

03068

9  
2  
6

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL  
Y DE POSGRADO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR A ANDRÓGENOS EN EL  
PÁNCREAS DE LA RATA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRA EN  
CIENCIAS FISIOLÓGICAS

PRESENTA

BIOL. LIDYA SUMIKO MORIMOTO MARTÍNEZ

México, D.F.

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
DE LA REPRODUCCIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICIÓN  
"SALVADOR ZUBIRAN" BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. VICENTE DÍAZ SÁNCHEZ  
Y EL DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES, CON EL APOYO DE LA BECA  
PARA MAESTRÍA DEL CONACYT.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A MIS AMIGOS DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN, QUIENES DE UNA U OTRA  
FORMA ME APOYARON DURANTE LA MAESTRÍA Y EN LA ELABORACIÓN DE  
ESTA TESIS.**

A MI FAMILIA...  
CON TODO MI AMOR

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN  | 1  |
| SUMMARY  | 2  |
| INTRODUCCIÓN   | 3  |
| El páncreas  | 3  |
| Descripción general  | 3  |
| Desarrollo del páncreas  | 4  |
| Aspectos morfológicos  | 4  |
| Aspectos moleculares   | 5  |
| Las hormonas esteroides en la función pancreática  | 5  |
| Proteínas que unen hormonas esteroides en el páncreas                                    | 5  |
| Las hormonas esteroides en la función secretora del páncreas                             | 6  |
| Capacidad de biotransformación de esteroides por el páncreas                             | 7  |
| Las hormonas esteroides y el cáncer de páncreas  | 7  |
| Regulación de la expresión genética  | 10 |
| Diferentes elementos que intervienen en la transcripción                                 | 10 |
| Los promotores   | 10 |
| Los potenciadores y silenciadores  | 11 |
| Regulación de la transcripción por hormonas esteroides                                   | 14 |
| Estructura y función de los receptores a hormonas esteroides                             | 16 |
| El receptor de andrógenos  | 19 |
| HIPÓTESIS  | 22 |
| PROPÓSITO Y OBJETIVOS  | 22 |
| MATERIAL Y MÉTODOS   | 23 |
| Extracción de RNA total  | 23 |
| Análisis por "Northern blot"   | 23 |
| Diseño de oligonucleótidos iniciadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 24 |
| Grupos de trabajo  | 25 |
| Reacción conjunta transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)     | 26 |
| Análisis de los productos de PCR por "Southern blot"                                     | 27 |
| Análisis densitométrico  | 28 |

|  |    |
|--|----|
| RESULTADOS                                 | 29 |
| Extracción del RNA total                   | 29 |
| Análisis del RNA por "Northern blot"       | 30 |
| Expresión del RA en el páncreas de la rata | 31 |
| DISCUSIÓN                                  | 36 |
| REFERENCIAS                                | 43 |

## RESUMEN

En diversos modelos animales de carcinogénesis pancreática inducida, se ha observado una relación directa entre la aparición y desarrollo del tumor y los andrógenos. Estas observaciones se apoyan con algunos estudios clínicos en pacientes con cáncer de páncreas, donde se ha encontrado una mayor incidencia del carcinoma de páncreas en hombres que en mujeres, además de haber encontrado concentraciones alteradas de andrógenos en pacientes con esta neoplasia en comparación con sujetos control. A pesar de estos antecedentes, y aunque existen algunos estudios de detección de receptores a esteroides en el páncreas, no se tiene conocimiento de estudios a nivel molecular del receptor de andrógenos en este órgano, por lo que el presente trabajo tuvo como objetivo principal, el estudiar la expresión y regulación hormonal del receptor a andrógenos (RA) en el páncreas, en el modelo experimental de la rata. Por medio de la reacción combinada de la transcriptasa reversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), se detectó el RNAm del RA a partir de RNA total de tejido pancreático. Se observó una mayor expresión del RA en el páncreas de los machos gonadectomizados en comparación con los machos intactos, lo que indica que la expresión del RA es regulada negativamente por andrógenos. Esta regulación por los andrógenos pudo confirmarse al observar que en los machos castrados y substituidos con testosterona, la expresión del RNAm del RA fue aún más baja que en los machos intactos. La expresión del RA encontrado en ratas hembras y en ratas recién nacidas, fue mayor que en los machos intactos. Al estudiar la expresión del RNAm del RA en diferentes grupos de ratas hembra, se demostró que los estrógenos participan también en la regulación del RA en el páncreas. En las ratas prepúberes y púberes se encontraron concentraciones mayores de RNAm del RA que en las ratas adultas. Las ratas castradas muestran una expresión mayor que las ratas intactas, pero comparativamente menor que las ratas prepúberes y púberes. Con los resultados obtenidos podemos concluir que la expresión del RA en el páncreas de la rata, es regulada diferencialmente en hembras y en machos. En los machos es regulada por los andrógenos circulantes, de manera similar a lo observado en los tejidos andrógeno-dependientes, mientras que en las hembras los estrógenos actúan como reguladores heterólogos del RA disminuyendo su expresión de la misma forma que sucede en ciertos órganos sensibles a la acción de los estrógenos.



## SUMMARY

In several animal models of pancreatic cancer and in some clinical studies, it has been observed a positive relationship between the administration of androgens and/or the male gender in the development of malignant pancreatic tumours. Epidemiological data shown that pancreatic cancer affects more men than women. In patients with pancreatic cancer there are alterations in the serum androgen concentrations compared with normal subjects. In spite of this antecedents and although there are some studies on the detection of steroid hormone receptors in the pancreas, to our knowledge there is not molecular demonstration of the presence of the androgen receptor nor for the transcripts of the AR gene in this organ. The present work had as a main objective the study of the expression and hormonal regulation of the androgen receptor (AR) gene in rat pancreas. Reverse transcription, polymerase chain reaction (RT-PCR) and Southern blotting were the methods employed for detection of the androgen receptor messenger ribonucleic acid (AR-mRNA). The data obtained showed that the AR expression in gonadectomized males was greater than intact males suggesting that AR expression is down regulated by androgens. The regulatory effect of the androgens was confirmed by the reduction of the AR expression after administration to the castrated animals. On the other hand the study of the expression of AR gene in the female rats demonstrated that the estrogens also had an effect in the regulation of the AR in pancreas, in this regard prepuberal and puberal female rats had higher levels of AR mRNA than intact and castrated female adult rats. In summary, AR expression was differentially modulated between male and female rats. In male pancreas it seems that the androgenis mileu is the main regulatory factor, similarly to the effects reported for the classical androgen responsive organs, whereas in the female rat pancreas there was a heterologous AR regulation by estrogens. The later effect is similar to the data reported for estrogen sensitive organs.

## INTRODUCCIÓN

### El páncreas

#### Descripción general

El páncreas está situado en la cavidad abdominal, detrás del estómago. En muchas especies de mamíferos está situado entre el bazo y el duodeno.

Macroscopicamente el páncreas se divide en tres regiones: cabeza, cuerpo y cola. Su estructura es heterogénea, está formado por el tejido acinar, que representa la mayor parte del órgano; y los islotes de Langerhans, que constituyen entre el 1 y 2 % del volumen del páncreas.

El páncreas es una glándula de secreción mixta (endócrina y exócrina), pues sus productos de secreción tienen diferentes rutas de liberación. La parte exócrina del páncreas está formada por células acinares que secretan jugos digestivos hacia el ducto pancreático alcanzando así el lumen del intestino delgado. El páncreas endócrino consta de pequeñas masas de células o islotes de Langerhans, embebidas en el tejido acinar. Los islotes de Langerhans están formados por varios tipos de células: las A, B, D y F.

Las células B ( $\beta$ ) son las más numerosas, (60%) y se localizan en el centro del islote, las células A y D se hallan en la periferia y las F se concentran solamente en los islotes de la cabeza del páncreas.

En las células A se sintetiza principalmente glucagon, hormona que promueve la glucogenólisis en el hígado cuando los niveles circulantes de glucosa disminuyen.

Las células  $\beta$  se encargan de la producción de insulina, hormona que tiene un papel muy importante en el metabolismo de los carbohidratos. El efecto mejor conocido de la insulina es el hipoglucemiante. Su efecto neto es incrementar el almacenamiento de glucosa, grasas y proteínas por el músculo, células adiposas y el hígado.

Las células D y F sintetizan somatostatina y péptido pancreático respectivamente, la somatostatina tiene una amplia variedad de efectos en la función gastrointestinal, así mismo inhibe la secreción de insulina y glucagon. El péptido pancreático se ha reportado como inhibidor de secreciones exócrinas, aunque no en mamíferos (Norris D.O., 1980; Griffin J.E.

and Ojeda S.R., 1992).

### Desarrollo del páncreas

**Aspectos morfológicos.** El primer signo morfológico de desarrollo del páncreas en la rata es la aparición de una evaginación dorsal del intestino anterior a nivel del divertículo ventral del hígado, alrededor del día 11 de la gestación. Doce horas después se desarrollan dos lóbulos pancreáticos independientes, el rudimento dorsal y el ventral. Ambos rudimentos crecen juntos y hacia los días 16 y 17 se vuelven una sola masa pancreática. El patrón característico de los lóbulos pancreáticos separados por el mesénquima y drenados por ductos, es visible en el día 12, y ya está bien desarrollado en los días 16 y 17.

La fusión de los rudimentos ventral y dorsal da una gran variedad de posibles fusiones y rearrreglos del sistema principal de ductos en el páncreas posnatal. Dichas fusiones pueden ocurrir entre los elementos del páncreas exócrino como una anastomosis de los ductos y el tejido acinar. Este patrón de anastomosis ha sido descrito en el páncreas fetal e indica que esta organización estructural puede estar presente durante el desarrollo.

El epitelio pancreático, es inicialmente de una célula de grosor, como el del intestino anterior del cual se origina. Poco tiempo después se vuelve mucho más delgado y se describe como pseudoestratificado o estratificado. La apariencia ultraestructural de la célula epitelial del páncreas es indistinguible de las otras células del intestino fetal alrededor del día 14, a excepción de las células productoras de glucagón que pueden ser observadas varios días antes.

La citodiferenciación de las células acinares comienza en el día 15 y al mismo tiempo, se incrementa la capacidad de síntesis de las enzimas secretoras y el almacenamiento de sus productos. Estos cambios continúan a lo largo de la vida fetal y después del nacimiento. Las células acinares alcanzan su tamaño adulto alrededor de las cuatro semanas. Las células exócrinas que retienen la apariencia de células no diferenciadas entre los días 12 al 14, son llamadas células ductales en el páncreas ya diferenciado. Estas células comprenden un sistema tubular epitelial a través del cual, las secreciones exócrinas alcanzan la luz del duodeno.

Las células endócrinas surgen del epitelio pancreático. En el día 11 de la gestación las células A (productoras de glucagón) son detectables por microscopía electrónica e inmunohistoquímica.

Las células productoras de insulina (B) son detectadas por inmunocitoquímica en el día 12.5, y por microscopía electrónica, en el día 15. Las células productoras de somatostatina y las productoras de polipéptido pancreático (en el ratón) aparecen en el día 13.5 y 10.5 respectivamente (Githens S., 1993).

**Aspectos moleculares.** Utilizando la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar RNAs mensajeros específicos, se ha detectado en el intestino anterior de ratón, el RNAm de insulina y glucagon en el día 9, aproximadamente 12 horas antes del comienzo de la morfogénesis pancreática. El RNAm de la somatostatina es detectable aún antes, en el día 8 pero no es específico del páncreas, pues también ha sido detectado en otras regiones del intestino anterior. El RNAm del polipéptido pancreático ha sido detectado alrededor del día 10. En contraste, el RNAm de las enzimas exócrinas como la carboxipeptidasa A y la amilasa, son detectadas en los días 10.5 y 12 después de la expresión inicial de todas las hormonas endócrinas y del comienzo de la morfogénesis pancreática.

Todos estos datos sugieren que las células endócrinas (y sus productos de secreción) que aparecen antes del comienzo de la morfogénesis pancreática, desempeñan un papel importante en el desarrollo del páncreas, y principalmente del páncreas exócrino (Gittes G. and Rutter W. J., 1992; Githens S., 1993).

Las hormonas esteroides en la función pancreática

**Proteínas que unen hormonas esteroides en el páncreas.** Existen diferentes estudios que demuestran la presencia de proteínas que unen hormonas esteroides y en algunos casos, de receptores a estas hormonas.

Kirdani y colaboradores (Kirdani R.Y., Varkarakis M.J., Murphy G.P. and Sandberg A.A., 1972) estudiaron el tiempo de permanencia de esteroides tritizados en diferentes glándulas exócrinas caninas, y encontraron que el páncreas retenía por más tiempo el compuesto radiactivo, lo que indicaba la presencia de receptores a esteroides de alta capacidad.

En 1974, Sandberg y Rosenthal (Sandberg A.A. and Rosenthal H.E., 1974) demostraron que el páncreas une en forma específica los estrógenos naturales estradiol y estriol. A este respecto,

El Seiffi y colaboradores, empleando ensayos de unión al ligando, detectaron una unión específica de alta afinidad por el estradiol en los islotes pancreáticos de rata, lo que indica la presencia de receptores a estrógenos (El Seiffi I., Green C. and Perrin D., 1981).

Utilizando la misma estrategia experimental, Pousette y colaboradores (Pousette A., Carlström K., Sköldefors H., Wilkin N. and Theve N.O., 1982), encontraron una proteína que puede unir además de estradiol, estrona y estriol; pero por las características de ésta, se reporta que no corresponde al receptor de estrógenos.

También ha sido detectado el receptor a progesterona mediante técnicas autorradiográficas, en secciones de tejido pancreático de monos babuinos (Winborn W.B., Sheridan P.J. and McGill H.C., 1987).

De la misma forma, el receptor a glucocorticoides ha sido detectado por diferentes investigadores, utilizando métodos de unión al ligando (Svec F. and Rudis M., 1981), inmunohistoquímica (Fischer B., Rausch U., Wollny P., Westphal H., Seitz J. and Aumüller G., 1990) y por hibridización *in situ* (Mathes H., Kaiser A., Stier U., Riecken E.O. and Rosewicz s., 1994). Todo lo anterior ha sido reportado en islotes de Langerhans y particularmente en células  $\beta$ .

Finalmente respecto al receptor a andrógenos, existen algunos resultados controversiales. Pousette en 1976, demostró la presencia de receptores a andrógenos en el páncreas de rata, mientras que Corbishley y colaboradores (Corbishley T.P., Iqbal M.J., Wilkinson M.L. and Williams R., 1986) utilizando técnicas de unión al ligando no lograron detectar el receptor a andrógenos en tejido pancreático normal, a diferencia del tejido pancreático tumoral humano, en donde sí fue detectado. En un modelo de carcinogénesis pancreática inducida por azaserina en rata, se encontraron resultados similares (Losthe E.F., Roebuck B.D., Stern J.E. and Longnecker D.S., 1987).

**Las hormonas esteroideas en la función secretora del páncreas.** En la rata los esteroideas adrenales y ováricos modulan la actividad secretora del páncreas. Longnecker y col., observaron que al remover los tejidos productores de esteroideas se producía una depleción de los gránulos de zimógeno y la disminución de la secreción de amilasa, y que al suministrar cantidades fisiológicas de esteroideas a los animales de estudio, la acción se revertía (Longnecker D.S.,

Jamieson J.D. and Asch H.L., 1989).

Por diferentes autores se ha demostrado (Lenzen S. and Bailey C.J., 1984) que las hormonas esteroideas tienen efecto sobre la liberación de insulina en la rata, tanto en el animal intacto como en cultivos primarios de islotes pancreáticos, observando que la secreción de insulina se incrementa al suministrar a los animales de estudio progesterona y estradiol, solos o en combinación.

**Capacidad de biotransformación de esteroideas por el páncreas.** Existen evidencias de la biotransformación de esteroideas *in vivo* e *in vitro* en el páncreas de modelos animales. Iqbal y colaboradores ( Iqbal J.M., Greenway B., Wilkinson M.L., Johnson P.J. and Williams R., 1983), demostraron la actividad de la aromatasas (enzima que transforma testosterona a estradiol) y de la 5 alfa-reductasa (enzima que transforma testosterona a dihidrotestosterona) en tejido pancreático normal del humano adulto, del feto y en tumores pancreáticos.

Por otra parte, Mendoza-Hernández y cols. (Mendoza-Hernández G., López-Solache I., Rendón J.L., Díaz-Sánchez V. and Díaz-Sagoya J.C., 1988) demostraron la actividad de la enzima 17 $\beta$  hidroxiesteroide deshidrogenasa que cataliza la óxido-reducción entre androstendiona y testosterona en preparaciones de células libres del páncreas canino, así mismo otro grupo de investigadores (Mendoza-Hernández G., López-Solache I. and Rendón J.L., 1990) demostró la presencia del complejo de enzimas  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa en el mismo sistema de células en el páncreas del perro.

Fernández del Castillo y colaboradores en 1991, estudiaron la biotransformación de esteroideas tritiados, en el páncreas de perro. Realizaron perfusiones de  $^3\text{H}$ -Testosterona y obtuvieron como productos en el efluente de dicha perfusión  $^3\text{H}$ -androstendiona,  $^3\text{H}$ -dihidro-testosterona y  $^3\text{H}$ -estradiol (Fernández del Castillo C., Díaz-Sánchez V., Varela Fascinetto G., Altamirano A., Odor-Morales A., López-Medrano R.M. and Robles-Díaz G., 1991).

**Las hormonas esteroideas y el cáncer de páncreas.** En diferentes estudios se sugiere que el crecimiento de tumores pancreáticos es dependiente de andrógenos, a este respecto, Greenway y colaboradores en 1982, trabajaron con explantes de tumores pancreáticos humanos implantados en ratones desnudos y observaron que al suministrar testosterona a los animales de estudio, se

estimulaba la tasa de crecimiento del tumor. De manera contraria, la administración de un antiandrógeno (acetato de ciproterona) inhibía significativamente la tasa de crecimiento del tumor (Greenway B., Duke D., Pym B., Iqbal M.J., Johnson P.J. and Williams R., 1982).

Redding y Schally (Redding T.W. and Schally A.V., 1984) observaron una disminución en el tamaño y el volumen del tumor en hamsters macho gonadectomizados y en animales tratados con análogos de hormonas hipotalámicas en comparación con los animales intactos.

Sumi y colaboradores investigaron el efecto de la castración y la administración de 17  $\beta$ -estradiol, como pretratamiento en ratas con cáncer de páncreas y observaron una marcada inhibición del crecimiento del tumor en ratas con gonadectomía y estradiol como pretratamiento en comparación con las ratas intactas (Sumi C., Brinck-Johnsen T. and Longnecker D.S., 1989). Existen varios modelos de inducción farmacológica del carcinoma pancreático, de estos, dos han sido ampliamente estudiados y caracterizados; uno usando azaserina como carcinógeno en ratas y el segundo usando N-nitrosobis (2-oxopropil) amina en hamsters (Longnecker D.S, et al, 1989).

En experimentos realizados en el primer modelo de carcinogénesis inducida, se estudió el papel de la testosterona en la inducción de cáncer pancreático y se observó que en los machos castrados y en las hembras intactas, se reducía el tamaño y el número de lesiones cancerosas; así mismo, en los machos castrados tratados con testosterona, se revertía parcialmente el efecto (Lhoste et. al., 1987). En un modelo experimental similar, Meijers y colaboradores, encontraron que con la orquidectomía y la administración de acetato de ciproterona (antiandrógeno) se inhibía el crecimiento del páncreas y el desarrollo de lesiones preneoplásicas (Meijers M., Visser C.J.T., Klijn J.G.M., Lamberts S.W.J., van Garden-Hoetmer A., de Jong F.H., Foekens J.A. and Woutersen R.A., 1992).

Respecto al modelo del cáncer de páncreas en hámster, inducido por N-nitrosobis (2 oxopropil) amina, Fekete et. al. y Szende et. al., encontraron que después de tratar a los animales de estudio con un análogo de LH-RH se observaba una inhibición en el crecimiento del tumor. La reducción del crecimiento del carcinoma pancreático producido por LH-RH es explicado por la eliminación de los efectos estimulatorios de los esteroides sexuales (Fekete M., Zalatnai A., Comaru-Schally A.M. and Schally A.V., 1989; Szende B., Srkalovic G., Schally A.V., Lapis K. and Groot K., 1990).

Por otra parte, existen algunos datos respecto al cáncer de páncreas en humanos que de alguna forma relacionan a las hormonas esteroides con este tipo de neoplasias. El cáncer pancreático afecta mas hombres que mujeres; diferentes estudios clínicos y experimentales, se han enfocado a estudiar el posible papel de los andrógenos como indicadores o como factores etiológicos en la carcinogénesis pancreática (Boyle P., Hsieh C.C., Maisonneuve P., La Vecchia C., Macfarlane G.J., Walker A.M. and Trichopoulos D., 1989). Así, al comparar las concentraciones séricas de testosterona en pacientes con carcinoma pancreático con pacientes con otro tipo de tumores malignos del tubo digestivo, o con pacientes con enfermedad pancreática benigna, se encontró que en los casos de cáncer de páncreas existía una disminución significativa de la concentración de testosterona en el suero (Robles-Díaz G., Díaz-Sánchez V., Méndez J.P., Altamirano A. and Wolpert E., 1987; Fernández del Castillo C., Robles-Díaz G., Díaz-Sánchez V. and Altamirano A., 1990; Robles-Díaz G., Díaz-Sánchez V., Fernández del Castillo C., Morales M., Aceves G., Galván E. and Altamirano A., 1991).



## Regulación de la expresión genética

La expresión de los genes puede ser regulada a nivel transcripcional (iniciación y elongación de la transcripción) y postranscripcional (procesamiento y transporte intranuclear de los transcritos primarios, estabilización de los mensajeros dentro del citoplasma, traducción de los mensajeros, modificaciones postraduccionales de las proteínas). La importancia de cada una de estas etapas de regulación es variable dependiendo del gen de que se trate. En esta sección se considerará solamente el índice de transcripción que es el fenómeno mas general y mejor estudiado.

### Diferentes elementos que intervienen en la regulación de la transcripción

Los trabajos de genética bacteriana han permitido demostrar que el índice de transcripción de un gen es determinado por elementos en "cis" (intragénicos) situados en la proximidad del gen y por elementos en "trans" que codifican para factores que difunden e interaccionan con los elementos "cis". De manera similar en los eucariontes, la regulación de la transcripción involucra interacciones entre diferentes elementos como las secuencias de regulación, los promotores, aumentadores, silenciadores y proteínas que se unen a estas secuencias.

**Los promotores.** El término promotor se usa para un conjunto de secuencias de regulación agrupadas alrededor del sitio del inicio de la transcripción. Estas secuencias determinan por una parte el sitio de iniciación y la orientación de la transcripción y de cierta manera la frecuencia de iniciación. En los eucariontes superiores, el núcleo del promotor está constituido por la caja TATA (Breathnach R. and Chambon P., 1981) o el equivalente de esta secuencia: secuencias TATA degeneradas de genes que codifican por ejemplo para inmunoglobulinas (Doyen N., Dreyfus M. and Rougeon F., 1989), proteínas ribosómicas (Hariharan N. and Perry R.P., 1990), secuencias ricas en GCs de genes que codifican para numerosas proteínas estructurales y algunos receptores de factores de crecimiento (Seghal A., Patil N. and Chao M., 1988) y el receptor de andrógenos (Baarens W.M., Themmen A.P.N., Blok L.J., Mackenbach P., Bringmann A.O., Meijer D., Faber P.W., Trapman J. and Grootegoed J.A., 1990; Faber P.W., van Rooij H.C., van der Korput H.A., Baarens W.M., Brinnkmann A.O., Grootegoed J.A. and Trapman J., 1991) entre otros. La caja TATA se sitúa unos 30 nucleótidos antes del sitio

de inicio de la transcripción. La contribución de cada una de estas secuencias a la actividad del promotor es muy variable según el gen: por ejemplo la secuencia TATA es esencial y suficiente en el caso del gen que codifica para la  $\beta$ -globina (Myers R.M., Tilly K. and Maniatis T., 1986); las dos secuencias son necesarias en el caso de los genes que codifican para las proteínas ribosómicas del ratón (Tokunaga K., Hirose S. and Suzuki Y., 1984); finalmente sólo la secuencia de iniciación parece requerirse en el caso del gen que codifica para la desoxinucleotidil-transferasa terminal (Smale S.T. and Baltimore D., 1989), que no posee ni secuencia TATA ni secuencias ricas en GCs.

En general, todas estas secuencias son reconocidas por proteínas del complejo de transcripción, la más conocida es la TFIID que se fija a ciertas secuencias TATA (Buratowski S., Hahn S., Sharp P.A. and Guarante L., 1988). La unión de estas proteínas a su secuencia blanco, forma los complejos de preiniciación.

Otros elementos del promotor son blanco de proteínas de regulación y contribuyen a la eficiencia del ensamblaje del complejo de preiniciación. Estos elementos difieren según los genes, los más frecuentemente descritos son las secuencias CCAAT que unen proteínas C/EBF y las CTF/NF1 (Cohen R.B., Sheffery M. and Kit C.G., 1986), las secuencias GGGCGG que unen la proteína Sp1, la secuencia octamérica ATGCAAAT, que dependiendo de los genes y los tipos celulares, unen proteínas ubicuitarias como las OTF1, o tejidos específicas como la OTF2 (Johnson P.F. and McKnight S.T., 1989).

**Los elementos potenciadores y silenciadores.** Son secuencias de regulación situadas a distancias variables del sitio de inicio de la transcripción (entre 100 y varios miles de pares de bases en dirección 5' o 3' de este sitio). Estas secuencias estimulan o reprimen (respectivamente) la transcripción de genes situados en la proximidad. Su actividad es independiente de su orientación y de su localización en genes reporteros utilizados en experimentos de transferencia de genes (Khoury G. and Gruss P., 1983).

Los potenciadores contienen varios sitios de fijación para proteínas de regulación, como es el caso del potenciador de SV40 y del potenciador de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. Los experimentos con el potenciador de SV40 (Zenke M., Grundström T., Matthes H., Wintzerith M., Schatz C., Wildeman A. and Chambon P., 1986) mostraron que la

multimerización de estos sitios constituyen un factor importante para la actividad global del aumentador (Formental C., Kanno M., Nomiya M. and Chambon P., 1988).

El mecanismo por el cual los aumentadores activan a distancia la transcripción no se conoce completamente sin embargo se cree que las secuencias de DNA situadas entre el aumentador y el promotor forman una asa en el seno de la cual las proteínas que se fijan a estas secuencias tienen la posibilidad de interactuar. Estas interacciones son importantes para la activación de la transcripción (Müller H.P., Sogo J.M. and Schaffner W., 1989), en particular permiten el posicionamiento del complejo de iniciación así como su estabilización. (ver figura 1)

Las proteínas que se fijan a los aumentadores contienen al menos dos regiones responsables del reconocimiento de la secuencia blanco sobre el DNA y de las interacciones con proteínas del complejo de transcripción. Estas dos regiones pueden formar dominios independientes como es el caso de las proteínas de levadura Gcn4 y Gal4 (Ptashne M., 1988).

Algunas de las proteínas que se fijan a los aumentadores se expresan constitutivamente en un gran número de tejidos y su papel es todavía desconocido, pero se piensa que pueden contribuir al nivel basal de la actividad del aumentador. Por otro lado, podrían crear un ambiente favorable para un alto nivel de actividad del aumentador en presencia de otras proteínas cuya expresión es regulada. Estas proteínas pueden expresarse selectivamente en tejidos específicos en uno o varios momentos precisos del desarrollo.

La actividad del potenciador puede también variar según el ambiente celular por fijación de proteínas de regulación en respuesta por ejemplo a fenómenos como el choque térmico, a la presencia de hormonas en el medio, a factores de crecimiento o a metales pesados.

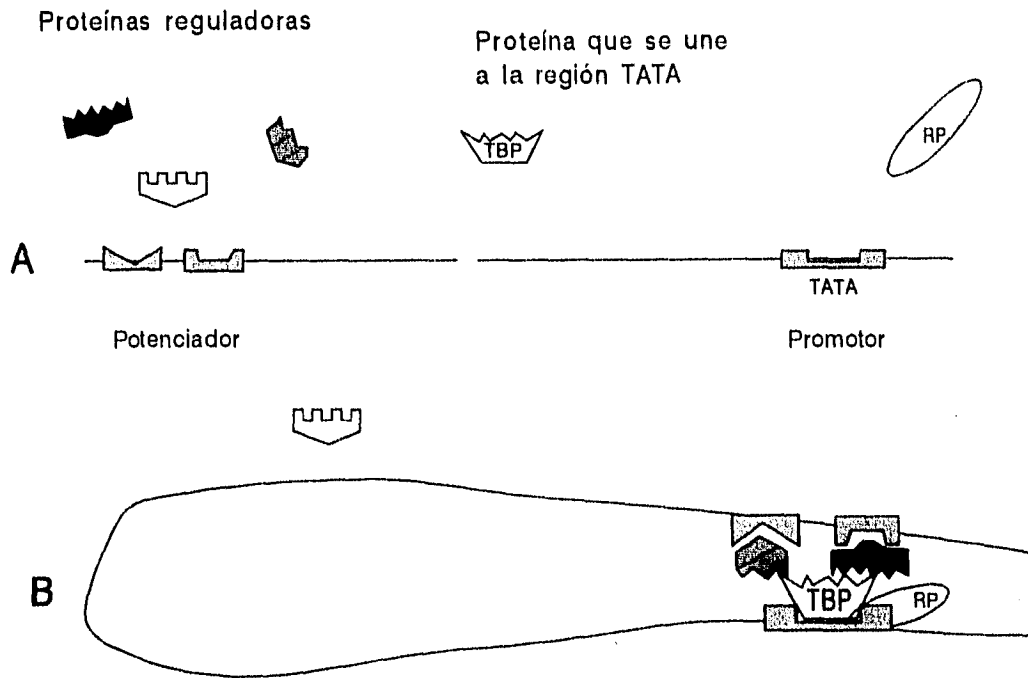


Figura 1. Mecanismo hipotético de activación de las proteínas que se unen a un potenciador (enhancer).

A. Las proteínas se fijan a su secuencia de reconocimiento correspondiente en la región del potenciador.

B. El DNA se dobla formando una asa o bucle que permite la interacción de las proteínas activadoras y las proteínas del complejo de transcripción, con esto se logra el posicionamiento y la estabilización del complejo de preiniciación a nivel del promotor. Con la formación de este complejo la RNA polimerasa (RP) lleva a cabo la transcripción.

## Regulación de la transcripción por hormonas esteroideas

Las hormonas esteroideas penetran a la célula probablemente por difusión pasiva, dentro de la célula son reconocidas por proteínas receptoras citoplásmicas o nucleares específicas.

La unión del esteroide con su receptor resulta en una alteración estructural en el receptor, que aumenta su afinidad por el DNA. El complejo hormona-receptor se une en forma de dímero a una secuencia de reconocimiento en la proximidad del gen regulado, dichas secuencias son los elementos de respuesta hormonal (ERH) en donde se puede activar o reprimir la transcripción (Yamamoto K.R., 1985; Beato M., 1988; Schmid W., Strahle U., Mestril R., Klock G., Ankenbauer W. and Schutz G., 1989; Carson-Jurica M.A., Schrader W.T. and O'Malley W., 1990; Landers J.P. and Spelsberg T.C., 1992). Los elementos responsables de la regulación por hormonas esteroideas son secuencias cortas de entre 13 y 15 pb que se localizan en el extremo 5' del gen regulado. El complejo hormona-receptor se une a la misma secuencia para provocar regulación positiva o negativa. Se ha encontrado que este complejo, activa la transcripción estabilizando el complejo de factores que se unen a la secuencia TATA y que se requieren para que la RNA-polimerasa inicie la transcripción. En el caso de la regulación negativa, la unión al HRE interferiría con la unión o la acción de otras proteínas transactivadoras importantes en la expresión génica (Schmid et. al., 1989) (ver figura 2).

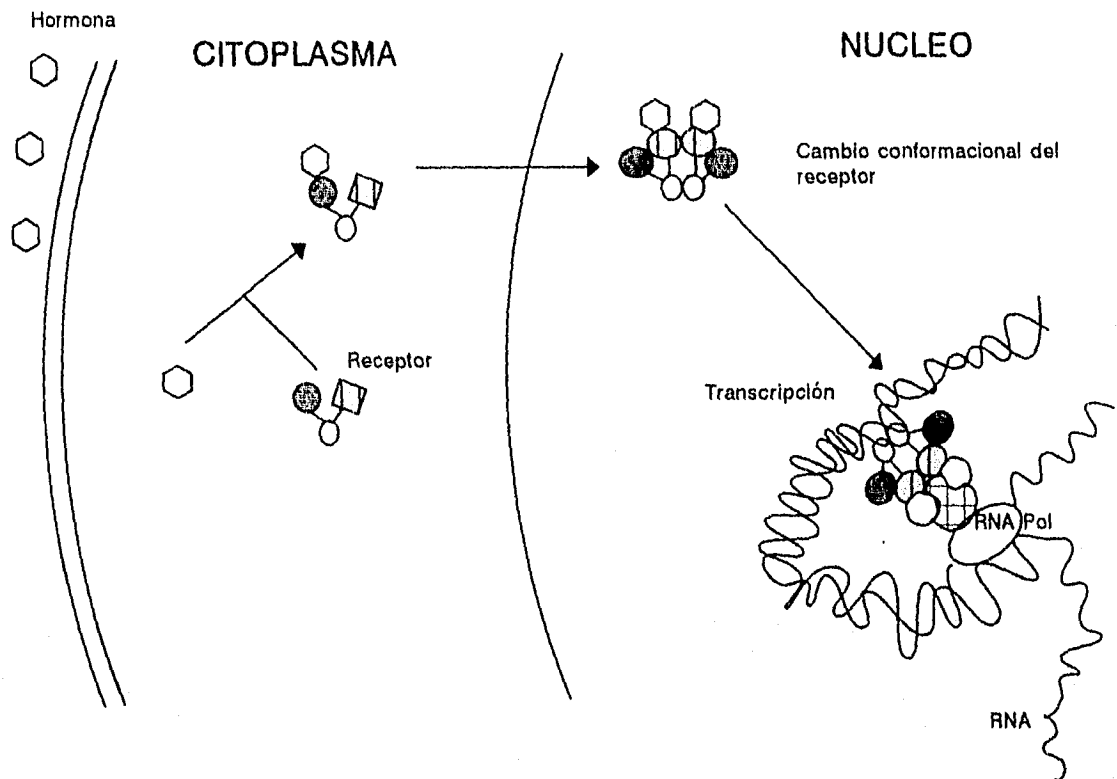


Figura 2. Diferentes etapas en la activación de la transcripción por las hormonas esteroides. Las hormonas penetran a la célula y se unen a su receptor específico, provocando un cambio conformacional que aumenta su afinidad por el DNA. El receptor activado se une a secuencias específicas de DNA (ERH) en la proximidad del gen regulado, modulando de esta forma la transcripción.

## Estructura y función de los receptores a hormonas esteroides

Las hormonas esteroides participan en la regulación del desarrollo, la diferenciación celular y en la respuesta fisiológica a diversos estímulos. Estos efectos son producidos por la interacción de la hormona con su receptor específico.

Los receptores a hormonas esteroides pertenecen a una superfamilia de factores de transcripción inducibles por su ligando (ver figura 3), comprenden receptores para ácido retinoico, hormonas tiroideas y varios genes para los que su ligando fisiológico no es conocido aún. Estos receptores están organizados estructuralmente en diferentes regiones o dominios. Como puede observarse en la figura 4, contienen una región amino-terminal (I), que regula la transcripción, un dominio de unión al DNA (II) de entre 66-68 aminoácidos (aas), una región de bisagra (III) y un dominio de unión a la hormona (IV).

El dominio I, en la región N-terminal es la región mas variable entre los receptores a hormonas esteroides. El dominio de unión a DNA (II y III) es una región altamente conservada entre los miembros de esta familia. Este dominio tiene 2 sub-regiones (CI y CII) que son codificadas por dos exones separados, son regiones parecidas a dedos de zinc que se doblan para formar una sola región estructural que parece ser una hélice-giro-hélice común en muchas proteínas que se unen al DNA para inducir cambios en la transcripción. La región carboxilo-terminal comprende aproximadamente 250 aas y corresponde al dominio de unión a la hormona (IV). Dentro de esta región se han identificado sub-regiones específicas que son responsables de la actividad transcripcional o TAF por sus siglas en inglés (transcriptional activating function), estas regiones se han identificado en ciertos receptores a hormona esteroides y son muy similares a los dominios acídicos de activación de ciertos factores de transcripción. La región de bisagra (III), situada entre la región de unión al DNA y de unión a la hormona, es una región rica en aas básicos y aunque no es un dominio altamente conservado, es similar a la secuencia de translocación nuclear del antígeno T del virus SV40 (Landers et. al., 1992).

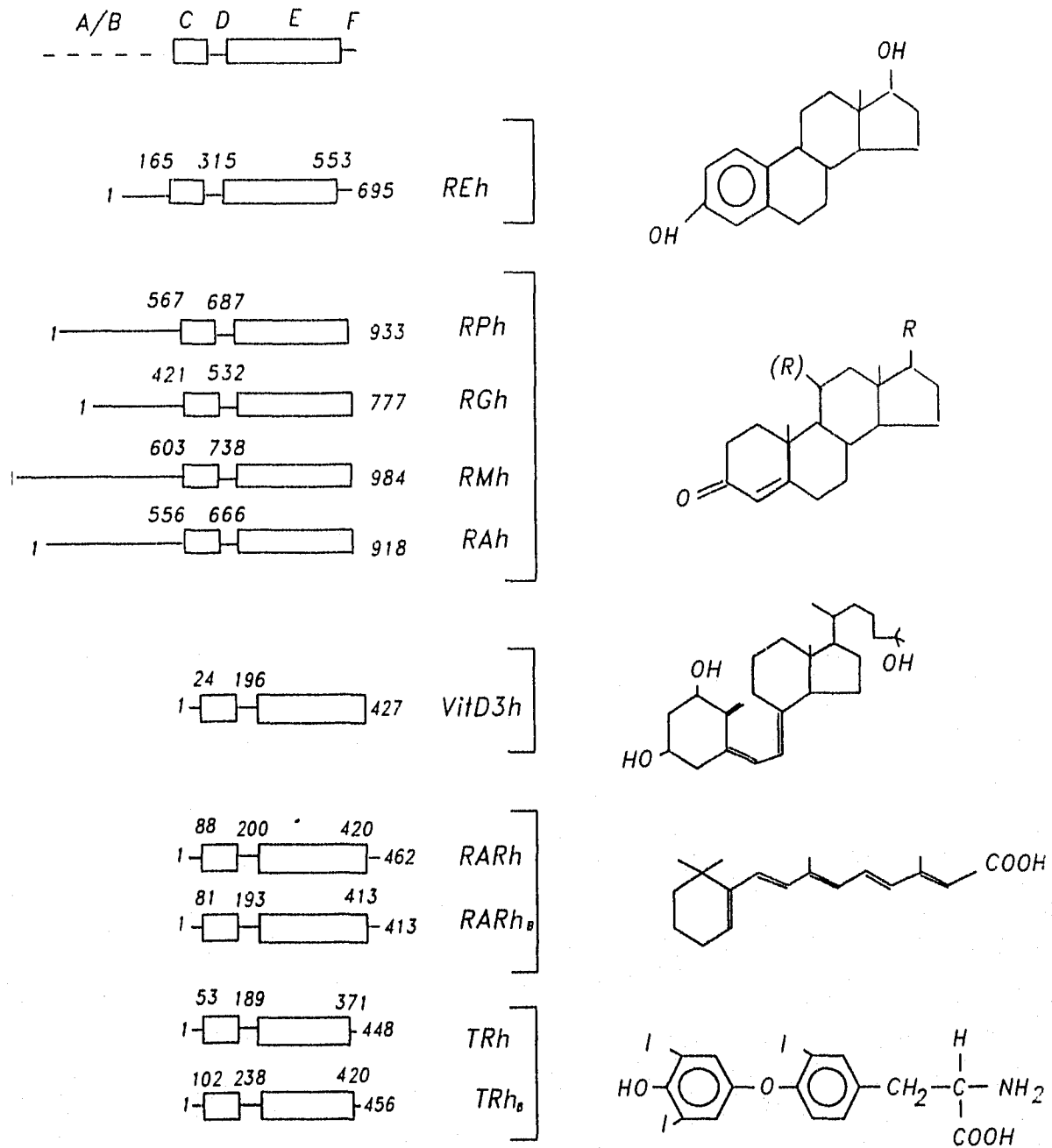


Figura 3. Estructura de los receptores nucleares de la superfamilia de receptores a hormonas esteroides. En la parte izquierda de la figura se esquematiza la estructura de los diferentes receptores y en la derecha se observa la estructura general del ligando correspondiente. (REh, receptor a estrógenos humano; RPh, receptor a progesterona; RGh, receptor a glucocorticoides; RMh, receptor a mineralocorticoides; RAh, receptor a andrógenos; VitD3h, receptor a vitamina D3; RARh, receptor a ácido retinoico; RTh, receptor a hormonas tiroideas.



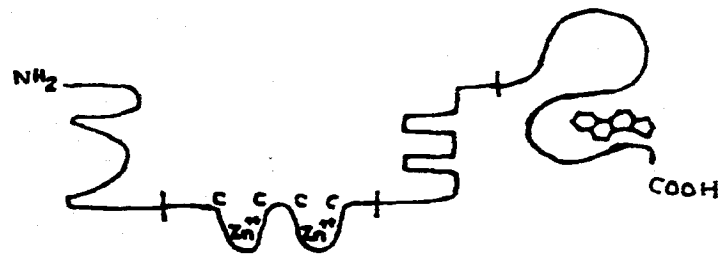
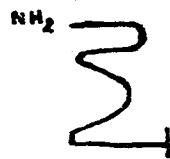


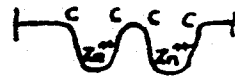
Figura 4. Regiones funcionales de los receptores a hormonas esteroideas. En la figura se resumen las características estructurales y funcionales, de las diferentes regiones o dominios.



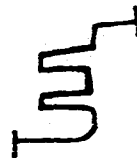
#### I Dominio amino-terminal

- 1) Región hipervariable.
- 2) Activación de la transcripción de genes específicos.
- 3) Une otros factores.

#### II Dominio de unión al DNA



- 1) Región altamente conservada.
- 2) Control de la transcripción.
- 3) Unión específica a ERH.
- 4) Formación de homodímeros.



#### III Región bisagra

- 1) Activa la transcripción.
- 2) Une otras proteínas.
- 3) Formación de homodímeros.
- 4) Señal de localización nuclear .



#### IV Dominio de unión a la hormona

- 1) Une al esteroide.
- 2) Une hsp 90.
- 3) Región altamente conservada entre la misma especie de receptores.
- 4) Señal de localización nuclear.
- 5) Formación de homodímeros.

**El receptor a andrógenos.** La secuencia del DNA complementario del receptor a andrógenos humano (RAh), revela un marco abierto de lectura de 2730 nucleótidos que codifican una proteína de 910 aminoácidos con un peso molecular calculado de 98,500 Da. El gen está localizado en el cromosoma X y ocupa una región de poco mas de 90 Kb. La región codificadora del gene está formada por 8 exones (Brinckmann A.O., Jenster G., Kuiper G.G.J.M., Ris C., Van Laar J.H., Van de Korput J.A.G.M., Degenhart H.J., Trifiro M.A., Pinsky L., Romalo G., Schweikert H.U., Veldscholte J., Mulder E. and Trapman J., 1992). Por estudios de mutagénesis dirigida se han identificado 3 regiones del receptor que son funcionalmente importantes (ver figura 5): un segmento amino (N-) terminal, involucrado en la activación de la transcripción; una región rica en cisteinas que es el dominio de unión al DNA y un dominio carboxilo terminal que es la región de unión a la hormona. Así mismo, se ha identificado una señal de translocación nuclear homóloga a la encontrada en el antígeno T de SV40, en la región de bisagra, entre el dominio de unión al DNA y el de unión a la hormona (Simental J.A., Sar M., Lane M.V., French F.S. and Wilson E.M., 1991). La secuencia que codifica para el dominio N-terminal, está presente en el exón A, el dominio de unión al DNA está codificado por los exones B y C; y la información para la región de unión a la hormona se encuentra distribuida entre los exones D hasta H.

Cabe mencionar que cuando se compara la secuencia de aminoácidos del RAh con la secuencia del receptor a andrógenos de rata (RAR), se encuentra una homología total del 85%; se observan secuencias idénticas en las regiones de unión al DNA y la de unión a la hormona, las principales diferencias residen en el dominio N-terminal (Lubahn D.B., Joseph D.R., Sar M., Tan J., Higgs H.N., Larson R.E., French F.S. and Wilson M.E., 1988).

La región del promotor del receptor a andrógenos (RAh y RAR), carece de una caja TATA y de una secuencia CAAT típicas, pero incluye una región rica en GCs. Por ensayos de protección a la nucleasa S1 se sabe que el gen del RA tiene 2 sitios principales de inicio de la transcripción, aproximadamente 1.1 Kb antes del codon de iniciación (Baarens et. al. 1990; Faber et. al., 1991; Wolf D.A., Herzingert T., Hermenking H., Blaschenke D. and Hörz W., 1993).

## RECEPTOR A ANDROGENOS

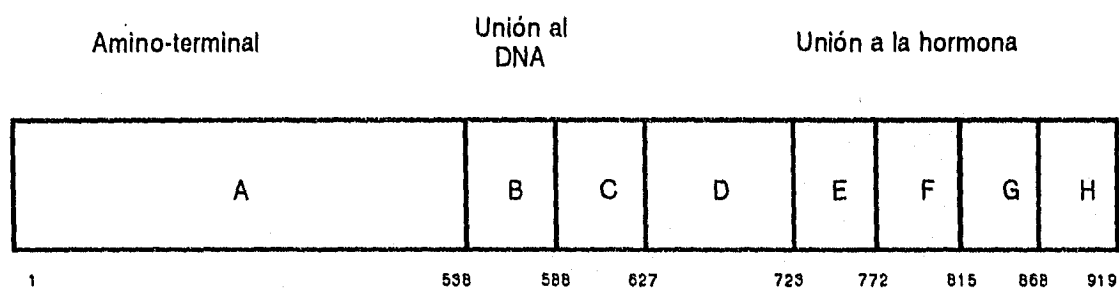


Figura 5. Representación esquemática del DNAC del RA. En la figura se muestran las regiones estructurales y el número de aas por exón.

Una de las primeras etapas en la acción de los andrógenos es la unión de la testosterona o la dihidrotestosterona (su principal metabolito) al receptor a andrógenos. La unión de la hormona a su receptor hace posible la interacción con regiones específicas del DNA (elementos de respuesta a andrógenos) en los genes regulados por andrógenos. Esta interacción en regiones regulatorias es el evento que determina que los andrógenos influyan en la tasa de transcripción y en algunos casos muestren efectos postranscripcionales en los genes andrógeno-regulados (Williams-Ashman H.G., 1980; Hiipakka R.A. and Liao S., 1989).

Ha sido propuesto que la regulación de la expresión génica por andrógenos se da básicamente, controlando la estabilidad del RNA (Page M.J. and Parker M.G., 1982; Berger F.G., Loose D., Meisner H. and Watson G., 1986), y modulando la iniciación de la transcripción de los genes andrógeno-regulados (Wolf et. al., 1993).

La expresión y regulación del RAh y RAr ha sido estudiada en diferentes líneas celulares y en animales. Una expresión significativa de RNA de RAh se ha detectado en líneas celulares de tumores de mama (Tilley W.D., Marecelli M. and McPahul M.J., 1990a), hígado (Shan et. al., 1990) y próstata (Tilley et. al., 1990b) así como en fibroblastos (Tilley et. al., 1990a) de piel genital.

Los andrógenos causan una disminución en la cantidad de RNA mensajero del RA en próstata ventral, epidídimo y vesículas seminales de la rata, así como en algunas líneas celulares de cáncer de páncreas y otros tejidos que se sabe que expresan RA ( Quarmby V.E., Yanbrough W.G., Lubhan D.B., French F.S. and Wilson E.M., 1990; Shan et. al., 1990).

## **HIPÓTESIS**

Por reportes en la literatura, se ha sugerido la presencia de diferentes receptores a hormonas esteroides en el páncreas y se sabe que estas hormonas participan en la función del páncreas. Ya que la autorregulación del receptor es un mecanismo común entre los receptores a hormonas esteroides, se espera, que al igual que en los órganos dependientes de andrógenos, en el páncreas los andrógenos regulen directamente la expresión del RNAm de su receptor.

## **PROPÓSITO Y OBJETIVOS**

A la fecha no ha sido demostrada molecularmente la presencia del receptor a andrógenos en tejido pancreático, por lo que el propósito del presente estudio fue detectar la presencia del RNAm del receptor de andrógenos y estudiar su expresión en la rata como modelo experimental. Para tal propósito, los objetivos del presente trabajo fueron:

- Detectar la presencia del RNAm del RA en el páncreas de la rata.
- Identificar y caracterizar los cambios en la expresión del gen del receptor a andrógenos en el tejido pancreático de la rata en diferentes edades y bajo diferentes condiciones endócrinas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Extracción del RNA total

Se utilizaron 10 ratas macho adultas de la cepa Wistar. Por disección se obtuvieron las vesículas seminales, próstata, riñón y páncreas. Se extrajo el RNA total por el método de Chatala, 1983 (Cathala G., Savouret J.F., Méndez B., West B.L., Karin M., Martial J.A. and Baxter J.D., 1983). Se homogenizó cada tejido con un politrón marca Brinkmann en la solución de homogenización (monotiocianato de guanidina 5 M, tris-HCl pH 7.5 50 mM, EDTA 10 mM, 8 %  $\beta$ -mercaptoetanol), se adicionó cloruro de litio 4 M y se dejó precipitando a 4°C durante 18 horas. Después de centrifugar las muestras, se obtuvo la pastilla correspondiente; esta se lavó y fue resuspendida en cloruro de litio 3 M después de centrifugadas, se resuspendió en solución amortiguadora de solubilización (NaDodSo<sub>4</sub> 0.1%, EDTA 1 mM, tris-HCl pH 7.5 10 mM), a continuación se hizo una extracción con fenol-cloroformo. Después de dicha extracción se tomó la fase acuosa y se dejó precipitando con 0.05 volúmenes de acetato de amonio y 2.5 volúmenes de etanol absoluto a 4°C por 18 horas aproximadamente. Al término de ese tiempo, las muestras fueron centrifugadas para obtener la pastilla de RNA, que se lavó 2 veces con etanol al 75% y una vez con etanol absoluto, después las muestras se resuspendieron en agua des-ionizada estéril. Para cuantificar la concentración de RNA total, se tomó una alícuota de cada muestra y se midió la absorbancia a 260 nm.

### Análisis por "Northern blot"

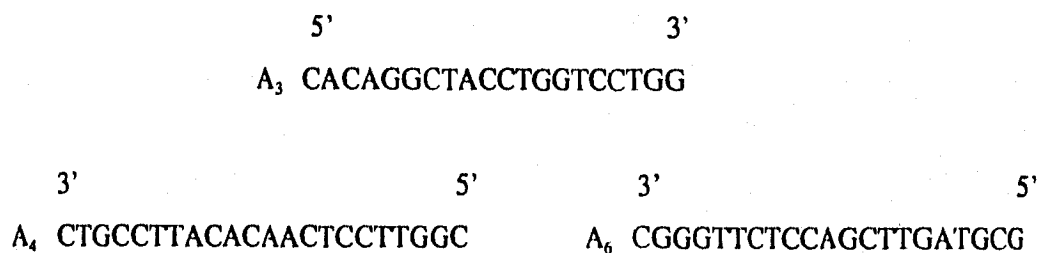
Se tomaron 20  $\mu$ g de RNA total de cada tejido, y se analizaron por electroforesis en geles desnaturizantes de agarosa al 1 % y formaldehído en amortiguador de corrida (Hepes 50 mM/EDTA 1 mM). Después de la electroforesis, el gel fue transferido por capilaridad a membranas de nitrocelulosa, (Genescreen, NEN Research Products, Dupon) con SSC 10X (citrato de sodio 150 mM, NaCl 1.5 M) por 18 horas. Las membranas fueron prehibridizadas en 0.2 ml/cm<sup>2</sup> de la solución A (Formamida 50%, SDS 0.2%, EDTA 10 mM, SSC 2X, fosfato de sodio 120 mM pH 6.8 y DNA de esperma de salmón 50  $\mu$ g/ml) por 24 horas a 42°C.

Después de la prehibridización, las membranas fueron hibridizadas con el DNA complementario (DNAc) del receptor de andrógenos (Chawshang C., Kokontis J. and Liao S., 1988), el cual fue marcado radiactivamente con dCTP  $\alpha$ - $^{32}$ P por el método de "random priming" (Feinberg A. and Vogelstein B., 1983).

Las membranas fueron incubadas en 0.1 ml/cm<sup>2</sup> de la solución A en presencia de la sonda radioactiva, a 42°C durante toda la noche. Después de la hibridización las membranas se lavaron en condiciones de alta astringencia, 2 veces a temperatura ambiente en una solución de SSC 2X y 2 veces en una solución de SSC 0.1X, SDS 0.1% a una temperatura de 50°C y se expusieron a placas autorradiográficas "Kodak X-OMAT" por 24 horas a -70°C.

#### Diseño de oligonucleótidos iniciadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

De la secuencia nucleotídica del DNAc del receptor a andrógenos y de acuerdo con la composición de exones (Lubahn D.B., Joseph D.R., Sar M., Tan J., Higgs H.N., Larson R.E., French F.S. and Wilson M.E., 1988), se diseñaron tres oligonucleótidos iniciadores dentro de la secuencia del exón "A" que pertenece a la región amino terminal (la región mas variable entre la superfamilia de los receptores para hormonas esteroides). La secuencia de los oligonucleótidos es la siguiente:



Con el objeto de tener un control de la amplificación del gen del RA, se diseñó un par de oligonucleótidos para la coamplificación de una proteína que se expresa constitutivamente en la

mayoría de los tejidos. De esta manera se normalizó la variación que pudiera producir el manejo de las muestras durante la amplificación de las secuencias del gen de interés.

De acuerdo con la secuencia de nucleótidos del DNAC de la proteína constitutiva: ciclofilina (Haendler B., Hofer-Warbinek R. and Hofer E., 1987), se diseñó un par de oligonucleótidos para coamplificar un fragmento de esta proteína en las mismas muestras utilizadas para la amplificación del receptor a andrógenos. La secuencia de estos oligonucleótidos es la siguiente:

```
5'                      3'  
CCGCGTCTCCTTTGAGCTGTTT
```

```
3'                      5'  
ACCCAAAGGGAAGTGCAGCGAGAGC
```

### Grupos de trabajo

Se formaron los siguientes grupos con 5 ratas Wistar cada uno:

- Grupo I. Machos adultos intactos
- Grupo II. Machos adultos gonadectomizados
- Grupo III. Machos adultos gonadectomizados y sustituidos con testosterona
- Grupo IV. Individuos de una semana de nacidos
- Grupo V. Hembras prepúberes
- Grupo VI. Hembras púberes
- Grupo VII. Hembras adultas intactas
- Grupo VIII. Hembras adultas ovariectomizadas
- Grupo IX. Hembras adultas ovariectomizadas y sustituidas con estradiol

En los grupos II y VIII, los animales fueron gonadectomizados y 72 horas después fueron sacrificados para la obtención del páncreas.

En el grupo III y IX, los animales fueron gonadectomizados, 48 horas después se les aplicó una



dosis única de 50 mg de ciclopentilato de testosterona intramuscular a los machos, y a las hembras 50  $\mu$ g de benzoato de estradiol; 72 horas después de la sustitución los animales fueron sacrificados para obtener el páncreas.

En todos los grupos, el páncreas se extrajo por disección y se homogenizó un total de 5 g de tejido por grupo para la extracción de RNA total por la técnica de Cathala, et. al., 1983.

#### Reacción conjunta de la transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Se tomó 1  $\mu$ g de RNA total de páncreas de cada grupo de animales, para sintetizar el DNA complementario con la enzima transcriptasa reversa, con una modificación a la técnica descrita por Kawasaki E.S. and Wang A.M., 1989.

El medio de reacción contenía:

|  |            |
|--|------------|
| DTT  | 20mM       |
| dATP   | 1mM        |
| dCTP   | 1mM        |
| dTTP   | 1mM        |
| dGTP   | 1mM        |
| Oligo dT   | 10 $\mu$ g |
| Inhibidor<br>de RNasas                                     | 20U        |
| Transcriptasa<br>Reversa 200 U/ $\mu$ l<br>(Gibco BRL)     | 20U        |
| Solución amortiguadora<br>para la transcriptasa<br>reversa | 1X         |

Las reacciones se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente, 60 minutos a 42°C, 10 minutos a 95°C y finalmente en un baño de hielo por 5 minutos.

Una vez sintetizado el DNAc, se dividió el volumen de la reacción (20  $\mu$ l) en 2 tubos de 500  $\mu$ l, para realizar la coamplificación del receptor de andrógenos y la ciclofilina.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se preparó adicionando a cada tubo de la reacción anterior:

|                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| MgCl <sub>2</sub>                     | 1mM       |
| dATP                                  | 1mM       |
| dCTP                                  | 1mM       |
| dTTP                                  | 1mM       |
| dGTP                                  | 1mM       |
| iniciador 5'→3'                       | 30 pmoles |
| iniciador 3'→5'                       | 30 pmoles |
| Taq DNA polimerasa                    |           |
| 5 U/ $\mu$ l (Gibco BRL)              | 2.5U      |
| Solución amortiguadora<br>para la Taq | 1X        |
| En un volumen final de 50 $\mu$ l     |           |

Las muestras se incubaron en un termociclador (Perkin Elmer 480) con las siguientes condiciones de temperatura:

1 ciclo de 95°C/ 5 minutos, 55°C/ 1 minuto, 72°C/ 1 minuto; 30 ciclos de 95°C/ 1 minuto, 55°C/ 1 minuto, 72°C/ 1 minuto; 1 ciclo de 95°C/ 1 minuto, 55°C/ 1 minuto, 72°C/ 5 minutos.

Terminada la incubación de las muestras, se almacenaron a 4°C hasta que fueron analizadas.

#### Análisis de los productos de PCR por "Southern blot"

Se tomaron 10  $\mu$ l de los productos de PCR de cada muestra y se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en amortiguador TBE (tris base 0.5 M, ácido bórico 0.5 M, EDTA 10 mM). El gel fue transferido por capilaridad a una membrana de nitrocelulosa con SSC 10X.

Posteriormente se prehibridizó la membrana en la forma ya descrita; de igual manera se realizó la hibridización correspondiente, y la exposición de la placa autorradiográfica.

Para hibridizar las membranas de nitrocelulosa con los productos de amplificación correspondientes, se utilizaron como sondas, el DNAC del receptor a andrógenos y un fragmento de aproximadamente 600 pb de la ciclofilina.

#### Análisis densitométrico

Las placas autorradiográficas de las hibridizaciones, se analizaron en un densitómetro de imagen, modelo GS-670 BioRad. Por este método se obtuvo el área bajo la curva correspondiente a la señal de hibridización de los productos de PCR del receptor a andrógenos y de la ciclofilina para cada muestra. Para conocer la expresión relativa del RNA del RA respecto al control de expresión se asignaron unidades arbitrarias a los valores de las áreas bajo la curva y se graficaron como una relación RA/ciclofilina.

El procedimiento completo se repitió al menos 3 veces, y los resultados que se muestran en la sección de resultados, son representativos de los experimentos realizados.

## RESULTADOS

### Extracción de RNA total

Después de múltiples medidas implementadas para la obtención de RNA total de páncreas en buenas condiciones, se llegó a la estandarización de la técnica de extracción. La medida determinante fue la obtención del tejido pancreático a partir de ratas vivas, bajo anestesia profunda. Esto quiere decir que hasta el momento de la disección, el órgano tenía aún irrigación sanguínea de manera natural. Después de la disección, el tejido se colocó en la solución de homogenización y se procesó en un tiempo no mayor a 10 minutos.

Para corroborar la integridad del RNA obtenido, éste, se analizó por electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa (ver material y métodos). Al observar los geles a la luz ultravioleta, el RNA ribosomal 28s y 18s debía estar presente en aproximadamente la misma proporción para indicar que no existía degradación. En la figura 6 se muestra el RNA de páncreas extraído de diferentes grupos de ratas, pueden observarse dos bandas en el gel que corresponden como se indica al RNA ribosomal.

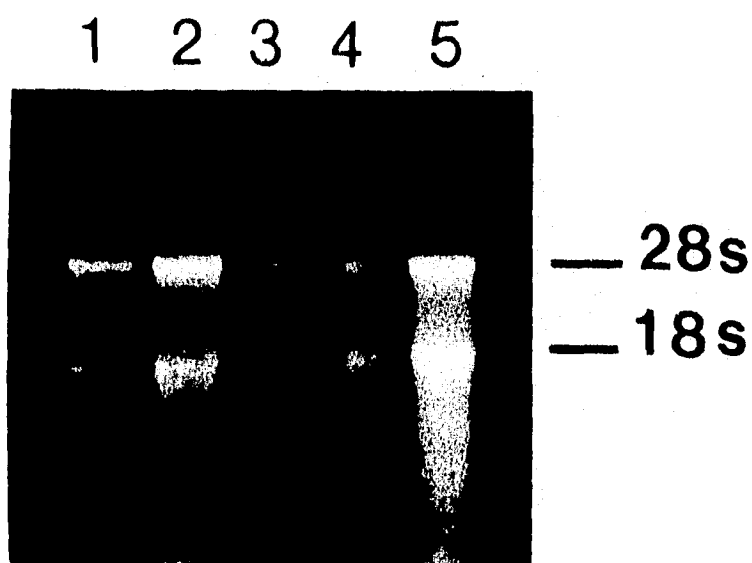


Figura 6. RNA total de páncreas de rata, obtenido por el método de Cathala, 1983. 1) ratas recién nacidas, 2) ratas hembra, 3) ratas macho intactas, 4) ratas macho castradas, 5) ratas macho castradas y sustituidas. Pueden observarse los dos RNAs ribosomales, como muestra de la integridad del RNA total.

### Análisis del RNA por "Northern blot"

Para detectar la presencia de productos de transcripción del receptor a andrógenos, se analizó por "Northern blot" el RNA de páncreas y de tejidos andrógeno-regulados como próstata y vesículas seminales de ratas adultas intactas y castradas. Por este método se detectó el RNAm del receptor a andrógenos (RA) en la próstata y las vesículas seminales. Se observó que los andrógenos circulantes regulan negativamente la expresión del RA, pues se encontró una mayor expresión en el RNA de próstata y vesículas seminales de los animales castrados en comparación con los animales intactos. En el caso del páncreas no se detectó el RNAm del RA en ninguna de las dos condiciones. (Figura 7).

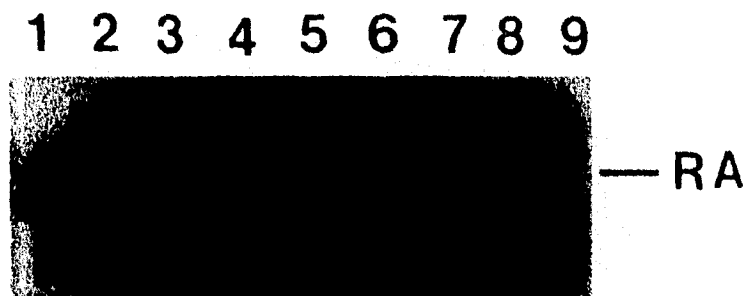


Figura 7. Detección del RNAm del receptor a andrógenos (RA) por "Northern blot". 1) vesículas seminales de machos intactos, 2) vesículas seminales de machos gonadectomizados, 3) control negativo, 4) próstata de machos gonadectomizados, 5) próstata de machos intactos, 6) vesículas seminales de machos intactos, 7) vesículas seminales de machos gonadectomizados, 8) páncreas de machos intactos, 9) páncreas de machos gonadectomizados.

## Expresión del RNAm del Receptor a Andrógenos en el páncreas de la rata

Dado que por "Northern blot" no se detectó el RNAm del receptor a andrógenos en el páncreas, se utilizó la reacción RT-PCR como metodología alternativa. De esta manera a partir del RNA total se amplificaron dos fragmentos, uno de 860 pares de bases (pb) y otro de 416 pb aproximadamente. En la primera etapa de este trabajo, se hizo RT-PCR a las muestras de RNA de páncreas de ratas de una semana de nacidas, ratas macho adulto intactas, machos adultos castrados, machos adultos castrados y sustituidos con testosterona y ratas hembra adultas intactas. En la figura 8 se observa una fotografía representativa de un gel de los productos de amplificación del RA de estas muestras. Puede observarse una diferente cantidad del producto de amplificación en las muestras manejadas. Para normalizar la expresión del receptor a andrógenos observada en las diferentes muestras de RNA de páncreas se utilizó un control constitutivo de expresión, la ciclofilina. Se hicieron coamplificaciones del RA y de la ciclofilina de las mismas muestras.

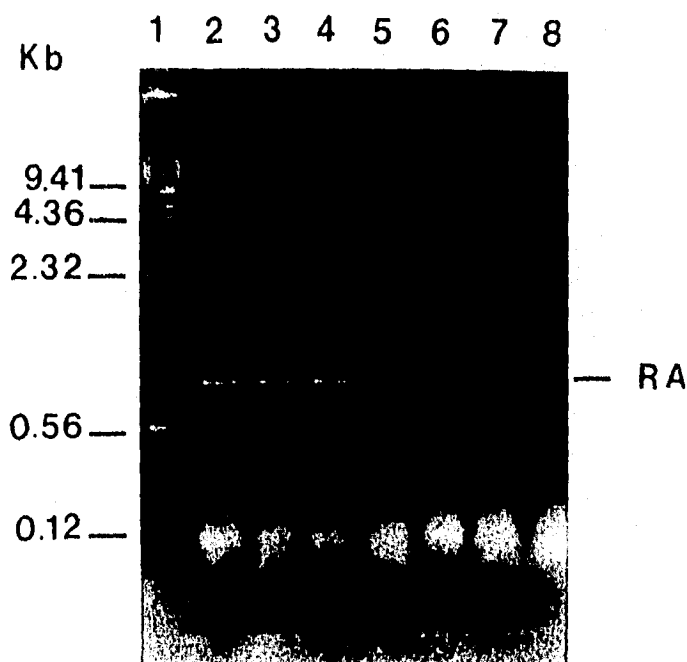


Figura 8. Electroforesis de los productos de RT-PCR del RA. Fragmento de aproximadamente 860 pb, amplificado a partir del RNA total de páncreas de rata. 1) marcadores de talla, 2) neonatos, 3) hembras adultas intactas, 4) machos castrados, 5) machos intactos, 6) machos castrados y sustituidos con testosterona, 7) testículos, 8) control negativo.

Para observar de manera semicuantitativa las diferencias en la expresión tanto de RA como de ciclofilina de las muestras consideradas, los productos de PCR se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y posteriormente se hibridizaron con el DNAc del RA y de la ciclofilina (respectivamente) marcado radiactivamente. En la figura 9 puede observarse la placa autorradiográfica de la hibridización de los productos de PCR del RA y de la ciclofilina. Se observa una mayor expresión del RA en la muestra de RNA de páncreas de rata hembra, le siguen las ratas de una semana de nacidas, los machos gonadectomizados, los machos intactos y finalmente los machos sustituidos. Con estos resultados puede decirse que los andrógenos regulan negativamente la expresión del RNA del RA.

En cuanto a la amplificación de la ciclofilina, se observaron ligeras variaciones en los diferentes grupos manejados, pero se cree que esto se debió al manejo de las muestras; por esta razón los resultados de la expresión del receptor a andrógenos de cada muestra, se presentan como la relación de la expresión RA/ciclofilina.

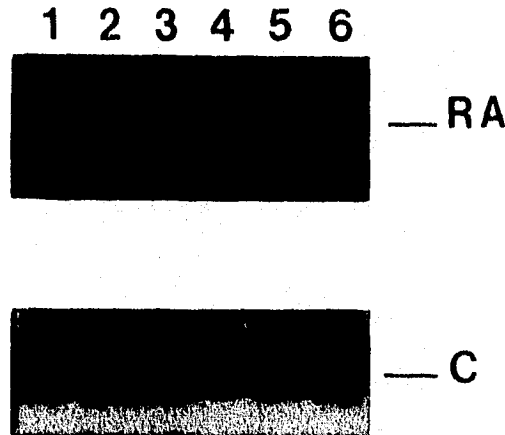


Figura 9. Análisis por "Southern blot" de los productos de PCR del receptor a andrógenos (RA) y de la ciclofilina (C). 1) neonatos, 2) hembras, 3) machos castrados, 4) machos intactos, 5) machos castrados y sustituidos, 6) testículos. Para el receptor a andrógenos se obtuvo un producto de 860 pb y de 569 pb aproximadamente para la ciclofilina.

Las placas autorradiográficas del análisis por "Southern blot" de los productos de RT-PCR del receptor a andrógenos y de la ciclofilina, se analizaron por densitometría en un "analyzer de imágenes". En la figura 10 se muestra la expresión relativa del RA respecto a la expresión de la ciclofilina.

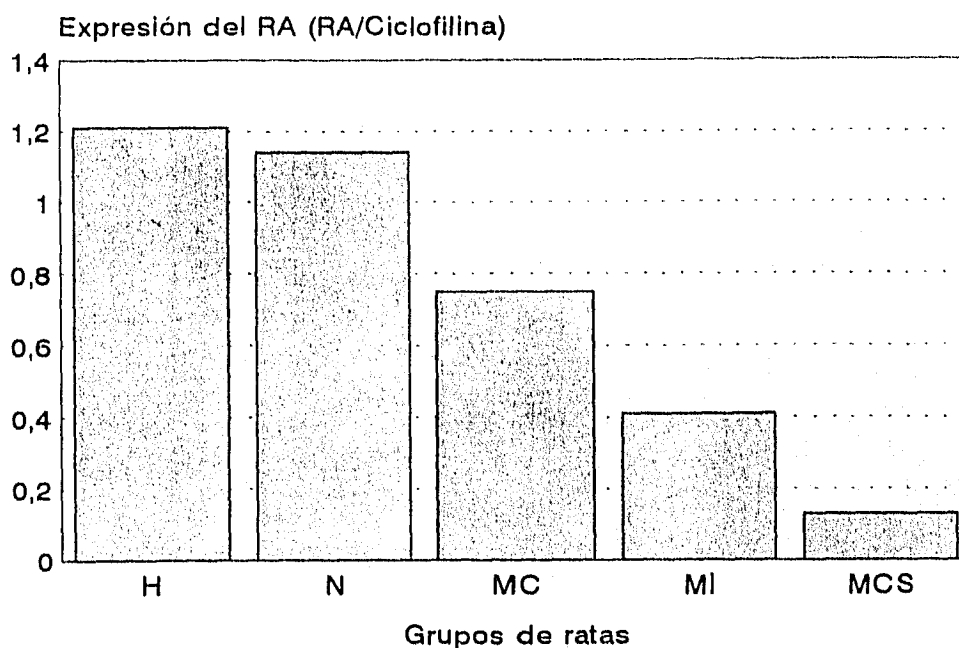


Figura 10. Expresión del receptor a andrógenos en relación a la expresión de la ciclofilina en el páncreas de diferentes grupos de ratas. H, hembras; N, neonatos; MC, machos castrados; MI, machos intactos; MCS, machos castrados y sustituidos con testosterona.

Para observar si el proceso de regulación del receptor a andrógenos depende del ambiente hormonal en el animal, en la segunda fase de este trabajo se formaron diferentes grupos de ratas hembra: prepúberes, púberes, adultas intactas, adultas castradas, adultas castradas y sustituidas con estradiol. De cada grupo, se obtuvo el RNA total del páncreas, y para el estudio de la expresión del RA, se empleó la misma estrategia experimental descrita anteriormente. En la figura 11 se muestra una fotografía representativa de la electroforesis de los productos de amplificación del RA de los grupos de animales considerados en esta fase del estudio. En la figura 12 se muestra una autorradiografía representativa del "Southern blot" de los productos de amplificación del RA y la ciclofilina.



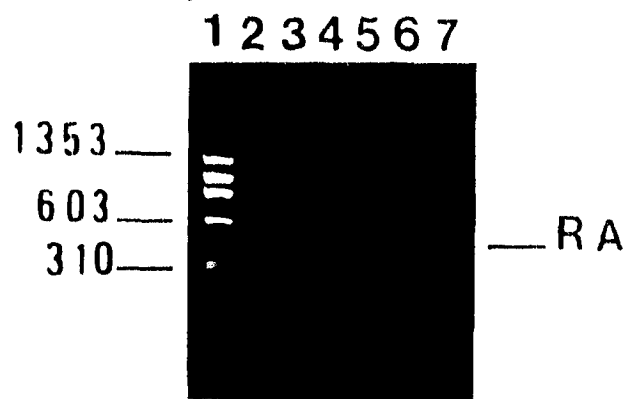


Figura 11. Electroforesis de los productos de amplificación (416 pb) del receptor a andrógenos de diferentes grupos de ratas. 1) marcadores de talla, 2) hembras prepúberes, 3) hembras púberes, 4) hembras adultas intactas, 5) hembras adultas gonadectomizadas, 6) hembras gonadectomizadas y sustituidas con estradiol, 7) próstata (control positivo).

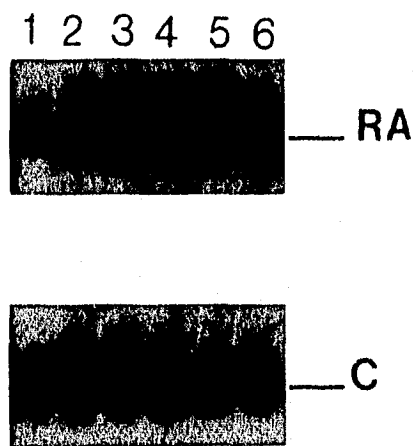


Figura 12. Análisis por "Southern blot" de los productos de PCR del receptor a andrógenos (RA) y de la ciclofilina (C). 1) hembras prepúberes, 2) hembras púberes, 3) hembras adultas intactas, 4) hembras adultas gonadectomizadas, 5) hembras gonadectomizadas y sustituidas con estradiol, 6) próstata.

Con el análisis densitométrico de las placas obtenidas por "Southern blot" y después del cálculo de la relación RA/ciclofilina, pudieron evidenciarse las diferencias reales en la expresión del RA en el páncreas de las ratas hembras. Se observó una expresión similar en las ratas prepúberes y púberes, aproximadamente cuatro veces mayor que la expresión del RA en las ratas adultas. En las ratas adultas gonadectomizadas se observa un incremento de poco más del doble que el observado en las adultas intactas. Finalmente las ratas castradas y sustituidas mostraron una expresión muy por arriba del resto de los grupos manejados. Estos resultados pueden observarse en la figura 13.

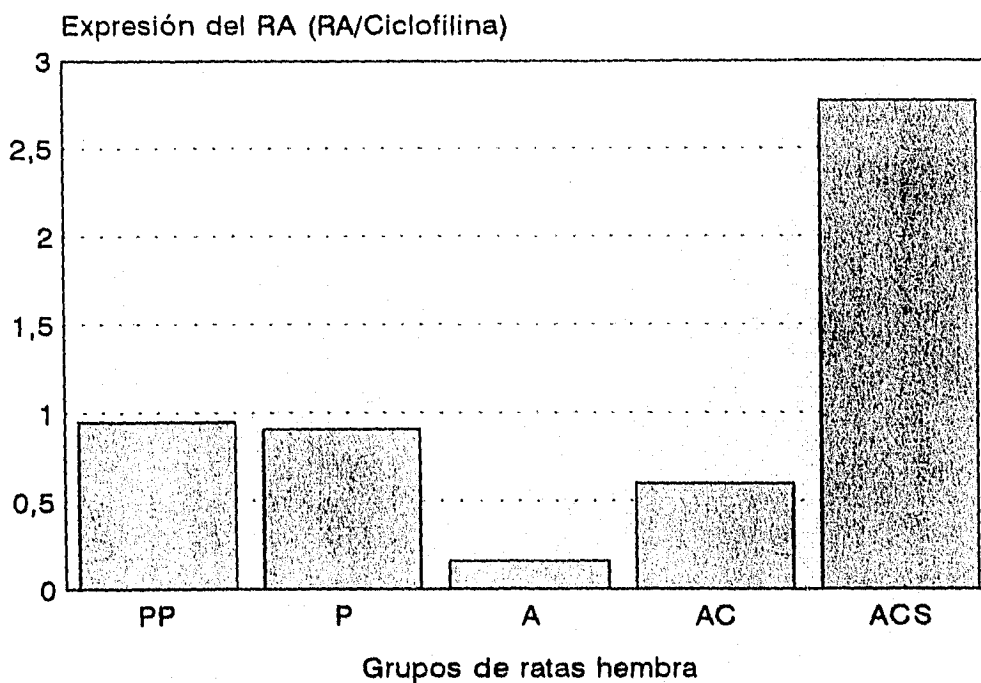


Figura 13. Expresión del RA en relación a la ciclofilina en el páncreas de diferentes grupos de ratas hembra. PP, prepúberes; P, púberes; A, adultas; AC, adultas castradas; ACS, adultas castradas y sustituidas con estradiol.

Al observar estos resultados puede pensarse que en el tejido pancreático de las ratas hembra, los estrógenos participan en la regulación de la expresión del RA, sin descartar la posibilidad de que tanto en machos como en hembras, la expresión del RA sea regulada por otros factores.

## DISCUSIÓN

Existen evidencias experimentales de que el páncreas está involucrado en el metabolismo de las hormonas esteroides. En este órgano se ha detectado la actividad de algunas enzimas que participan en la biosíntesis de esteroides como: la 5 alfa-reductasa (que cataliza la conversión de la testosterona a la dihidrotestosterona), la aromatasa (que biotransforma testosterona a estradiol), la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (que cataliza la oxidorreducción entre la androstendiona y la testosterona), y el complejo enzimático de la delta<sup>5</sup>-3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa isomerasa (que participa en la biotransformación de la pregnenolona a la progesterona y de dehidroepiandrosterona a androstendiona). Estos datos sugieren que el páncreas puede ser considerado como un sitio extragonadal de la biosíntesis de esteroides sexuales (Iqbal et. al., 1983; Mendoza-Hernández et. al., 1988; Mendoza-Hernández et. al., 1990).

Las hormonas esteroides desempeñan un papel importante en la función pancreática, esto se ha evidenciado al estudiar algunos de los efectos que tienen estas hormonas en el páncreas normal y tumoral. Se ha reportado que los glucocorticoides influyen en el desarrollo de las células endócrinas y exócrinas del páncreas (Hyuk-II Y. and Ping-Cheung L., 1992) provocando un aumento en la síntesis de proteínas totales, así como un incremento en la actividad de la amilasa y otras enzimas exócrinas (Githens, 1993). Así mismo, se ha observado que regulan la expresión del gen de insulina y de la enzima glucoquinasa en las células productoras de insulina RIN-m5F (Fernández-Mejía C. and Davidson M.B., 1992).

Los esteroides ováricos participan en la homeostasis de la glucosa e insulina (Lenzen et. al., 1984). Se ha observado que la administración de progesterona y estradiol en concentraciones fisiológicas, provocan un incremento en la secreción de insulina en la rata, tanto en el animal intacto como en islotes pancreáticos aislados (Lenzen et. al., 1984). Respecto a los andrógenos se tienen datos de algunos de los efectos que producen en ciertos tumores del páncreas. Se ha propuesto que la testosterona tiene un efecto trófico sobre el páncreas, ya que la administración de esta hormona a ratas macho gonadectomizadas restablece el peso del órgano sin modificaciones significativas en el peso total corporal (Lhoste et. al., 1987). Se ha sugerido que

los estrógenos juegan un papel inhibitor y los andrógenos un papel promotor, en la carcinogénesis pancreática en la rata. En animales macho, el crecimiento de los tumores pancreáticos disminuyó con la castración. un efecto similar fue observado cuando se suministró exogenamente 17  $\beta$ -estradiol (Sumi et. al., 1989).

Los efectos de las hormonas esteroides en sus tejidos blanco, están mediados por la interacción de estas, con proteínas específicas denominadas receptores.

Si bien en diferentes estudios se han detectado los receptores a estrógenos (El Seifi et. al., 1981; Sandberg et. al., 1974), progesterona (Winborn et. al., 1987), glucocorticoides (Svec et. al., 1981; Fisher et. al., 1990; Matthes et. al., 1994); e incluso proteínas que unen andrógenos en el páncreas (Pousset, 1976; Corbhisley et. al., 1986), el RA no había sido caracterizado molecularmente. En el presente estudio, no fue posible evidenciar la presencia de transcritos para el RA en el páncreas, empleando la técnica de "Northern blot". En el caso de la próstata y las vesículas seminales utilizados como controles positivos, se detectó una señal de 9.4 kb aproximadamente, que concuerda con los datos reportados del RNAm del receptor a andrógenos (Wolf et. al., 1993), en otros órganos andrógeno-dependientes. Los datos negativos en el análisis directo de las muestras de RNA de páncreas, nos hicieron pensar en la posibilidad de que el número de copias de RNAm para dicho receptor en el páncreas estuviera debajo del límite de detección del "Northern blot". Como estrategia experimental para incrementar la sensibilidad en la detección del mensaje específico del RA, se utilizó la reacción combinada de la transcriptasa reversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Esta técnica es utilizada para el estudio de los genes con un bajo nivel de expresión. La RT-PCR utiliza la reacción de la transcriptasa reversa para sintetizar, a partir del RNAm, el DNA complementario correspondiente, seguido de su amplificación por efecto de la Taq polimerasa (Kawasaki et. al., 1989). Con la reacción de PCR se produce la amplificación de un fragmento de DNA, dirigida por oligonucleótidos específicos; esta reacción hace que los segmentos del gen de interés se incrementen de una forma exponencial, lo que determina su alta sensibilidad (Mocharla H., Mocharla R. and Hodes M.E., 1990). Utilizando este procedimiento se realizó la amplificación de dos fragmentos del DNA complementario del RA (416 y 860 pb) correspondientes a la región amino terminal de este gen, esta región, presenta una alta variabilidad en la familia de receptores a hormonas esteroides, lo que nos aseguró que los productos génicos amplificados

correspondieran específicamente al receptor a andrógenos. Después de emplear esta metodología, fue posible la detección del mensaje específico del RA en el tejido pancreático, lo que permitió estudiar la regulación de la expresión del gen del receptor a andrógenos.

Una estrategia experimental similar, ha sido utilizada para el estudio de la expresión de los receptores a progesterona y estrógenos en el cerebro de la rata (Hagihara K., Hirata S., Osada T., Hirai M. and Kato J., 1992; Hirata S., Osada T., Hirai M., Hagihara K. and Kato J., 1992), ya que con esta metodología se puede detectar hasta una sola copia del gen de interés (Kawasaki et. al., 1989).

En la familia de receptores a hormonas esteroideas existe el fenómeno de autorregulación negativa por el ligando correspondiente. Este proceso ha sido descrito para los receptores a glucocorticoides (Okret S., Poellinger L., Dong Y. and Gustafsson J.A., 1986; Dong Y., Poellinger L., Gustafsson J. and Okret S., 1988), progesterona (Wei L.L., Krett N.L., Francis M.D., Gordon D.F., Wood W.M., O'Malley B.W. and Horwitz K.B., 1988) y estrógenos (Saceda M., Lippman M.E., Chambon P., Lindsey R.L., Ponglikitmongkol M., Puente M. and Martin M.B., 1988; Saceda M., Lippman M.E., Lindsey R.K., Puente M. and Martin M.B., 1989). La regulación negativa del RNAm de estos receptores se produce por una disminución en la tasa de transcripción de los genes correspondientes. Respecto a la regulación del RA por su ligando, existen datos que muestran efectos a nivel transcripcional y postranscripcional. Algunos estudios de genes andrógeno-regulados en el riñón (Berger F.G., Loose D., Meisner H. and Watson G., 1986) y en el epidídimo del ratón (Cornwall G.A., Orgebin-Crist M.C. and Hann S.R., 1992) muestran que los andrógenos controlan primeramente la estabilidad del RNAm, ya que con la administración de estas hormonas se aprecia un incremento en las concentraciones de las proteínas estudiadas. Recientemente se ha propuesto que en ciertos tipos celulares de cáncer de próstata (LNCaP) y de cáncer de mama (T47D), los andrógenos regulan la expresión de su RNAm a nivel transcripcional, modulando el inicio de la transcripción (Wolf et. al., 1993). Se ha observado una disminución de hasta el 75% en los transcritos nucleares del receptor a andrógenos en estas líneas celulares, después de la administración de andrógenos. La autorregulación del receptor a andrógenos se ha estudiado tanto en órganos andrógeno-dependientes como la próstata ventral, el epidídimo (Quarimby et. al., 1990) y las vesículas

seminales (Shan et. al., 1990); así como en tejidos que muestran pocos cambios morfológicos en respuesta a los andrógenos, como el cerebro y el riñón; y en algunas líneas celulares de cáncer de próstata como LNCaP (Quarby et. al., 1990) y células de hepatoma humano (Shan et. al., 1990). En todos los casos referidos, se observó un incremento en las concentraciones del RNAm del RA después de la deprivación de andrógenos, lo que es interpretado como una autorregulación negativa del gen de este receptor sin importar el hecho de que sea o no un tejido dependiente de andrógenos.

En el presente trabajo se obtuvieron datos interesantes respecto a la autorregulación del RA por su propio ligando en el páncreas de la rata, observándose una dinámica similar a los órganos sensibles a los andrógenos. En las ratas macho se encontró una regulación negativa del RA por andrógenos, pues se observó un incremento de más del doble en la expresión del gen del RA en el páncreas de las ratas macho gonadectomizadas en comparación con los machos intactos, y disminuyó por debajo del nivel de expresión de los controles en los machos gonadectomizados y sustituidos con testosterona. Estos hallazgos son consistentes con los datos referidos anteriormente ya que demuestran que la deprivación de andrógenos incrementa la expresión del RNAm del RA y que el restablecimiento de los niveles de estas hormonas, revierten dicho efecto. Estos resultados son interpretados como una evidencia de la funcionalidad del RA en el páncreas y apoyan los datos referentes a los efectos de los andrógenos en este órgano, de manera similar a lo reportado por El Seifi et. al. (1981) quienes mencionan que los esteroides ováricos estimulan la secreción de insulina por sus efectos directos sobre la célula  $\beta$ , pues detectaron receptores a estrógenos y progesterona en las células endócrinas del páncreas.

Es importante resaltar el hecho de que con los datos originales aquí reportados, se confirma que el fenómeno de autorregulación del gen del RA (Shan et. al., 1990) es un proceso ampliamente distribuido y que no se limita a los órganos clásicamente dependientes de andrógenos.

En la regulación de la expresión del RA en ratas hembra, se observó una aparente participación de los estrógenos. Las ratas hembra prepúberes, púberes y las hembras ovariectomizadas, mostraron una mayor expresión que las hembras adultas intactas. Estos datos (al menos en nuestro modelo) indican que los estrógenos regulan negativamente los niveles del RNAm del RA, mostrando un proceso heterólogo en el que una hormona esteroide regula la expresión del gen del receptor a otro esteroide diferente. Existen datos en la literatura que demuestran la

participación de los estrógenos en la regulación de la expresión del RA: en estudios realizados por Prins G.S. en 1992, se encontró que la aplicación de estrógenos a ratas recién nacidas, causa una reducción en el RA en la próstata. Jausi y colaboradores, encontraron que los estrógenos actuaban a nivel de la transcripción de ciertos genes que responden a andrógenos en el riñón de ratón, probablemente compitiendo por el mismo o diferentes elementos de respuesta en la región regulatoria de dichos genes (Jausi R., Watson G. and Paigen K., 1992). Por otra parte, Lin y colaboradores encontraron que los estrógenos inducían una disminución en la expresión del RNAm del RA en cultivos celulares de músculo liso del cuerpo cavernoso de la rata, proponiendo que dicha regulación es mediada por el receptor a estrógenos o a través de una intermediación ("cross-talk") con el receptor a andrógenos, y que el control por estrógenos se da a nivel transcripcional, ya que en el promotor del gen del RA se han identificado elementos consenso que responden a otras hormonas esteroideas (Lin M.C., Rajfer J., Swerdloff R.S. and González-Cadavid N.F., 1993). Con lo anterior podemos decir que la regulación transcripcional del RA puede darse como un fenómeno autólogo o heterólogo, esto es, que la expresión del gen del RA puede estar modulada por los propios andrógenos o por otras hormonas esteroideas como los estrógenos. Este es un proceso similar al descrito para el receptor a progesterona (Wei et.al., 1988), el cual es regulado negativamente por su ligando natural y de manera positiva por los estrógenos.

Con los datos obtenidos en el presente estudio, no es posible describir con certeza como es que la expresión del gen del RA en el páncreas, puede regularse dependiendo del ambiente hormonal, pero si dan la pauta para proponer la existencia de un dimorfismo sexual fisiológico que se discutirá más adelante.

Es interesante mencionar la regulación diferencial por sexo de la expresión del gen del RA en el páncreas de la rata, observada en el presente estudio. En las ratas macho se encontró una regulación autóloga (por andrógenos) de la expresión del RA, a diferencia de las hembras en las que presentó una regulación heteróloga (por estrógenos) en la expresión del gen de dicho receptor. Aunque no existen datos en la literatura relativos a este hecho en condiciones fisiológicas, los estudios que se han realizado en patologías del páncreas, resultan datos interesantes de analizar.

En estudios clínicos se ha encontrado que la incidencia del cáncer de páncreas es mucho mayor

en los hombres que en las mujeres (Fernández-del Castillo C., Robles-Díaz G., Díaz-Sánchez V. and Altamirano A., 1990), este hecho concuerda con el dato de que en modelos de carcinogénesis inducida en animales, se ha observado que las ratas hembra presentan una menor cantidad de lesiones preneoplásicas en comparación con los machos después del tratamiento con un agente carcinogénico (Lhoste et. al., 1987). Estos datos indican un efecto diferencial por sexo, de los andrógenos, o un efecto conjunto de andrógenos y estrógenos en el efecto trófico observado.

Es conveniente mencionar que además de los estados de cáncer de páncreas, existen también datos interesantes en otras patologías como la diabetes experimental.

En la diabetes experimental inducida por aloxana y estreptozocina, se ha visto un desarrollo mas rápido y severo de la enfermedad en machos que en hembras. Las ratas hembra gonadectomizadas se vuelven mas susceptibles a la aparición de esta enfermedad, en cambio la orquidectomía en los machos disminuye la susceptibilidad a la enfermedad. Cuando se suministran estrógenos naturales a ratas intactas y castradas, se reduce la severidad de la diabetes experimental en ambos sexos (Rossini et al. 1978, Maclaren et al. 1980).

Estos hechos nos hacen pensar que existe una cierta predisposición en ambientes androgénicos ricos, a diferencia de los ambientes estrogénicos, que podría ser protectores contra ciertas patologías.

De esta manera podría especularse que en estado fisiológico, los andrógenos muestran un efecto diferencial en ratas hembra y en machos, pues si existen variaciones en la expresión del gen del RA, de igual manera podrían variar las concentraciones del receptor y por esta causa, el efecto fisiológico de estas hormonas en el páncreas sería diferente. Aunque en el presente trabajo no se cuenta con datos respecto a la proteína (receptor a andrógenos), debido a las propias condiciones del tejido, se abren las perspectivas para que en posteriores estudios se consideren otros aspectos que serían importantes para conocer el efecto de las hormonas esteroides en el páncreas.

Aunque con los resultados obtenidos en el presente estudio no puede decirse de manera certera el o los efectos de los andrógenos en el páncreas normal, el hecho de haber detectado productos de transcripción del gen del receptor a andrógenos y de haber observado su autorregulación en



el modelo de estudio, puede indicar que el tejido pancreático responde a la acción de los andrógenos, y que estos participan en la fisiología del páncreas normal. Falta por determinar, en estudios posteriores, cuales son los efectos que producen estas hormonas, pero el hecho de haber detectado molecularmente el RA y haber estudiado parte de la regulación de su expresión en el páncreas, constituye una aportación original que da la pauta para continuar con mas estudios en este campo.

## REFERENCIAS

Baarens W.M., Themmen A.P.N., Blok L.J., Mackenbach P., Bringmann A.O., Meijer D., Faber P.W., Trapman J. and Grootgoed J.A. (1990): The rat androgen receptor gene promoter. **Mol. Cell. Endocrinol.**, **74**:7584.

Beato M. (1988): Gene regulation by steroid hormones. **Cell**, **56**:275-284.

Berger F.G., Loose D., Meisner H. and Watson G. (1986): Androgen induction of messenger RNA concentrations in mouse kidney is posttranscriptional. **Biochem.**, **25**:1170-1175.

Blok L.J., Bartlett J.M., Bolt-de Vries J., Themmen A.P.N., Brinkmann A.O., Weinbauer G.F., Nieschlag E. and Grootgoed J.A. (1991): Regulation of androgen receptor mRNA and protein in the rat testis by testosterone. **J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.**, **40**:343-347.

Boyle P., Hsieh C.C., Maisonneuve P., La Vecchia C., Macfarlane G.J., Walker A.M. and Trichopoulos D. (1989): Epidemiology of pancreas cancer. **Int. J. Pancreatol.**, **5**:327-346.

Breathnach R. and Chambon P. (1981): Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. **Ann. Rev. Biochem.**, **50**:349-383.

Brinkmann A.O., Jenster G., Kuiper G.G.J.M., Ris C., Van Laar J.H., Van der Korput J.A.G.M., Degenhart H.J., Trifiro M.A., Pinsky L., Romalo G., Schweikert H.U., Veldscholte J., Mulder E. and Trapman J. (1992): The human androgen receptor: structure/function relationship in normal and pathological situations. **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.**, **41**:361-368.

Brown T.A. (1991): **Essential molecular biology: A practical approach**. IRL Press, Oxford., 299 pp.

Buratowski S., Hahn S., Sharp P.A. and Guarante L. (1988): Function of a yeast TATA element binding protein in a mammalian transcription system. **Nature.**, **334**:37-42.

Carson-Jurica M.A., Schrader W.T. and O'Malley W. (1990): Steroid receptor family: Structure and functions. **Endocrine Rev.**, **11**:201-214.

Cathala G., Savouret J.F., Méndez B., West B.L., Karin M., Martial J.A. and Baxter J.D. (1983): A method for isolation of intact translationally active ribonucleic acid. **RNA**, **2**:329-335.

Chawshang C., Kokontis J. and Liao S. (1988): Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **85**:7211-7215.

- Cohen R.B., Sheffery M. and Kit C.G. (1986): Partial purification of a nuclear protein that binds to the CCAAT box of the mouse  $\alpha$ 1-globin gene. *Mol. Cell. Biol.*, **6**:821-832.
- Corbishley T.P., Iqbal M.J., Wilkinson M.L. and Williams R. (1986): Androgen receptor in human and malignant pancreatic tissue and cell lines. *Cancer*, **57**:1992-1995.
- Cornwal G.A., Orgebin-Crist M.C. and Hann S.R. (1992): Differential expression of the mouse mitochondrial genes and the mitochondrial RNA-processing endoribonuclease RNA by androgens. *Mol. Endocrinol.*, **6**:1032-1042.
- Davis L.G., Dibner D.M. and Battey J.F. (1986): **Basic methods in molecular biology.** Elsevier, New York. 388 pp.
- Doyen N., Dreyfus M. and Rougeon F. (1989): Regulatory elements involved in the bidirectional activity of an immunoglobulin promoter. *Nucleic Acid Res.*, **17**:1977-1987.
- Eisenmann D.M., Dollard C. and Winston F. (1989): SPT15, the gene encoding the yeast TATA binding factor TFIID, is required for normal transcription initiation in vivo. *Cell.*, **58**:1183-1191.
- El Seifi S., Green I.C. and Perrin D. (1981): Insulin release and steroid-hormone binding in isolated islets of langerhans in the rat: effects of ovariectomy. *J. Endocrinol.*, **90**:59-67.
- Faber P.W., van Rooij H.C., van der Korput H.A., Baarends W.M., Brinckmann A.O., Grootegoed J.A. and Trapman J. (1991): Characterization of the human androgen receptor transcription unit. *J. Biol. Chem.*, **266**:10743-10749.
- Feinberg A. and Vogelstein B. (1983): A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **137**:6-13.
- Fekete M., Zalutnai A., Comaru-Schally A.M. and Schally A.V. (1989): Membrane receptors for peptides in experimental and human pancreatic cancers. *Pancreas*, **4**:521-528.
- Fernández-del Castillo C., Robles-Díaz G., Díaz-Sánchez V. and Altamirano A. (1990): Pancreatic cancer and androgen metabolism: high androstenedione and low testosterone levels. *Pancreas*, **5**:515-518.
- Fernández-del Castillo C., Díaz-Sánchez V., Varela-Fascinetto G., Altamirano A., Odo-Morales A., López-Medrano R.M. and Robles-Díaz G. (1991): Testosterone biotransformation by the isolated perfused canine pancreas. *Pancreas*, **6**:104-111.
- Fernández-Mejía C. and Davidson M.B. (1992): Regulation of glucokinase and proinsulin gene expression and insulin secretion in RIN-m5F cells by dexamethasone, retinoic acid and thyroid hormone. *Endocrinology*, **130**:1660-1668.

Fischer B., Rausch U., Wollny P., Westphal H., Seitz J. and Aumüller G. (1990): Immunohistochemical localization of the glucocorticoid receptor in pancreatic  $\beta$ -cells of the rat. **Endocrinology**, **126**:2635-2641.

Formental C., Kanno M., Nomiya M. and Chambon P. (1988): Cooperativity and hierarchical levels of functional organization in the SV40 enhancer. **Cell**, **54**:943-953.

Fujimoto J., Nishigaki M., Hori M., Ichigo S., Itoh T. and Tamaya T. (1994): The effect of estrogen on androgen receptors and mRNA levels in uterine leiomyoma, myometrium and endometrium of human subjects. **J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.**, **50**:137-143.

Fujimoto R., Morimoto I., Morita E., Sugimoto H., Ito Y. and Eto S. (1994): Androgen receptors, 5 alpha-reductase activity and androgen-dependent proliferation of vascular smooth muscle cells. **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.**, **53**:169-174.

Githens S. (1993): Differentiation and development of the pancreas in animals. In: Go VLW, Dimagno P, Gardner UD, Lebenthal E, Reber HA, Scheele A. (Eds.) **The pancreas, Biology, Pathobiology and Disease**. Raven Press Ltd, New York, 21-55 pp.

Gittes G. and Rutter W.J. (1992): Onset of cell-specific gene expression in the developing mouse pancreas. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **89**:1128-1132.

Green B. and Leake R.E. (1987): **Steroid hormones: a practical approach**. IRL Press, Oxford. 261 pp.

Greenway B., Duke D., Pym B., Iqbal M.J., Johnson P.J. and Williams R. (1982): The control of human pancreatic adenocarcinoma xenografts in nude mice by hormone therapy. **Br. J. Surg.**, **69**:595-597.

Griffin J.E. and Ojeda S.R. (1992): **Textbook of endocrine physiology**. Oxford University Press, New York. 351 pp.

Haendler B., Hofer-Warbinek R. and Hofer E. (1987): Complementary DNA for human T-cell cyclophilin. **EMBO Journal**, **6**:947-950.

Hagihara K., Hirata S., Osada T., Hirai M. and Kato J. (1992): Expression of progesterone receptor in the neonatal rat brain cortex: detection of its mRNA using reverse transcription-polymerase chain reaction. **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.**, **41**:637-640.

Hahn S., Buratowski S., Sharp P.A. and Guarente L. (1989): Isolation of the gene encoding the yeast TATA binding protein TFIIID: a gene identical to SPT15 suppressor of Ty element insertion. **Cell**, **58**:1173-1181.

Hariharan N. and Perry R.P (1990): Functional dissection of a mouse ribosomal protein promoter: significance of the polypyrimidine initiator and element in the TATA box region. **Proc. Natl. Academ. Sci. USA.**, **87**:1526-1530.

Hiipakka R.A. and Liao S. (1989): Inhibition of the intracellular transformation of rat ventral prostate androgen receptor by 3'-deoxyadenosine. In: Roy A.K, Clark J.H. (Eds.), **Gene Regulation by Steroid Hormones IV**. Springer-Verlag, New York, pp 182-196.

Hirata S., Osada T., Hirai M., Hagihara K. and Kato J. (1992): Expression of estrogen receptor in the rat brain: detection of its mRNA using reverse transcription-polymerase chain reaction. **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.**, **41**:583-587.

Hyuk-II Yoon and Ping-Cheung Lee. (1992): Autologous regulation of pancreatic glucocorticoid receptors in suckling rats. **Pancreas**, **7**:226-232.

Iqbal J.M., Greenway B., Wilkinson M.L., Johnson P.J. and Williams R. (1983): Sex-steroid enzymes, aromatase and 5 $\alpha$ -reductase in the pancreas: a comparison of normal adult, foetal and malignant tissue. **Clin. Science.**, **65**:71-75.

Jaussi R., Watson G. and Paigen K. (1992): Modulation of androgen-responsive gene expression by estrogen. **Mol. Cell. Endocrinol.**, **86**:187-192.

Johnson P.F. and McKnight S.T. (1989): Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. **Ann. Rev. Biochem.**, **33**:313-314.

Kawasaki E.S. and Wang A.M. (1989) Detection of gene expression. In: Erlich H.A. (Ed), **PCR Technology**. Stockton Press, New York. pp 89-97.

Khoury G. and Gruss P. (1983): Enhancer elements. **Cell.**, **33**:313-314.

Kirdani R.Y., Varkarakis M.J., Murphy G.P. and Sandberg A.A. (1972): Distribution of simultaneously injected androgens and oestrogens in animal tissues. **Endocrinology**, **90**:1245-1251.

Krongrad A., Wilson C.M., Wilson J.D., Allman D.R. and McPhaul M.J. (1991): Androgen increases androgen receptor protein while decreasing receptor mRNA in LNCaP cells. **Mol. Cell. Endocrinol.**, **76**:79-88.

Landers J.P. and Spelsberg T.C. (1992): New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene Express.**, **2**:19-63.

Lenzen S. and Bailey C.J. (1984): Thyroid hormones, gonadal and adrenocortical steroids and the function of the islets of Langerhans. **Endocrine Rev.**, **5**:411-434.

- Levin A.C., Ren M., Haber G.K. and Kirschenbaum A. (1992): The effect of the androgen, estrogen and growth factors on the proliferation of cultured fibroblast derived from human fetal and adult prostates. **Endocrinology**, **130**:2413-2419.
- Lhoste E.F., Roebuck B.D., Stern J.E. and Longnecker D.S. (1987): Effect of orchietomy and testosterone on the early stages of azaserine-induced pancreatic carcinogenesis in the rat. **Pancreas**, **1**:38-43.
- Lin M.C., Rajfer J., Swerdloff R.S. and González-Cadavid N.F. (1993): Testosterone down-regulates the levels of androgen receptor mRNA in smooth muscle cells from the rat corpora cavernosa via aromatization to estrogens. **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.**, **45**:333-343.
- Longnecker D.S., Jamieson J.D. and Asch H.L. (1989): Regulation of growth and differentiation in pancreatic cancer. **Pancreas**, **4**(2):256-275.
- Lubahn D.B., Joseph D.R., Sar M., Tan J., Higgs H.N., Larson R.E., French F.S. and Wilson M.E. (1988): The human androgen receptor : complementary deoxyribonucleic acid cloning , sequence analysis and gene expression in prostate. **Molec. Endocrinol.** **2**:1265-1275.
- Lubahn D.B., Joseph D.R., Sullivan P.M., Willard H.F., French F.S. and Willson E.M. (1988): Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. **Science**, **240**:327-330.
- Lubahn D.B., Brown T.R., Simental J.A., Higgs H.N., Migeon C.J., Wilson E.M. and French F.S. (1989): Sequence of intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point of mutation in a family with complete androgen insensitivity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **86**:9534-9538.
- Maclaren N.K., Neufeld M., Mclaughlin J.V. and Taylor G. (1980): Androgen sensitisation of streptozocin induced diabetes in mice. **Diabetes** **29**:710-716.
- Matthes H., Kaiser A., Stier U., Riecken E.O. and Rosewicz S. (1994): Glucocorticoid receptor gene expression in the exocrine and endocrine rat pancreas. **Endocrinology**, **135**:476-479.
- Mendoza-Hernández G., López-Solache I., Rendón J.L., Díaz-Sánchez V. and Díaz-Sagoya J.C. (1988): 17 $\beta$  Hydroxysteroid dehydrogenase activity in canine pancreas. **Biochem. and Biophys. Res. Comm.**, **152**:376-382.
- Meijers M., Vissier C.J.T., Klijn J.G.M., Lamberts S.W.J., van Garden-Hoetmer A., Jong F.H., Foekens J.A. and Woutersen R.A. (1992): Effects of orchietomy, alone or in combination with testosterone, and cyproterone acetate on exocrine pancreatic carcinogenesis in rats and hamsters. **Int. J. Pancreatol.** **11**:137-146.

Mendoza-Hernández G., López-Solache I. and Rendón J.L. (1990):  $\Delta^5$ - $3\beta$  Hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase activity in canine pancreas. *Life Sciences*, **47**:467-475.

Mocharla H., Mocharla R. and Hodes M.E. (1990): Coupled reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) as a sensitive and rapid method for isozyme genotyping. *Gene*, **93**:271-275.

Müller H.P., Sogo J.M. and Schaffner W. (1989) An enhancer stimulates transcription in trans when attached to the promoter via a protein bridge. *Cell.*, **58**:767-777.

Myers R.M., Tilly K. and Maniatis T. (1986): Fine structure genetic analysis of a  $\beta$ -globin promoter. *Science* **232**:613-618.

Norris D.O. (1980): **Vertebrate endocrinology**. Lea and Febiger, Philadelphia, 544 pp.

Okret S., Poellinger L., Dong Y. and Gustaffson J.A. (1986): Down- regulation of glucocorticoid receptor mRNA by glucocorticoid hormones and recognition by the receptor of a specific binding sequence within a receptor cDNA clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83**:5899-5903.

Page M.J. and Parker M.G. (1982): Effect of androgen on the transcription of rat prostatic binding protein genes. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **27**:343-355.

Pousette A., Calström K., Sköldefors H., Wilkin N. and Theve N.O. (1982): Purification and partial characterization of a  $17\beta$ -estradiol-binding macromolecule in the human pancreas. *Cancer Res.*, **42**:633-637.

Pousette A. (1976): Demonstration of an androgen receptor in rat pancreas. *Biochem. J.*, **157**:229-232.

Prins G.S. (1992): Neonatal estrogen exposure induces lobe-specific alterations in adult rat prostate androgen receptor expression. *Endocrinology*, **130**:2401-2412.

Ptashne M. (1988): How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature.*, **355**:683-685.

Quarby V.E., Yarbrough W.G., Lubahn D.B., French F.S. and Wilson E.M. (1990): Autologous down-regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid. *Mol. Endocrinol.*, **4**:22-28.

Redding T.W. and Schally A.V. (1984): Inhibition of growth of pancreatic carcinomas in animal models by analogs of hypothalamic hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**:248-252.

- Robles-Díaz G., Díaz-Sánchez V., Méndez J.P., Altamirano A. and Wolpert E. (1987): Low serum testosterone/dihydrotestosterone ratio in patients with pancreatic carcinoma. **Pancreas**, **2**:684-687.
- Robles-Díaz G., Díaz-Sánchez V., Fernández-del Castillo C., Morales M., Aceves G., Galván E. and Altamirano A. (1991): Serum testosterone:dihydrotestosterone ratio and CA 19-9 in the diagnosis of pancreatic cancer. **Am. J. Gastroenterol.**, **86**:591-594.
- Rossini A.A., Williams R.M., Appel M.C. and Like A.A. (1978): Sex differences in the multiple dose streptozocin model of diabetes. **Endocrinol.**, **103**:1518-1520.
- Saceda M., Lippman M.E., Lindsey R.K., Puente M. and Martin M.B. (1989): Role of an estrogen receptor-dependent mechanism in the regulation of estrogen receptor mRNA in MCF-7 cells. **Mol. Endocrinol.**, **3**:1782-1787.
- Sambrook J., Fritsch T. and Maniatis T. (1989): **Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. I, II, III.** Cold Spring Harbor Lab., New York.
- Sandberg A.A. and Rosenthal H.E. (1974): Estrogen receptor in the pancreas. **J. Steroid Biochem.**, **5**:969-975.
- Sandberg A.A. and Rosenthal H.E. (1979): Steroid receptors in exocrine glands: the pancreas and prostate. **J. Steroid Biochem.**, **11**:239-299.
- Schmid W., Strahle U., Mestrl R., Klock G., Ankenbauer W. and Schutz G. (1989): Steroid response elements. Definition of a minimal promoter and interaction with other activating sequences. In: Roy A.K., Clark J.H. (Eds.), **Gene Regulation by Steroid Hormones IV.** Springer-Verlag, New York. pp 78-88.
- Seghal A., Patil N. and Chao M. (1988): A constitutive promoter directs expression of a nerve growth factor receptor gene. **Mol. Cel. Biol.** **8**:3160-3167.
- Shan L.X., Rodríguez M.C. and Janne O.A. (1990): Regulation of androgen receptor protein mRNA concentrations by androgens in rat ventral prostate and seminal vesicles and in human hepatoma cells. **Mol. Endocrinol.**, **4**:1636-1646.
- Simental J.A., Sar M., Lane M.V., French F.S. and Wilson E.M. (1991): Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. **J. Steroid Biochem.**, **266**:510-518.
- Smale S.T. and Baltimore D. (1989): The "initiator" as a transcription control element. **Cell.**, **57**:103-113.



Sumi C., Brinck-Johnsen T. and Longnecker D.S. (1989): Inhibition of a transplantable pancreatic carcinoma by castration and estradiol administration in rats. **Cancer Res.** **49**:6687-6692.

Svec F. and Rudis M. (1981): Glucocorticoid hormone receptors in rat pancreas. **Biochim. Biophys. Acta.**, **674**:30-36.

Szende B., Srkalovic G., Schally A.V., Lapis K. and Groot K. (1990): Inhibitory effects of analogs of luteinizing hormone-releasing hormone and somatostatin on pancreatic cancers in hamsters. **Cancer**, **65**:2279-2290.

Takeda H., Nakamoto T., Kokontis J., Chodak G.W. and Chang C. (1991): Autoregulation of androgen receptor expression in rodent prostate: immunohistochemical and *in situ* hybridization analysis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **177**:488-496.

Tilley W.D., Marcelli M. and McPhaul M.J. (1990a): Expression of the human androgen receptor gene utilizes a common promoter in diverse human tissues and cell lines. **J. Biol. Chem.** **265**:13776-13781.

Tilley W.D., Wilson C.M., Marcelli M. and McPhaul M.J. (1990b): Androgen receptor gene expression in human prostate carcinoma cell lines. **Cancer Res.**, **50**:5382-5386.

Tokunaga K., Hirose S. and Suzuki Y. (1984): In monkey COS cells only the TATA box and the cap site region are required for faithful and efficient initiation of the fibroin gene transcription. **Nucleic Acid Res.**, **12**:1543-1558.

Trapman J., Ris-Stalpers C., Van der Korput J.A., Kuiper G.G., Faber P.W., Roming J.C., Mielder E. and Brinkmann A.O. (1990): The androgen receptor functional structure and expression in transplanted human prostate tumors and prostate tumor cell lines. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, **37**:837-842.

Truss M., Chalepakis G., Piña B., Baretino D., Brüggemeier U., Kalff M., Slater E.P. and Beato M. (1992): Transcriptional control by steroid hormones. **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.**, **41**:241-248.

Truss M. and Beato M. (1993): Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. **Endocrine Rev.**, **14**:459-479.

Walsh P.C. and Wilson J.D. (1976): The induction of prostatic hypertrophy in the dog with androstendiol. **J. Clin. Invest.** **57**:1093-1097.

Wei L.L., Krett N.L., Francis M.D., Gordon D.F., Wood W.M., O'Malley B.W. and Horwitz K.B. (1988): Multiple human progesterone receptor messenger ribonucleic acids and their autoregulation by progestin agonist and antagonist in breast cancer cells. **Mol. Endocrinol.**, **2**:62-72.

Wheater P.R., Burkitt H.G. and Daniels V.G. (1987): **Functional histology**. Churchill Livingstone, London. 348 pp.

Williams-Ashman H.G. (1980): Enigmas in the molecular biology of androgen action. In: Roy A.K, Clark J.H. (Eds.), **Gene regulation by steroid hormones**. Springer-Verlag, New York, pp 190-193.

Winborn W.B., Sheridan P.J. and McGill Jr H.C. (1987): Localization of progestin receptors in the islets of Langerhans. **Pancreas**, **2**:289-294.

Wolf D.A., Herzinger T., Hermenking H., Blaschenke D. and Hörz W. (1993): Transcriptional and posttranscriptional regulation of the human androgen receptor expression by androgen. **Molec. Endocrinol.**, **7**:924-936.

Yamamoto K.R. (1985): Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. **Ann. Rev. Genet.**, **19**:209-252.

Zenke M., Grundström T., Matthes H., Wintzerith M., Schatz C., Wildeman A. and Chambon P. (1986): Multiple sequence motifs are involved in SV40 enhancer function. **EMBO J.**, **5**:387-