) Localization of factors controlling spermatogenesis in the non fluorescent portion of the Y chromosome long arm. *Hum Genet* **34:119**.
24. Tanner JM et al (1959) Genes of the Y chromosome influencing male maturation in man. *Lancet* **II:141**.
25. Alvesalo L and Kari M. (1977) Size of deciduous teeth in 47 XYY males. *Am J Hum Genet* **29:486**.

26. Moore KL (1973) Aparato urogenital. Cap 13. En Embriología Clínica. Editorial Interamericana. México.
27. Witschi E (1948) Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. **Contr Embryol Carneg Instn 32:67.**
28. Grumbach M M, y Conte F A (1995). Disorders of sex differentiation. En: Williams textbook of Endocrinology. J D Wilson and D W Foster, Eds. WB Saunders Company. Philadelphia, USA.
29. Merchant-Larios H (1975) The onset of testicular differentiation in the rat: an ultrastructural study. **Am J Anat 145:319.**
30. Jost A, Vigier B, Prepin J and Perchellet JP (1973) Studies on sex differentiation in mammals. **Rec Prog Horm Res 29:1.**
31. Josso N, Picard J-Y and Tran D (1977) The Antimüllerian Hormone. **Rec Prog Horm Res 33:117.**
32. Josso N (1986) Antimüllerian Hormone: New perspectives for a sexist molecule. **Endocr Rev 7:421.**
33. Wilson JD and Lasnitzki I (1971) Dihydrotestosterone formation in fetal tissues of the rabbit and rat. **Endocrinology 89:659.**
34. Pérez Palacios G, Chávez B, Méndez JP, Imperato-Mcginley J, and Ulloa Aguirre A. (1987) The syndromes of androgen resistance revisited. **J Steroid Biochem 27:1101.**
35. Clark JH, Schrader WT and O'Malley BW (1985) Mechanism of steroid hormone action. In Williams Textbook of Endocrinology. JD Wilson and DW Foster Eds. WB Saunders Company. Philadelphia USA.
36. Moore RJ, Griffin JE and Wilson JD (1975) Diminished 5α reductase activity in extracts of fibroblasts cultured from patients with familial incomplete male pseudohermaphroditism type 2. **J Biol Chem 250:7168.**
37. Peterson RE, Imperato-McGinley J, Gautier T and Sturia E (1977) Male pseudohermaphroditism due to steroid 5α reductase deficiency. **Am J Med 62:170.**
38. Voigt W, Fernández EP and Hsia SL (1970) Transformation of testosterone into 17 β -hydroxy- 5α -androstan-3-one by microsomal preparations of human skin. **J Biol Chem 245:5594.**

39. Frederiksen DW and Wilson JD (1971) Partial characterization of nuclear reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: 4-3-ketosterid 5α -oxidoreductase of rat prostate. *J Biol Chem* **246:958**.
40. Andersson S, Bishop RW, and Russell DW. (1989) Expression cloning and regulation of 5α -reductase, an enzyme essential for male sexual differentiation. *J Biol Chem* **264:16249**
41. Labrie F, Sugimoto Y, Luu-The V, Simard J, Lachance Y, Bachvarov D, Leblanc G, Durocher F, and Paquet N. (1992) Structure of human type II 5α -reductase gene. *Endocrinology* **131:1571**.
42. Wilson JD, Griffin JE, and Russell DW. (1993) Steroid 5α -reductase 2 deficiency. *Endocr Rev* **14:577**
43. Morris JMcL (1953) The syndrome of testicular femization in the male pseudohermaphrodities. *Am J Gynecol* **65:1192**.
44. French F, Bagget B, Van Wyk JJ, Talbert LM, Hubbard W, Johnston FR, Weaver RP, Forchielli E, Rao GS and Sarda IR (1965) testicular feminization: Clinical, morphological and biochemical studies. *J Clin Endocrinol* **25:661**.
45. Ulloa Aguirre A, Méndez JP, Chávez B, Carranza Lira S, Angeles A, and Pérez Palacios G. (1990) Incomplete regression of Müllerian ducts in the androgen insensitivity syndrome. *Fert Steril* **53:1024**
46. Medina M, Chávez B and Pérez Palacios G (1981) Defective androgen action at the cellular level in the androgen resistance syndromes: I Differences between the complete and incomplete testicular feminization syndromes. *J Clin Endocrinol Metab* **53:1243**.
47. Griffin JE, Punyashthiti K and Wilson JD (1976) Dihydrotestosterone binding by cultured human fibroblast. *J Clin Invest* **57:1342**.
48. Griffin JE (1979) Testicular feminization associated with a thermolabile androgen receptor in cultured human fibroblast. *J Clin Invest* **64:1624**.
49. Griffin JE and Durrant JL (1982) Qualitative receptor defects in families with androgen resistance: failure of stabilization of the fibroblast cytosol androgen receptor. *J Clin Endocrinol Metab* **55:465**.
50. Brown TR, Maes M, Rothwell SW and Migeon CJ (1982) Human complete androgen insensitivity with normal dihydrotestosterone receptor binding capacity in cultured genital skin fibroblasts: evidence for a quantitative abnormality of the

receptor. **J Clin Endocrinol Metab** 55:61.

51. Kovacs WJ, Griffin JE, Weaver DD, Carlson BR, and Wilson JD. (1989) A mutation that causes lability of the androgen receptor under conditions that normally promote transformation to the DNA-binding state. **J Clin Invest** 73:1095
52. Madden JD, Walsh PC, MacDonald PC and Wilson JD (1975) Clinical and endocrinologic characterization of a patient with the syndrome of incomplete testicular feminization. **J Clin Endocrinol Metab** 41:751.
53. Pérez Palacios G, Morato T, Pérez AE, Castañeda E, and Gual C. (1971) Biochemical studies on the incomplete form of testicular feminization syndrome. **Steroids** 17:471.
54. Reifstein EC Jr (1947) Hereditary familial hypogonadism. **Clin Res** 3:86.
55. Lubs HA Jr, Vilar O and Bergenstal DM (1965) Familial male pseudohermaphroditism, hypospadias and gynecomastia (Reifstein syndrome) **Ann Intern Med** 62:252.
56. Gilbert-Dreyfus S, Sebauon CA and Belaisch J (1957) Étude d'un cas familial d' androgynoidisme avec hypospadias grave, gynecomastie et hyperoestrogenie. **Ann Endocrinol (Paris)** 18:93.
57. Rosewater S, Gwinup G and Hamwi GJ (1965) Familial gynecomastia. **Ann Intern Med** 63:377.
58. Larrea F, Benavides G, Scaglia H, Kofman-Alfaro S, Ferrusca E, Medina M, and Pérez Palacios G. (1978) Gynecomastia as a familial incomplete male pseudohermaphroditism type I: a limited androgen resistance syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 46:961
59. Wilson JD, Harrod MG, Goldstein JL, Hemsell DL and MacDonald PC (1977) Familial incomplete male pseudohermaphroditism type I: Evidence for androgen resistance and variable clinical manifestations in a family with the Reifstein syndrome. **N Engl J Med** 290:1097.
60. Eil C (1983) Familial incomplete male pseudohermaphroditism associated with impaired nuclear androgen retention. **J Clin Invest** 71:850.
61. Pinsky L, Kaufman M, Killinger DW, Burko B, Shatz D and Volpi R (1984) Human minimal androgen insensitivity with normal dihydrotestosterone binding capacity in cultured genital skin fibroblasts: evidence for an androgen selective qualitative abnormality of the receptor. **Am J Hum Genet** 36:965.

62. Pinsky L, Kaufman M and Levitsky LL (1987) Partial androgen resistance due to a distinctive qualitative defect of the androgen receptor. **Am J Med Genet** **27:459**.
63. Griffin JE, Kovacs WJ and Wilson JD (1985) Characteristics of androgen resistance. In regulation of androgen action (The proceedings of an international symposium, Montreal Canada, 1984). N Bruchousky, A Chapdelaine and F Neumann Eds. Congressdruck R Brückner, West Germany.
64. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** **72:248**.
65. Santoianni P and Ayala M (1965) Fluorometric ultramicroanalysis of deoxyribonucleic acid in human skin. **J Invest Dermatol** **45:99**.
66. Scatchard G (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. **Ann NY Acad Sci** **51:660**.
67. Keenan BS, Meyer WJ III, Hadjian AJ, Jones HW and Migeon CJ (1974) Syndrome of androgen insensitivity in man: absence of 5α -dihydrotestosterone binding protein in skin fibroblasts. **J Clin Endocrinol Metab** **38:1143**.
68. Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science** **240:1889**.
69. van Laar JH, Voorhorst-Ogink MM, Zegers ND, Boersma WJA, Claassen E, van der Korput JAGM, Ruizeveld de Winter JA, van der Kwast Th H, Mulder E, Trapman J and Brinkmann AO (1989) Characterization of polyclonal antibodies against the N-terminal domain of the human androgen receptor. **Mol Cell Endocrinol** **67:29**.
70. Carson-Jurica MA, Schrader WT and O'Malley BW (1990) Steroid receptor family: Structure and functions. **Endocr Rev** **11:201**.
71. Jenster G, van der Korput HAGM, van Vroonhoven C, van der Kwast TH, Trapman J and Brinkmann AO (1991) Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding transcriptional activation and subcellular localization. **Mol Endocrinol** **5:1396**.
72. Quigley CA, Friedman KJ, Johnson A, Lafreniere RG, Silverman LM, Lubahn DB, Brown TR, Wilson EM, Willard HF and French FS (1992) Complete deletion of the androgen receptor gene: Defenition of the null phenotype of the androgen insensitivity syndrome and determination of carrier status. **J Clin Endocrinol Metab** **74:927**.

73. Brown TR, Lubahn DB, Wilson EM, Joseph DR, French FS and Migeon CJ (1988) Deletion of the steroid-binding domain of the human androgen receptor gene in one family with complete androgen insensitivity syndrome: Evidence for further genetic heterogeneity in this syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* **85:8151**.
74. Marcelli M, Tilley WD, Zoppi S, Griffin JF, Wilson JD and Mc Phaul MJ (1991) Androgen resistance associated with a mutation of the androgen receptor at amino acid 772 (Arg--Cys) results from a combination of decreased messenger ribonucleic acid levels and impairment of receptor function. *J Clin Endocrinol Metab* **73:318**.
75. Kazemi-Esfarjani P, Beitel LK, Trifiro M, Kaufman M, Rennie P, Sheppard P, Matusik R and Pinsky L (1993) Substitution of Val-865 by Methionine or Leucine in the human androgen receptor causes complete or partial androgen insensitivity, respectively with distinct androgen receptor phenotypes. *Mol Endocrinol* **7:37**.
76. Brown TR, Lubahn DB, Wilson EM, French FS, Migeon CJ and Corden JL (1990) Functional characterization of naturally occurring mutant androgen receptors from subjects with complete androgen insensitivity. *Mol Endocrinol* **4:1759**.
77. De Bellis A, Quigley CA, Cariello NF, El-Awady MK, Sar M, Lane MV, Wilson EM and French FS (1992) Single base mutation in the human androgen receptor gene causing complete androgen insensitivity: rapid detection by a modified denaturing gradient gel electrophoresis technique. *Mol Endocrinol* **6:1909**.
78. Godowski PJ, Rusconi S, Miesfeld R, Yamamoto KR (1987) Glucocorticoid receptor mutants that are constitutive activators of transcriptional enhancement. *Nature* **325:365**.
79. Nigg EA, Baeverie PA and Lührmann R (1991) Nuclear import-export: In search of signals and mechanism. *Cell* **66:15**.
80. Johnson D, Newby RF and Bourgeois S (1984) Membrane permeability as a determinant of dexamethasone resistance in murine thymoma cells. *Canc Res* **44:2435**.
81. Yamamoto KR (1985) Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu Rev Genet* **19:209**.
82. Tsai SY, Carlstedt-Duke J-A, Weigel NL, Dahlman K, Gustafsson J-A, Sai M-J, O'Malley BW (1988) Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: Evidence for receptor dimer formation. *Cell* **55:361**.
83. Dato AC, Skroch P, Weinmann J, Butkeraitis P and Ponta P (1988) DNA sequences outside the receptor-binding sites differentially modulate the responsiveness of the

mouse mammary tumour. virus promoter to various steroid hormones. **EMBO Journal 7:1403.**

84. Quigley CA, Evans BAJ, Simental JA, Marschke B, Sar M, Lubahn DB, Davies P, Hughes IA, Wilson EM and French FS (1992) Complete androgen insensitivity due to deletion of exon C of the androgen receptor gene highlights the functional importance of the second zinc finger of the androgen receptor in vivo. **Mol Endocrinol 6:1103.**
85. Marcelli M, Zoppi S, Grino PB, Griffin JE, Wilson JD and McPhaul MJ (1991) A mutation in the DNA-binding domain of the androgen receptor gene causes complete testicular feminization in a patient with receptor-positive androgen resistance. **J Clin Invest 87:1123.**
86. Simental JA, Sar M, Lane MV, French FS and Wilson EM. (1990) Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. **J Biol Chem 266:510.**
87. Marcelli M, Tilley WD, Wilson CM, Griffin JE, Wilson JD and Mc Phaul MJ (1990) Definition of the human androgen receptor gene structure permits the identification of mutations that cause androgen resistance: premature termination of the receptor protein at amino acid residue 588 causes complete androgen resistance. **Mol Endocrinol 4:1105.**
88. Kuiper GGJM, Faber PW, van Rooij HCJ (1989) Structural organization of the androgen receptor gene. **J Mol Endocrinol:R1.**

PUBLICACIONES

Incomplete regression of Müllerian ducts in the androgen insensitivity syndrome*

Alfredo Ulloa-Aguirre, M.D.††
Juan Pablo Mendez, M.D.†
Bertha Chávez, Ph.D.†

Sebastian Carranza-Lira, M.D.†
Arturo Angeles, M.D.‡
Gregorio Perez-Palacios, M.D.†

Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán," Mexico City, Mexico

The biochemical and histological features of two related patients with the complete form of the androgen insensitivity syndrome (AIS) coexisting with incomplete regression of the Müllerian ducts are described. Both patients presented unilateral Müllerian derivatives (fallopian tube) identified by microscopic examination of surgically excised internal genital tissue. Biochemical studies performed in genital skin-derived fibroblasts from one of the affected subjects showed the existence of a specific and saturable 8.2 to 8.4 S cytosolic and 3.4 S nuclear androgen receptor exhibiting a Kd of 1.32 nmol/L. These mutant cells, however, clearly presented a significantly low maximal nuclear [³H]-5 α -dihydrotestosterone uptake (71.0 fmol/mg of deoxyribonucleic acid [DNA]; control strain, 284 fmol/mg DNA). Thus, an impaired uptake of the androgen receptor complex at the nuclear level was probably the cause of the complete absence of phenotypic expression of androgen action in this family. The overall findings are on line with the well-demonstrated genetic and molecular heterogeneity of the AIS. *Fertil Steril* 53:1024, 1990

Abnormal phenotypic development in males may be the result of either impaired androgen biosynthesis or defective androgen action.¹ Androgen resistance syndromes in humans are constituted by a wide and heterogeneous spectrum of different phenotypic and molecular abnormalities inherited as an X-linked recessive trait and may occur in any of the steps involved in the complex intracellular mechanism of action of androgens at the target tissue.² In its complete form (complete androgen in-

sensitivity syndrome [AIS]), this entity is characterized by a complete absence of virilization in phenotypic females with bilateral testes, male internal genitalia, and a 46,XY chromosomal complement. In these individuals, testes are well differentiated, and Wolffian derivatives are hypoplastic.³ Because no Müllerian derivatives are usually found, it is assumed that the function of the Müllerian inhibiting hormone remained intact during embryonic life. However, three sporadic cases with complete AIS who presented Müllerian remnants have been recently reported.⁴⁻⁶ We have proposed that the enhanced and unopposed estrogenic milieu existing in the complete AIS-developing embryo might interfere with the action of the Müllerian inhibiting hormone, resulting in the presence of Müllerian remnants in some of these individuals.⁶ In the present report we describe two related patients with complete AIS in whom microscopic examination of the gonads and the surrounding tissue disclosed the presence of Müllerian remnants.

Received November 13, 1989; revised and accepted February 20, 1990.

* Supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico City, Mexico; and by the World Health Organization Special Program in Research, Development, and Research Training in Human Reproduction, Geneva, Switzerland.

† Department of Reproductive Biology.

‡ Reprint requests: Alfredo Ulloa-Aguirre, M.D., Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición SZ, Vasco de Quiroga No. 15, 14000 Mexico, D.F., Mexico.

§ Department of Pathology.

MATERIALS AND METHODS

Clinical Summaries

The two patients (patient 1, 16 years old; patient 2, 10 years old) were sisters who were referred to our outpatient clinic because of unilateral inguinal herniae. Family history was relevant in that another 12-year-old sister presented a 46,XY karyotype and had been surgically explored at the age of 10 because of bilateral inguinal hernia. None of the patients had a history of in utero exposure to diethylstilbestrol. Patient 1 presented a normal telarche at the age of 12, and neither axillary nor pubic hair had developed, nor had menarche occurred. At admission, physical examination showed a height of 1.73 m with a normal upper-to-lower segment ratio. Breasts had a Tanner Stage 5 of development, and there was no axillary hair. Pubic hair was scanty (Tanner Stage 2). External genitalia were unambiguously female, and there was a blind-ended vagina 3 cm in depth. In the left inguinal canal a mass (4.0 × 3.0 cm) was detected. Chromosome analysis of peripheral lymphocytes and skin fibroblasts showed a 46,XY karyotype without structural abnormalities detected by the G-banding technique. Baseline serum concentrations of luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) were 22.5 mIU/mL and 4.7 mIU/mL (mean of 3 samples), respectively (normal adult males: 3 to 12 mIU/mL for LH and 0.5 to 5 mIU/mL for FSH). Serum testosterone (T) and 17- β -estradiol (E₂) levels were within normal limits for adult males (serum T, patient = 23 nmol/L, normal adult males = 13 to 33 nmol/L; serum E₂, patient = 176 pmol/L, normal adult males = 36 to 220 nmol/L).

Patient 2 had not presented pubertal development. Physical examination revealed a height of 1.38 m with a normal upper-to-lower segment ratio. Breasts were not developed (Tanner Stage 1) and there was no axillary nor pubic hair. External genitalia were unambiguously female; the vagina was 4.5 cm in depth and presented a blind end. In the right inguinal canal a mass of 3.5 × 1.0 cm was palpated. Chromosome analysis disclosed a normal 46,XY complement in peripheral lymphocytes and skin-derived fibroblasts. Baseline serum LH and FSH levels were 1.0 mIU/mL and 0.3 mIU/mL, respectively (normal prepubertal males: 0.5 to 5.0 mIU/mL for LH and 0.5 to 2.5 mIU/mL for FSH). Serum T and E₂ levels were within normal limits for normal male prepubertal children (serum T, patient = 0.97 nmol/L, normals = <2.4 nmol/L; serum E₂ < 48 pmol/L for patient and normals).

Methods

Serum LH and FSH were measured by specific double antibody radioimmunoassays (RIA) using reagents supplied by the Special Program on Research, Development and Research Training in Human Reproduction, World Health Organization (WHO) (Geneva, Switzerland). Results are expressed as milli-international units per milliliter according to the First International Reference Preparation. Intra-assay and interassay coefficients of variation were 6% and 11% for LH and 7% and 10% for FSH, respectively. Serum T was measured by a specific RIA after extraction and separation using celite chromatography as described by Abraham et al.⁷ Serum E₂ was measured by RIA after extraction without further chromatographic separation. Radiolabeled T and E₂ were purchased from New England Nuclear (Boston, MA). Interassay and intra-assay coefficients of variation were <10% and <8%, respectively, for both RIA systems.

In Vitro Studies

Incubation of [³H]-Androgens with Cytosols from Skin-Derived Fibroblasts

The fibroblast strains used in this study were established from explants of genital skin (labia majora or foreskin) obtained from Patient 1 and from normal males. The cultures were established, stored, and propagated as described previously.⁸ Cells from stock flasks were dispersed with 0.05% trypsin (Gibco, Grand Island, NY) and 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and the cellular suspension centrifuged at 900 × g during 5 minutes at 4°C in the presence of trypsin inhibitor. Pellets were resuspended in 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1.5 mM EDTA, 10% glycerol, and 5,000 UK/mL aprotinin (TEDGA) buffer with or without 10 mM sodium molybdate and then homogenized with a Teflon pestle. The homogenates were centrifuged at 105,000 × g for 60 minutes at 4°C. Supernatants (cytosols) were incubated at 4°C during 18 hours with different doses (0.3 to 5 nM) of [³H]-5 α -dihydrotestosterone (DHT) or [³H]-dimethyltestosterone (New England Nuclear) with or without an excess (200-fold) of nonradioactive androgen to assess nonspecific binding. At the end of the incubation period, cytosols challenged with [³H]-dimethyltestosterone in the presence or absence of unlabeled androgen were incubated during 10 minutes at 4°C with a 0.25% charcoal solu-



Figure 1 Photomicrograph of a Müllerian remnant (M) surrounding the left testis (T) excised from Patient 1.

tion containing 0.025% dextran T-70 in TEDGA buffer, centrifuged at $2,000 \times g$, and the supernatants submitted to radioactivity counting. Charcoal-treated cytosols from incubations with [3 H]-DHT at a dose of 2 nM in the presence or absence of nonradioactive DHT were applied on the top of 20% to 35% linear sucrose gradients containing TEDGA buffer with or without sodium molybdate; tubes were centrifuged at 65,000 rpm in a Beckman Rotor VTi 65 (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA) during 2.5 hours at 2°C. Forty fractions were collected and submitted to radioactivity counting.

Nuclear [3 H]-DHT Uptake Binding Assay and Sucrose Density Gradient

Nuclear uptake of [3 H]-DHT by mutant and normal cell lines was assessed as described previously.⁹ Cells were incubated with 0.2 to 1.5 nM [3 H]-DHT in the presence or absence of an excess (200-fold) unlabeled DHT for 45 minutes at 37°C in continuous shaking. After the incubation period, crude nuclei were obtained as described⁹ and analyzed for radioactivity content. Results are expressed as femtomole of bound [3 H]-DHT per milligram of deoxyribonucleic acid (DNA).¹⁰ For the sucrose density gradient study, crude nuclei from cells incubated with 2 nM [3 H]-DHT in the presence or absence of unlabeled DHT (200-fold) were redissolved in 500 μ L of Tris-HCl (10 nM)-KCl (0.4 M), pH 7.4, and centrifuged at $105,000 \times g$ in a Beckman Rotor SW 50.1 (Beckman Instruments, Inc.)

during 30 minutes at 4°C. Supernatants were applied on the top of 15% to 30% sucrose gradients containing 20 nM Tris-HCl, 1.5 mM EDTA, 0.25 mM dithiothreitol, 10% glycerol, and 0.4 M KCl and centrifuged at $404,000 \times g$ (Beckman Rotor VTi 65) at 4°C for 2 hours. Forty fractions were collected from the bottom of each tube and submitted to radioactivity counting.

RESULTS

Histopathological Findings

At laparotomy, bilateral abdominal testes were found in both patients. Gonads in Patient 1 measured $4.0 \times 2.5 \times 1.2$ cm (right) and $5.5 \times 3.2 \times 2.5$ cm (left), and there was no uterus recognizable on macroscopic examination. Both testes and their surrounding tissue were completely excised. Microscopic examination of the tissue revealed hyperplasia of Leydig cells and the presence of seminiferous tubules containing scanty spermatogonia and Sertoli cells. Adjacent to the testes, abundant myometrial tissue and a left fallopian tube were found (Fig. 1). Bilateral epididimides were also observed. In Patient 2, gonads measured $4.1 \times 1.0 \times 0.5$ cm (right) and $3.5 \times 2.0 \times 1.5$ cm (left); no Müllerian derivatives were observed macroscopically. Microscopic examination showed undifferentiated interstitial cells, scanty spermatogonia, and Sertoli cells. Adjacent to the right testis, a fallopian tube was clearly identified (Fig. 2). No Wolffian derivatives were identified.

In Vitro Studies

Figure 3 shows the saturation studies performed in cytosols obtained from the mutant and control



Figure 2 Photomicrograph of a fallopian tube (F) adjacent to the right testis excised from Patient 2.

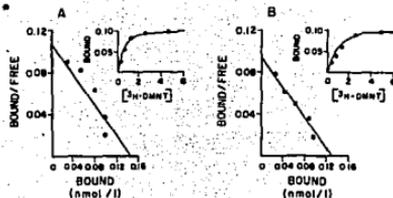


Figure 3 Representative Scatchard plot and saturation analysis (inset) of specific [^3H]-dimethylnortestosterone binding in cytosols from normal (A) and mutant (Patient 1) (B) fibroblasts; apparent K_d s of the androgen receptor were 0.78 and 1.32 nmol/L, respectively.

fibroblasts. Specific and saturable [^3H]-dimethylnortestosterone binding was found in cytosols from the patient's cells with a $K_d = 1.32$ nmol/L, similar to that yielded by the control cells ($K_d = 0.78$ nmol/L) and to those previously reported for the androgen receptor.¹¹ In the sucrose gradient centrifugation study, a 8.2 to 8.4 cytosol androgen receptor was clearly identified in the presence or absence of sodium molybdate in the mutant strain studied (not shown).

In the [^3H]-DHT nuclear uptake assay, the mutant cells exhibited a decreased nuclear uptake of this androgen as compared with fibroblasts from a normal control; maximal specific nuclear [^3H]-DHT uptake was 71.0 fmol/mg DNA in the mutant fibroblasts and 284.0 fmol/mg DNA in the normal strain (mean of triplicates). Sucrose density gradients disclosed the presence of a small but clearly discernible peak of [^3H]-DHT bound to a 3.4 S nuclear androgen receptor (not shown).

DISCUSSION

The regression of Müllerian derivatives in the male embryo depends on the action of the Müllerian inhibiting hormone, whereas maturation of Wolffian derivatives has been attributed to T.³ Persistence of Müllerian derivatives in males results in a form of pseudohermaphroditism, whose genetic transmission is suggestive of either an X-linked recessive or a dominant sex-limited trait involving the synthesis of the Müllerian inhibiting hormone molecule or of its putative receptor on the target duct.¹² In the majority of the reported patients with complete AIS, a complete regression of Müllerian derivatives has been documented.³ However, in the last few years three sporadic cases of patients bear-

ing the complete AIS mutation and Müllerian derivatives or remnants have been described.⁴⁻⁶ Although this association appears to be recently informed, several sporadic reports were included in the original description of the testicular feminization syndrome made by Morris.¹³ We have previously proposed⁶ that the presence of Müllerian remnants in these few patients with complete AIS may be due to the unopposed action of estrogens in the complete AIS embryo, a possibility supported by the observation that estrogens play an important role on the modulation of internal genital duct growth and development in birds¹⁴ as well as in mammals,¹⁵ effects that may be counteracted by androgen administration. Since the persistence of Müllerian derivatives is rather an infrequent than a common feature of the AIS, this hypothesis must imply the existence of differences in the extent of expression of the androgen resistance within the population with complete AIS, as suggested by the findings reported by Ulloa-Aguirre et al.,¹⁶ and Hughes and Evans.^{11,17} The variable degree of the incomplete Müllerian regression observed in these subjects³⁻⁶ is on line with the well-demonstrated genetic and molecular heterogeneity of the complete AIS disorder.^{2,18}

Alternative explanations for the persistence of Müllerian ducts in patients with complete AIS, such as the coexistence of two independent mutations or the occurrence of an early testicular descent with removal of the Müllerian structures from beyond the effective range of the Müllerian inhibiting hormone,⁵ seem unlikely. In the former, the relatively large number of patients with complete AIS in whom the persistence of Müllerian ducts has been noticed and in the latter, the still controversial issue as to whether the Müllerian inhibiting hormone is a local or a long-distance acting factor needs to be considered.¹⁹

The biochemical studies performed in genital skin fibroblasts from one of the affected siblings with complete AIS clearly revealed the presence of an apparently normal cytosol androgen receptor in terms of sedimentation coefficient and dissociation constant. However, this receptor was barely detected at the nuclear level, a finding that correlated with the significantly decreased maximal nuclear uptake of DHT. Assuming that both subjects with complete AIS share the same inherited molecular abnormality, these findings strongly suggest the existence of a defective mechanism of androgen action at the nuclear level as the cause of androgen resistance in this family. Whether this defect is the

consequence of an unidentified biochemical abnormality in the cytosolic androgen-binding protein or the nuclear acceptor for the androgen-receptor complex (a postreceptor defect) cannot be ascertained by the present study.

In summary, we have described herein the familial occurrence of Müllerian remnants coexisting with the receptor-positive variant of the complete AIS. Further studies are required to establish the causal relationship between these two abnormalities in the building-up of the male phenotype.

Acknowledgments. The authors are indebted to WHO, Geneva, Switzerland, for the provision of the RIA reagents utilized in the present study. Juan Pablo Mendez, M.D., is a postdoctoral fellow supported by a Programa Universitario de Investigación en Salud-Universidad Nacional Autónoma de México fellowship award.

REFERENCES

- Wilson JD, MacDonald PC: Male pseudohermaphroditism due to androgen resistance: testicular feminization and related syndromes. In *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*, Edited by JB Stanbury, JB Wyngaarden, DS Fredrickson. New York, McGraw-Hill, 1978, p 894
- Griffin JE, Wilson JD: The syndromes of androgen resistance. *N Engl J Med* 302:198, 1980
- Perez-Palacios G, Chavez B, Mendez JP, Imperato-McGinley J, Ulloa-Aguirre A: The syndromes of androgen resistance revisited. *J Steroid Biochem* 27:1101, 1987
- Oka M, Katabuchi H, Munemura M, Mizumoto J, Maeyama M: An unusual case of male pseudohermaphroditism: complete testicular feminization associated with incomplete differentiation of the Müllerian duct. *Fertil Steril* 41: 154, 1984
- Dodge ST, Finkelston MS, Miyasawa K: Testicular feminization with incomplete Müllerian regression. *Fertil Steril* 43:937, 1985
- Ulloa-Aguirre A, Mendez JP, Angeles A, Fernandez del Castillo C, Chavez B, Perez-Palacios G: The presence of Müllerian remnants in the complete androgen insensitivity syndrome: a steroid hormone-mediated defect? *Fertil Steril* 45:302, 1986
- Abraham GE, Manlitos FS, Garza R: Radioimmunoassay of steroids. In *Handbook of Radioimmunoassay*, Edited by GE Abraham. New York, Marcel Dekker, Inc., 1977, p 591
- Moore RJ, Griffin JE, Wilson JD: Diminished 5 α -reductase activity in extracts of fibroblasts cultured from patients with familial incomplete male pseudohermaphroditism Type 2. *J Biol Chem* 250:7168, 1975
- Ulloa-Aguirre A, Chavez B, Mendez JP, Sanvedra D, Perez-Palacios G: Inherited impairment of nuclear androgen uptake as a cause of familial androgen insensitivity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 28:317, 1988
- Santoianni P, Ayala M: Fluorometric ultramicroanalysis of deoxyribonucleic acid in human skin. *J Invest Derm* 45:99, 1965
- Hughes IA, Evans BAJ: The fibroblast as a model for androgen resistant states. *Clin Endocrinol (Oxf)* 28:565, 1988
- Josso N: AntiMüllerian hormone: new perspectives for a sexist molecule. *Endocr Rev* 7:421, 1986
- Morris JM: The syndrome of testicular feminization in male pseudohermaphroditism. *Am J Obstet Gynecol* 65: 1192, 1953
- MacLaughlin DT, Hutson JM, Donahoe PK: Specific estradiol binding in embryonic Müllerian ducts: a potential modulator of regression in the male and female chick. *Endocrinology* 113:141, 1983
- Driscoll SG, Taylor SH: Effects of prenatal maternal estrogen on the male urogenital system. *Obstet Gynecol* 56:537, 1980
- Ulloa-Aguirre A, Chavez B, Bassol S, Mendez JP, Perez-Palacios G: A new inherited variant of the androgen resistance syndrome. (Abstr. P-306) *Prostate* 5:PS355, 1984
- Hughes IA, Evans BAJ: Complete androgen insensitivity syndrome characterized by increased concentration of a normal androgen receptor in genital skin fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 63:309, 1986
- Lubahn DB, Brown TR, Simental JA, Higgs HN, Migeon CJ, French FS: Cloning, sequencing and amplification by the polymerase chain reaction of coding exons in the human androgen receptor gene in normal and androgen insensitive genetic males. (Abstr. P-621). Presented at the 71st Annual Meeting of the Endocrine Society, Seattle, Washington, June 21 to 24, 1989. Published by the Endocrine Society in the Program Supplement, 1989, p 178
- Vigier B, Picard JY, Bezaud J, Josso N: AntiMüllerian hormone: a local or a long distance morphogenetic factor. *Hum Genet* 58:85, 1981