



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QU



EXAMENES PROFESIONALES
"ACTIVIDAD DE LA 5ª - ESTERONA
REDUCTASA EN LA GLANDULA HARDERIANA
DE LA RATA"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
DELIA HERNANDEZ CRUZ



MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE : PROF. MAGDALENA OLIVA GONZALEZ

VOCAL : PROF. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

SECRETARIO : PROF. BERTHA ALICIA CHÁVEZ CANO

1er SUPLENTE : PROF. LUZ DEL CARMEN CASTELLANOS ROMAN

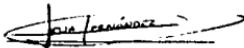
2do SUPLENTE : PROF. RAQUEL ORTEGA MUÑOZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA
INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"
Departamento de Biología de la Reproducción
Vasco de Quiroga N° 15 Delegación Tlalpan.

ASESOR


M. en C. Bertha Alicia Chávez Cano

SUSTENTANTE


Delia Hernández Cruz

AGRADECIMIENTOS

Hago patente mi agradecimiento a la M. en C. Bertha Alicia Chávez Cano, por su acertada dirección para la elaboración de esta tesis, por compartir sus conocimientos y experiencia profesional, así como por la amistad profesada durante todo este tiempo.

Y muy especialmente al M. en C. Felipe Vilchis Uribe por su apoyo e invaluable consejos durante el desarrollo de este trabajo.

Mi sincero agradecimiento a la profesora Magdalena Oliva González por su gran apoyo en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por sus comentarios y sugerencias que ayudaron a enriquecer el contenido de esta tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, y en especial a la Facultad de Química y a sus profesores por los conocimientos otorgados durante estos años de estudio.

Al Departamento de Biología de la Reproducción y en especial al laboratorio de Bioquímica Hormonal del Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubirán" por las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis.

DEDICATORIAS

Angelina Cruz de Hernández y José Mercedes Hernández Sánchez a ustedes que son las personas más importantes en mi vida, gracias, por todos esos años de amor, cariño y confianza depositados en mí, por sus esfuerzos y sacrificios.

Madre:

Con profundo amor y cariño, por haber sabido guiarme por el buen camino.

Padre:

Con admiración y respeto, por haberme mostrado dos grandes virtudes: rectitud y superación.

A mis hermanos:

Victor Manuel, Laura Lilia y Luis Enrique, por ser lo que son, tres grandes hermanos que me han alentado a seguir adelante.

A mis sobrinos:

Victor Alfonso y Carlos Augusto.

A mis familiares

*A mis compañeras y amigas:
Rosalba Villegas, Graciela
Rocío y Eugenia*.*

CONTENIDO

NOTACIÓN

1. INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	3
1.1 Objetivos	4
2. GLÁNDULA HARDERIANA	5
2.1 Introducción	5
2.2 Glándula de Harder	6
2.3 Glándula Harderiana de la rata	7
2.3.1. Histología	8
2.3.2. Tejido conectivo intersticial	9
2.3.3. Productos de secreción	9
2.3.3.1. Lípidos	9
2.3.3.2. Porfirinas	9
2.3.3.3. Melatonina	10
2.4 Glándula Harderiana y esteroides gonadales	11
3. ANDRÓGENOS	
3.1. Estructura, síntesis, transporte y acción de los andrógenos	13

4. 5 α -REDUCTASA

4.1. Antecedentes	21
4.2. Propiedades bioquímicas de las isoenzimas 5 α -esteroide reductasas.	23
4.3. Propiedades genéticas de la 5 α -Reductasa	24

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Compuestos marcados radiactivamente	26
5.2. Esteroides radioinertes	27
5.3. Animales y obtención de la glándula de Harder	27
5.4. Preparación de los homogenados y los precipitados glandulares	
5.4.1. Homogenado	27
5.4.2. Precipitado	28
5.5. Medición de la actividad de la 5 α -esteroide reductasa	
5.5.1. Diferentes pHs	
5.5.1.1. Estudio de la actividad enzimática en homogenados totales	28
5.5.1.2. Estudio de la actividad enzimática en precipitados de la glándula	30
5.5.2. Con diferentes concentraciones de sustrato	31
5.5.3. Con diferentes concentraciones de cofactor	31
5.5.4. En animales intactos y castrados	32
5.6. Amplificación del ARNm de la 5 α -esteroide reductasa	
5.6.1. Extracción del ARN total	32
5.6.2. Síntesis de la primera hebra de ADNc	33
5.6.3. Amplificación del ADNc específico	33

5.7. Análisis por Northern blot	
5.7.1. Electroforesis de ARN	34
5.7.2. Transferencia del ARN	35
5.7.3. Marcaje de la sonda	35
5.7.4. Hibridación del ARN	36
6. RESULTADOS	37
7. DISCUSIÓN	49
8. CONCLUSIONES	54
• Referencias	
• Anexos	

NOTACIÓN

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AMPc	Monofosfato de adenosina ciclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
Ci	Curie
dATP	5'-trifosfato de 2'-desoxiadenosina
dCTP	5'-trifosfato de 2'-desoxicitosina
ddH ₂ O	Agua destilada desionizada
dGTP	5'-trifosfato de 2'-desoxiguanosina
DHT	Dihidrotestosterona
dpm	Desintegraciones por minuto
dTTP	5'-trifosfato de 2'-desoxitimidina
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
φX174 RF	Fago
GH	Glándula Harderiana
h	hora
HRE	Elementos de respuesta hormonal
hsp	Proteínas de choque térmico
Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
K _m	Constante de Michaelis
LH	Hormona luteinizante
MeOH	Metanol
mgP	miligramo de proteína
mmol	milimola

NADPH	Dinucleotido de nicotinamida-fosfato en su forma reducida
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pmol	picomola
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa reversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SHBG	Globulina transportadora de hormonas sexuales
SSI	Solución salina isotónica
T	Testosterona
TC	Tris citrato
TE	Tris EDTA
T-HI	Testosterona tritiada
Vmax	Velocidad máxima de la reacción

INTRODUCCIÓN

La glándula de Harder (GH) es una estructura tubuloalveolar de localización retro-orbital, que se encuentra presente en la mayoría de vertebrados terrestres. Las secreciones producidas por este órgano varían entre los diferentes grupos de vertebrados y sus células epiteliales poseen granulos o vacuolas cuyo contenido puede ser mucoso, seroso o lipídico. Los productos principales de la GH en los roedores son: lípidos, porfirinas e indolaminas. Se ha observado que la glándula de Harder tiene una innervación autónoma rica y se han identificado en ella varios neuropeptidos. Su control, tanto a nivel estructural como de síntesis, se efectúa a través de una variedad de compuestos hormonales, entre los que se incluyen la melatonina, hormonas gonadales, tiroideas y de la pituitaria.

En los roedores las hormonas gonadales más importantes que ejercen influencia sobre la glándula son los andrógenos y en varias especies estudiadas se ha descrito la presencia de receptores intracelulares para estas hormonas.

El principal andrógeno secretado por el testículo es la testosterona (T) y es la única hormona de naturaleza esteroidea que al llegar a su órgano blanco se metaboliza, para dar lugar a un compuesto de mayor potencia biológica la 5 α -dihidrotestosterona (DHT) Esta transformación es mediada por la 5 α -esteroido reductasa, la cual es una enzima de localización microsomal y que requiere NADPH como cofactor

Aunque T y DHT se unen a un mismo receptor, se ha observado que el complejo T-receptor tiene una velocidad de disociación mayor que la del complejo DHT-receptor Este último es más eficiente para activar procesos transcripcionales y puede regular genes específicos que no son activados por T Consecuentemente, la formación de DHT puede jugar dos papeles en la acción de los andrógenos uno, es la potenciación de la actividad andrógena y el otro es la regulación de algunos genes específicos

Ya que la formación de la DHT a nivel celular representa un proceso importante en la actividad de los andrógenos, en el presente trabajo se investigó la presencia y las características de la 5 α -esteroido reductasa en la glándula de Harder de la rata

HIPÓTESIS

La glándula Harderiana de la rata tiene la capacidad de metabolizar la testosterona a 5 α -dihidrotestosterona (metabolito de mayor potencia andrónica) dado que posee la actividad de la 5 α -esteroide reductasa

OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar la actividad de la enzima 5α -esteroide reductasa en la glándula Harderiana de la rata.

1.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Estudiar la actividad de la 5α -esteroide reductasa a diferentes pHs en la glándula Harderiana de la rata.
2. Estudiar la actividad de la 5α -esteroide reductasa de la glándula Harderiana de la rata con diferentes concentraciones de sustrato (testosterona) y establecer sus constantes cinéticas (K_m y V_{max})
3. Estudiar la actividad de la 5α -esteroide reductasa en presencia de diferentes concentraciones de NADPH.
4. Determinar la expresión del ARNm de la 5α -esteroide reductasa usando técnicas de hibridación molecular.

GLÁNDULA HARDERIANA

2.1 Introducción

La glándula Harderiana es una estructura tubuloalveolar que se localiza en la órbita ocular. Esta glándula se encuentra en todos los grupos de vertebrados terrestres: los anfibios anuros, reptiles, aves y mamíferos. Existen algunos mamíferos en los cuales no se ha observado, esto es, en murciélagos, vacas, caballos, carnívoros terrestres y primates superiores. Entre estos últimos está el hombre, aunque se ha reportado que se encuentra como una estructura embrionaria transitoria (Loewenthal, 1910) y hay algunos reportes en los cuales se informa de su presencia en adultos (Giacomini, 1887; Fleischer, 1907) sin embargo, estas observaciones en el hombre tanto en la etapa embrionaria como de adulto no han sido reconfirmadas a la fecha.

2.2 Glándula de Harder

La glándula Harderiana fue descrita inicialmente en 1694 por Johann Jacob Harder, quien la observó en el venado y la reportó como una "*glándula nova lacrymalis*".

Estudios más recientes sobre la glándula Harderiana la describen como una estructura unitaria, que se encuentra firmemente adherida a la parte media de la órbita ocular y su ducto normalmente abre sobre la superficie de la membrana nictitante. Esto distingue a la glándula Harderiana de las glándulas lagrimales y de la glándula de la membrana nictitante, que son típicamente racimos de tejido glandular dentro de la membrana nictitante. La glándula Harderiana es frecuentemente muy grande y en algunos casos más grande que el globo ocular.

Las funciones que se le atribuyen a esta glándula son muy diversas, entre estas se encuentran la de ser un sitio de respuesta inmune, ser una fuente de lípidos termorreguladores, ser una fuente de feromonas, ser un órgano fotoprotector y ser parte de un eje entre la retina y la pineal.

La glándula Harderiana ha sido estudiada ampliamente en roedores y se han establecido en este grupo patrones característicos de la biología de esta glándula. Así, se ha observado que tiene altas concentraciones de porfirinas, especialmente en los roedores hembras (Spike et al., 1992), que almacena una mezcla de lípidos poco usual en otros tejidos (Seyama et al., 1992), que sintetiza melatonina (Bubenick et al., 1976) y en algunas especies presenta un marcado dimorfismo sexual, tanto a nivel morfológico como bioquímico (Payne, 1994).

2.3 Glándula Harderiana de la rata.

La glándula Harderiana de la rata se localiza dentro de la órbita ocular. La glándula consiste de dos porciones un lóbulo pequeño que ocupa la porción superior de la cuenca del ojo y un lóbulo más grande y difuso que ocupa el piso de la cavidad óptica (Fig 1) Como no existe una diferencia histológica marcada entre estos dos lóbulos, se les puede considerar como una entidad única. La glándula Harderiana de la rata se caracteriza por producir porfirinas, las cuales se acumulan dentro del lumen glandular y se ha descrito que la glándula sintetiza además una porfirina tricarbóxilada ó Harderoporfirina característica de esta especie (Kennedy, 1970)

La función de la glándula no se ha esclarecido, pero se le considera como una fuente de lubricación y protección para la cornea y la nasofaringe

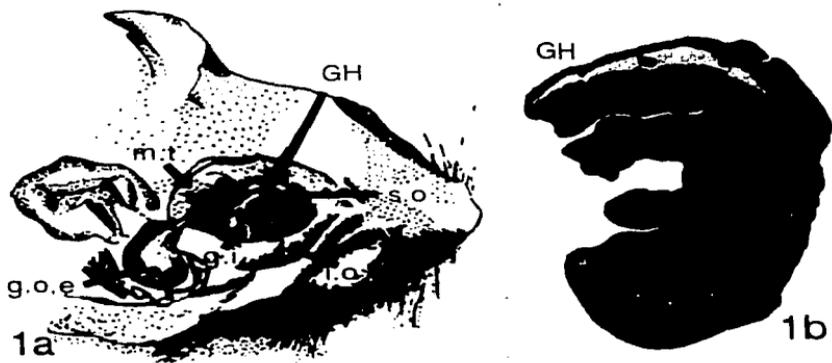


FIGURA. 1 a) Esquema de localización de la glándula de Harder de la rata (GH), glándula extraorbital externa (g.o.e), glándula intraorbital (g.i), musculo temporal (m.t), musculo superior oblicuo (s.o), musculo inferior oblicuo (i.o) 1b) Glándula Harderiana de la rata

2.3.1 Histología.

La morfología básica de la glándula Harderiana de rata es la de una típica glándula exócrina con alvéolos que desembocan a tubulos. Las porciones terminales de la glándula están compuestos por alvéolos separados por pequeñas cantidades de tejido conectivo localizado en el intersticio de la glándula, estos alvéolos están alineados con células acinares. Cada alvéolo contiene uno o dos tipos de células epiteliales además de células mioepiteliales.

Existen dos tipos de células secretoras (tipo A y B) que comprenden el epitelio glandular (Kanwar, 1960). Las células tipo A contienen grandes vacuolas en el citoplasma, mientras que el tipo B contiene vacuolas pequeñas inmersas en un abundante citoplasma intervacuolar de naturaleza basofílica.

El número y tamaño de vacuolas es mayor en las células tipo A y estas células son más numerosas que las células tipo B en la mayoría de las porciones terminales de la glándula.

Se ha observado la presencia de pigmento en el lumen glandular, pero no se ha observado dentro del epitelio glandular. Este pigmento consiste en su mayoría de porfirinas, debido a su fluorescencia roja (Derric y Turchini, 1924) y a sus características químicas (Kennedy, 1970).

A nivel ultraestructural, las células glandulares epiteliales son de forma piramidal y se extienden de la membrana basal al lumen de una unidad secretora individual (Kelenyi y Orbán, 1964). Su núcleo está localizado basalmente y frecuentemente se observa un solo nucleolo. En el epitelio glandular no se han encontrado figuras mitóticas ni células binucleadas y en el ápice de las células están presentes microvellocidades.

2.3.2 Tejido conectivo intersticial

El tejido conectivo intersticial de la glándula Harderiana contiene vasos sanguíneos pequeños, fibroblastos, melanocitos y células cebadas. Además se han encontrado células plasmáticas y eosinófilos en el tejido conectivo de la glándula (Brownschieldle y Niewenhuis, 1978).

2.3.3 Productos de secreción

2.3.3.1 Lípidos

La glándula Harderiana de rata secreta principalmente lípidos. Se han hecho estudios citológicos e histoquímicos que demuestran que las vacuolas dentro del citoplasma de las células secretoras contienen varios tipos de lípidos tales como grasas insaturadas, fosfolípidos, ésteres de colesterol y lípidos neutros o triglicéridos (Kanwar, 1960).

2.3.3.2 Porfirinas

Los primeros investigadores en descubrir la presencia de porfirinas, debido a la auto-fluorescencia de la glándula de Harder bajo luz ultravioleta, fueron Darrien y Turchini en 1924. Posteriormente fue verificada químicamente la presencia de porfirinas en este tejido por Strong en 1942. Kennedy en 1970 aisló y caracterizó una nueva porfirina en la glándula de Harder de rata, la cual fue nombrada Hardero-porfirina.

La glándula de Harder tiene todo el sistema enzimático para la formación de porfirinas, siendo la protoporfirina IX la que se encuentra en mayor porcentaje seguida por la coproporfirina III y la porfirina tricarbóxica o Harderporfirina (Tomio y Grinstein, 1968) La enzima limitante en la ruta biosintética de las porfirinas es la δ -aminolevulinato sintetasa (δ -ALA sintetasa), la cual es inhibida por la presencia de protohemina IX.

A la mayoría de las porfirinas se les incorporan iones metálicos que al unirse a proteínas específicas dan como producto hemoglobina y mioglobina, sin embargo en la glándula de Harder las porfirinas no tienen iones metálicos, esto se atribuye a que en este tejido no existen enzimas que incorporan los metales a las porfirinas, como la ferroquelatasa. En la glándula Harderiana se acumulan las porfirinas principalmente en el lumen alveolar y esta acumulación se puede explicar como una sobreproducción de porfirinas ya que este tejido no tiene protohemina IX (inhibidor de δ ALA sintetasa)

Se ha considerado que las porfirinas de la glándula Harderiana, sirven como fototransductores (Wetterberg et al. 1970)

2.3.3.3 Melatonina

La presencia de melatonina en la glándula Harderiana de rata fue indirectamente propuesta por Vlahakes y Wurtman en 1972, quienes investigaron las propiedades de la hidroxindol-o-metil transferasa (HIOMT) presente en este órgano. En 1976 Bubenick y cols lograron identificar directamente a la melatonina en este tejido.

Estudios inmunocitoquímicos han revelado la existencia de melatonina en las células acinares secretoras de la glándula Harderiana en ratas, hamster y ratones (Vivien-Roels et al., 1981) En otros estudios inmunocitoquímicos (Bubenik et al., 1976) se encontró que la cantidad de melatonina en la

glándula de Harder de rata era mas alta durante la fase de oscuridad que durante el dia, en 1985, Hoffman y cols obtuvieron resultados similares cuantificando la melatonina mediante radioinmunoensayos La función de la melatonina en la glándula Harderiana no se sabe con certeza, pero se ha observado que su concentración esta influenciada por fotoperiodos (Buzzell et al , 1990) además, las diferentes cantidades de melatonina presentes en la glándula están relacionadas con la concentración de porfirinas en este tejido (Joó y Kahan, 1975) y se han observado diferencias sexuales en el metabolismo de melatonina en el hamster sirio, esto se ha atribuido a las hormonas sexuales, especialmente a los androgenos (Menendez-Pelaez et al , 1989)

2.4 Glándula Harderiana y esteroides gonadales.

Se ha observado que las hormonas gonadales ejercen su acción en la glándula Harderiana, sobre todo en roedores. En ratas, la ovariectomia reduce significativamente el contenido de porfirinas en la glándula Harderiana y la administracion de estradiol más progesterona, ejerce un marcado efecto estimulador en la producción de porfirinas glandulares en ratas hembras castradas (Ulrich et al , 1974) Se ha observado tambien (Shirama et al , 1987) que la administración de testosterona disminuye los niveles de porfirinas en la glándula Harderiana, tanto en ratas machos, como en hembras, indicando que los andrógenos ejercen una regulación en la síntesis de porfirinas en este tejido

En el hámster, desde la década de los 50's (Christensen y Dam, 1953, Woolley y Worley, 1954, Paule et al , 1955) se observo que existia un marcado dimorfismo sexual en la glándula Harderiana y que la gonadectomia en los machos provocaba cambios en esta estructura

Los esteroides para ejercer su acción necesitan unirse a receptores intracelulares, formando un complejo hormona-receptor que actúa directamente a nivel de ADN estimulando o inhibiendo la transcripción de ciertos genes. La presencia de receptores para andrógenos en la glándula Harderiana de rata fue inicialmente sugerida por Gustafsson y Pousette (1975), quienes demostraron una retención específica de testosterona- ^{3}H en glándulas de ratas castradas, posteriormente Vilchis et al (1987) demostraron la presencia del receptor de andrógenos en la glándula Harderiana del hamster tanto en hembras como en machos y en algunas otras especies como rata, cobayo, conejo y ratón (Vilchis et al , 1992).

ANDRÓGENOS

Los andrógenos son moléculas de naturaleza lipídica, su estructura química está constituida por cuatro anillos fusionados, tres de los cuales contienen seis átomos de carbono y el otro restante sólo tiene cinco, además tiene dos metilos angulares, uno entre los anillos primero y segundo y el otro entre el tercero y el cuarto. De esta manera la molécula está constituida básicamente por 19 átomos de carbono y dependiendo de los sustituyentes que se encuentren en el primer anillo o en el último será la potencia biológica del andrógeno (Fig. 2)

La testosterona (T) es el andrógeno circulante biológicamente más activo y es producido en su mayoría por el testículo, aunque su formación por el ovario (Kase et al., 1961) y la suprarrenal (Binlingmaier et al., 1986) ha sido también documentada.

En las células de Leydig del intersticio testicular, la síntesis de T se efectúa y puede ocurrir *de novo*

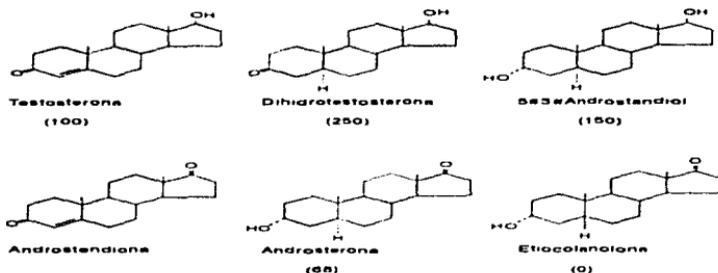


FIGURA 2 Estructura química de algunos andrógenos naturales biológicamente activos. El número entre paréntesis indica la potencia androgénica relativa que exhibe cada compuesto, comparada con la testosterona (100%).

a partir de acetil coenzima-A o directamente del colesterol almacenado en la célula, o bien, se adquiere de la sangre, como lipoproteína de baja densidad. En la rata la fuente principal de colesterol para la síntesis de testosterona se encuentra en las células de Leydig (Morris y Chaikoff, 1959). En la mitocondria el colesterol pierde su cadena lateral mediante la actividad de la enzima citocromo P-450 sec dando como producto la pregnenolona. Posteriormente, esta molécula será transformada a testosterona por una serie de enzimas microsomales (Wilson et al., 1993). El rompimiento de la cadena lateral del colesterol representa el paso limitante en la formación de testosterona en el testículo, este rompimiento está regulado por la hormona luteinizante (LH) de origen hipofisiario, la cual al unirse a sus receptores membranales específicos estimula la formación de AMPc. El aumento en la concentración de AMPc estimula la actividad de una proteína cinasa (Podesta et al., 1976) y la activación de la proteína cinasa de las células de Leydig estimula la formación de testosterona.

Una vez sintetizada, la testosterona es secretada a la sangre, en donde viaja mayoritariamente unida a proteínas plasmáticas. La albúmina y la globulina transportadora de hormonas sexuales o SHBG (por sus siglas en Inglés Sex Hormone Binding Globulin) son las principales proteínas acarreadoras de T. La SHBG exhibe alta afinidad por andrógenos y estrógenos, tiene un peso molecular de 95 kDa, contiene cerca de un 30% de carbohidratos y tiene un sitio de unión por molécula (Rosner, 1975). Cuando los andrógenos viajan unidos a la SHBG se encuentran menos disponibles, tanto para su metabolismo, como para su actividad, en comparación con los que viajan libremente (Vermeulen et al., 1969), por lo que se ha propuesto que la función de la SHBG es la de mantener en circulación a los esteroides por un mayor tiempo regulando así su actividad.

La testosterona sintetizada llega al hipotálamo y a la hipófisis, en donde regula la secreción de la LH a través de mecanismos de retroalimentación negativa (Pierce y Parsons, 1981).

Es ampliamente aceptado que, debido a sus características lipídicas, la T atraviesa la membrana celular por difusión pasiva (Yamamoto, 1985; Quigley et al., 1995), una vez dentro de la célula la testosterona es reducida en la posición cinco dando como producto la 5 α -dihidrotestosterona (DHT), esta reacción se efectúa mediante la acción de la 5 α -esteroide reductasa (Fig 3), enzima dependiente de NADPH (Frederiksen y Wilson, 1971).

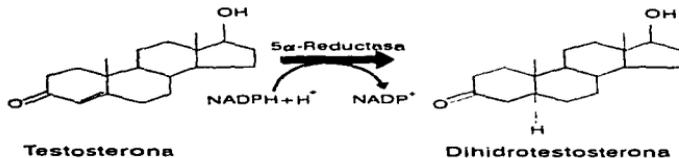


FIGURA 3 Reacción catalizada por la 5 α -esteroide reductasa.

Para ejercer su acción la T y DHT se unen a receptores de naturaleza proteica. La unión del andrógeno con su receptor induce un cambio conformacional en el receptor que facilita su dimerización, su transporte al núcleo y su interacción con el ADN y que culmina en la regulación de la transcripción de genes específicos (Fig. 4)

El receptor de andrógenos pertenece a una familia de proteínas nucleares, que funcionan a manera de factores de transcripción y cuya activación depende de la unión a su hormona específica (Fig 5). En esta familia se incluye a los receptores para ácido retinoico, vitamina D, hormonas tiroideas y hormonas esteroides (Evans, 1988, French et al, 1990, Mangelsdorf et al, 1995)

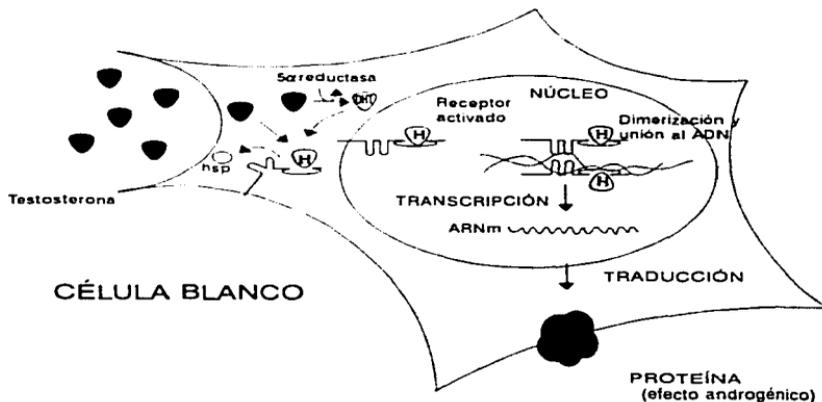


FIGURA 4. Representación esquemática del mecanismo de acción de andrógenos.

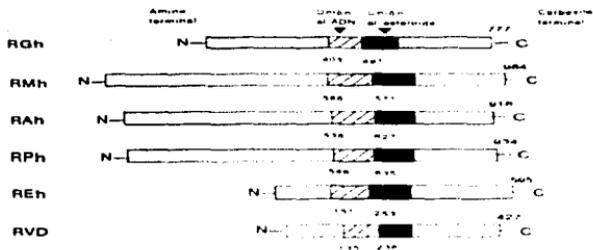


FIGURA 5. Representación esquemática de la homología en la estructura de los receptores de hormonas esteroides. Diagrama que muestra la región principal, el número de aminoácidos, el sitio de unión del ADN y el dominio de unión del esteroide en el receptor de esteroides humano (RGh) receptor de glucocorticoides humano, (RMh) receptor de mineralocorticoides humano, (RAh) receptor de androgenos humano, (RPh) receptor de progesterona humano, (REh) receptor de esteroides humano y (RVD) receptor de la vitamina D

La clonación del gen que codifica para el receptor de androgenos (Lubahn et al. 1988, Chang et al. 1988) ha permitido un mayor conocimiento en la estructura y función de esta proteína receptora. Así, se ha encontrado que el gen del receptor de androgenos, esta localizado en el cromosoma X (en el humano) muy cerca del centrómero, entre Xq11-Xq12 (Lubahn et al. 1988, Quigley et al. 1995) abarcando entre 75 y 90 Kilobases (Kb) del ADN genómico. La región que codifica para la proteína (aproximadamente 2757 pares de bases) esta dividida en 8 exones separados por 7 intrones (Lubahn et al. 1988). La proteína resultante tiene un peso molecular de 110-114 KDa y posee de 910 a 919 aminoácidos, sedimenta en gradientes lineales de sacarosa con un coeficiente de 8-9 S y de 4-5S en condiciones de alta fuerza iónica. Esta proteína tiene, al igual que los demás receptores para hormonas esteroides (Fig 6) tres dominios principales (Carson-Jurica et al. 1990)

- 1) El dominio amino-terminal, que es muy grande (ocupa mas de la mitad del receptor), tiene una secuencia de aminoácidos poco conservada y esta involucrado en la activación transcripcional.

- 2) El dominio de unión al ADN, que está altamente conservado, contiene varios residuos de cisteinas constituye los denominados dedos de zinc, que son hélices coordinadas mediante cuatro cisteinas y un átomo de zinc. Esta región interacciona directamente con elementos de respuesta hormonal (HRE) del ADN. El complejo andrógeno-receptor interacciona con elementos de respuesta a hormonas idénticos a los de otras hormonas esteroides, como son glucocorticoides y progesterona (Ham et al., 1988). Así mismo, el dominio de unión al ADN es indispensable para la activación transcripcional, la dimerización y el transporte nuclear (Simental, 1991). Se ha observado que alteraciones en esta última región, incluso mutaciones puntuales, hacen que el receptor pierda totalmente su actividad (Marcelli et al., 1991).

- 3) El dominio de unión al esteroide, se encuentra en la región carboxilo terminal; en esta región se efectúa la unión del receptor con el andrógeno, con características de alta afinidad y alta especificidad, en el dominio de unión al esteroide se encuentra probablemente el sitio de unión para proteínas inhibitoras como las proteínas de choque térmico (hsp) de 90 kDa (Smith y Toft., 1993).

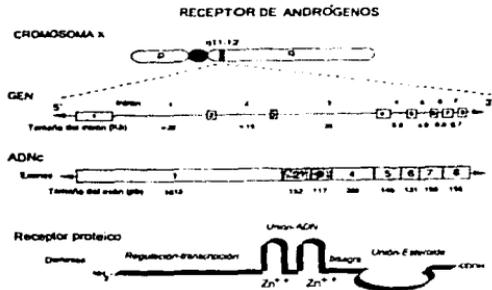


FIGURA 6 Organización estructural del gen y la proteína del receptor de androgenos

Los andrógenos determinan la diferenciación y el desarrollo de los órganos reproductores masculinos regulan además las características sexuales secundarias, la conducta sexual y la secreción en los órganos sexuales accesorios en el macho. Originalmente, todas estas funciones se atribuían exclusivamente a la testosterona y se postulaba que la 5α -dihidrotestosterona era un metabolito inactivo de la testosterona (Wilson et al., 1993)

La idea de que la 5α -dihidrotestosterona es un andrógeno potente con algunos papeles fisiológicos diferentes a los de la testosterona, se basó principalmente en dos observaciones. primero, los tejidos blanco para andrógenos tienen actividad de 5α -esteroide reductasa, enzima que reduce la T a DHT (Bruchoovsky y Wilson, 1968) y segundo, la 5α -dihidrotestosterona se retiene en el núcleo de tejidos blanco como la próstata (Andersson y Liao, 1968)

En la actualidad se sabe que tanto la T como la DHT tienen actividad androgénica y ejercen esta actividad mediante su unión a un mismo receptor (Wilber et al., 1983).

Aunque la testosterona y la DHT se unen a un mismo receptor, se ha observado que el complejo testosterona-receptor tiene una velocidad de disociación mayor que la del complejo DHT-receptor (Kaufman et al., 1983, Grino et al., 1990) y este último complejo activa más eficientemente un sistema de genes reporteros, en comparación con el complejo testosterona-receptor (Deslypere et al., 1993). De esta manera, la formación de DHT amplifica la señal androgénica. Por otra parte, se ha observado que el complejo DHT-receptor puede regular genes específicos que no responden a T, como son los implicados en la diferenciación de los genitales externos y de la próstata (Berman et al., 1995). Consecuentemente, la formación de DHT puede jugar dos papeles en la acción de andrógenos: uno, que es la amplificación general de la actividad androgénica y el otro, que es la regulación de algunos genes específicos.

5 α -REDUCTASA

La actividad de la enzima 5 α -reductasa fué descrita inicialmente por Schneider (1951,1952) en incubaciones de hígado de rata con desoxicorticosterona, en donde obtuvo los derivados 5 α -reducidos de este esteroide. Posteriormente, se demostró que la enzima se encuentra en la fracción microsomal hepática y que necesita como cofactor NADPH, además de que es capaz de reducir en la posición 5 α a la mayoría de esteroides naturales (Tomkins , 1957, McGuire et al ,1960)

A partir de entonces, se estudió la reducción en 5 α en esteroides y se observó que esta reacción puede tener dos diferentes papeles:

- 1) De contribuir al catabolismo y excreción de esteroides, ya que se ha observado que cuando un esteroide se reduce en la posición 5 α , la cetona que se encuentra en el carbono 3 del esteroide es más susceptible de reducirse formando derivados 3 α ó 3 β hidroxilados, estos grupos a su vez se

sulfatan o glucuroconjugan formando esteroides que tendrán una mayor solubilidad en agua, lo que facilita su excreción por la orina

- 2) El de formar un compuesto de gran actividad androgénica, la DHT. Esta reacción ocurre a nivel de órganos blanco en donde la DHT ejercerá directamente su acción via un receptor intracelular específico.

La importancia de esta actividad se comprobó al encontrarse que existen individuos con mutaciones en el gen (tipo 2) que codifica para la 5α -reductasa lo que no permite un funcionamiento adecuado de la enzima a nivel de órganos blanco. Estos individuos (con cariotipo 46 XY) nacen con fenotipo femenino, hipospadias perineoescrotales, pseudovagina de tamaño variable y testículos criptorquídicos, aunque, bien desarrollados e histológicamente diferenciados. Además, poseen epididimo, conducto deferente y vesícula seminal, pero no existen derivados ni remanentes mullerianos y la próstata no se desarrolla (Wilson et al., 1993).

El estudio de la 5α -reductasa se dificultó debido a que es una enzima membranal y su solubilización es difícil de lograr, el uso de detergentes (Houston et al., 1985) ha permitido obtener a la enzima soluble, pero se ha visto que la actividad enzimática disminuye con estos procedimientos. Con el advenimiento de nuevas técnicas de biología molecular ha sido posible el estudio de la 5α -reductasa a partir del gen que codifica para esta enzima. En 1989, Russell y cols lograron obtener el ADN complementario (ADNc) que codifica para una 5α -reductasa a partir de hígado de rata (Andersson et al., 1989). El ADNc de la 5α -reductasa de rata se usó para obtener el ADNc de la enzima de humano mediante hibridación en una biblioteca genómica de próstata humana (Andersson y Russell, 1990).

Cuando se comparo la actividad de la 5α -reductasa obtenida del ADNc con la actividad de la enzima estudiada directamente en próstata, se hicieron algunas observaciones 1) la enzima obtenida a partir del ADNc exhibía un pH óptimo alcalino, mientras que la enzima nativa tenía un pH óptimo ácido, 2) la enzima recombinante era inhibida muy difícilmente por finasteride, compuesto que se había probando que tenía una fuerte acción sobre la 5α -reductasa de prostata

Estas observaciones sugirieron fuertemente que existía otro gen para la 5α -reductasa humana, por lo que se buscó y se aisló un gen diferente al primer ADNc (Andersson et al . 1991) cuyo producto tenía una mayor similitud con la estudiada directamente en prostata humana

De esta manera se lograron clonar dos genes de 5α -esteroide reductasa, tanto en humano como en rata (Normington y Russell, 1992) y se les nombro 5α -reductasa 1 y 5α -reductasa 2 segun el orden cronológico de su aislamiento (Andersson et al . 1989, Andersson arid Russell, 1990, Andersson et al , 1991, Normington y Russell, 1992)

Propiedades bioquímicas de las isoenzimas 5α -esteroide reductasas.

-Son proteínas hidrofóbicas compuestas de 254-259 aminoácidos y con un peso molecular de 28000 a 29000 Da Las proteínas no tienen secuencias consensuales para glicosilación (Wilson et al . 1993)

La comparación de las secuencias de aminoácidos, deducidas a partir de los ADNs complementarios, ha mostrado la existencia de un alto grado de homología entre ambas proteínas.

La identidad de secuencia entre la 5 α -reductasa 1 de la rata y el humano es de aproximadamente 60% y de 70% entre las isoenzimas tipo 2 (Normington y Russell, 1992)

El pH óptimo para la 5 α -reductasa tipo 1 se encuentra en un rango alcalino de 7 a 8.5 y la 5 α -reductasa tipo 2 tiene un pH óptimo más estrecho, alrededor de 5 (Andersson et al., 1989, Normington y Russell, 1992).

La diferencia en los pHs óptimos permite diferenciar la actividad específica de una y otra enzima en los diferentes tejidos en los cuales se les ha estudiado

Los genes de las isoenzimas 5 α -reductasas se localizan en diferentes cromosomas, tanto en el humano como en la rata. La isoenzima tipo 1 es codificada por el gen que se localiza en el brazo corto del cromosoma 5 en la banda p15, la cual se encuentra distante al centrómero y se le denomina SRD5A1. Este gen está dividido en 5 exones separados por 4 intrones y codifica para una proteína de peso molecular de 29 kDa compuesta por 259 aminoácidos

Mientras que el gen de la isoenzima tipo 2 (SRDA2) se localiza en la banda 23 del cromosoma 2 y al igual que el gen de la isoenzima tipo 1, está dividido en 5 exones separados por 4 intrones y da como resultado una proteína de 28 kDa que tiene de 254-256 aminoácidos

La similitud en la secuencia de nucleótidos que conforman los exones de las isoenzimas tipo 1 y 2 son de 43.8% para el exón 1, de 49.7% para el exón 2, de 56.9% para el exón 3, 64.2% para el exón 4 y 64.1% para el exón 5 (Jenkins et al., 1991; Wilson et al., 1991; Labrie et al., 1992). En cuanto a la similitud entre las isoenzimas 5 α -reductasas humanas y de rata a nivel de aminoácidos, se ha observado que las tipo 2 están más estrechamente relacionadas (77% de identidad en la secuencia) que las tipo 1 (<50%).

La expresión de los genes para las isoenzimas tipo 1 y tipo 2 se estudiaron en tejidos de rata y se observó que en los tejidos sensibles a andrógenos, como testículo, vasos deferentes y epididimo, el ARNm tipo 2 predominaba, mientras que en tejidos que no son órganos blancos para andrógenos como estómago, bazo, músculo, cerebro, suprarrenales y ovario, el ARNm tipo 1 era el predominante. Este hallazgo apoya la hipótesis de que la enzima 5 α -reductasa tipo 1 está involucrada en los procesos de catabolismo de esteroides, mientras que la 5 α -reductasa tipo 2 está relacionada con el anabolismo y la actividad androgénica (Normington y Russell, 1992).

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio de la actividad de la 5α -esteroide reductasa en glándula de Harder, se realizó a partir de homogenados y precipitados de tejido glandular de ratas Wistar.

Para el análisis de la actividad de la enzima se manejaron las siguientes condiciones:

- Diferentes pH
- Diferentes concentraciones de sustrato (Testosterona)
- La presencia de cofactor (NADPH)
- El manejo de animales intactos y castrados

5.1 Compuestos marcados radiactivamente

Testosterona [$1,2,6,7-^3\text{H}$] con actividad específica de 90 Ci/mmol. La pureza de la testosterona [^3H] fue verificada por cromatografía de capa fina, empleando cloroformo-metanol (98:2.5) como fase móvil.

5.2 Esteroides radioinertes

Testosterona (17 β -Hidroxi-4-androsteno-3-ona, T), 5 α -Dihidrotestosterona (17 β -Hidroxi-5 α -androstano-3-ona, DHT), Δ^4 Androstendiona (4-Androsteno-3,17-diona, Δ^4 A), 5 α -Androstendiona (5 α -Androstano-3,17-diona, 5 α A), 3 β ,5 α -Androstandiol (5 α -Androstano-3 β ,17 β -diol, 3 β ,5 α -Adiol) y 3 α ,5 α -Androstandiol (5 α -Androstano-3 α -17 β -diol, 3 α ,5 α -Adiol) se purificaron mediante recristalizaciones sucesivas (3 veces) en metanol y se verificó su punto de fusión

5.3 Animales y obtención de la glándula de Harder

Se utilizaron ratas Wistar machos y hembras con un peso entre 250-300 g y se mantuvieron bajo condiciones de 14 horas/luz 10 horas/obscuridad con libre acceso a alimento y agua. Cuando fue necesario se gonadectomizaron bajo anestesia con éter. Para la obtención de la glándula de Harder los animales se decapitaron y el tejido se extrajo rápidamente, se depositó en solución salina isotónica (NaCl 0.15 M) fría, se limpió, se secó sobre papel filtro y se pesó.

5.4 Preparación de los homogenados y los precipitados glandulares

5.4.1 Homogenado

1. El tejido glandular fue homogeneizado en 1 ml de solución SSI con Polytron (Brinkman Instruments) durante 20 segundos.
2. El homogenado obtenido se llevó a un volumen final adecuado con Tris-citrato (TC: Tris-HCl 100 mM, citrato de sodio 100 mM) para tener una concentración de 100 mg de tejido/ml de TC.
3. Se tomaron alícuotas de 10 μ l por triplicado para la medición de proteínas (Método de Bradford 1976. cfr. anexo 1).

4. Se depositó 1 ml del homogenado en los tubos donde se efectuó la reacción.

5.4.2 Precipitado

1. El tejido se homogeneizó con Polytron en 2 ml de solución salina isotónica (SSI).
2. El homogenado se llevó al volumen correspondiente para tener una concentración de 100 mg de tejido/ml de SSI y se filtró con gasa
3. Del homogenado filtrado se tomaron alícuotas de 1 ml, las cuales fueron centrifugadas a 30 000 rpm (Rotor Beckman, SW 50 1), 30 minutos a 4°C
4. El sobrenadante se desechó y el precipitado obtenido fue resuspendido en 1 ml de solución TC.
5. Del precipitado resuspendido en solución TC se tomaron alícuotas de 500 µl que se depositaron en los tubos en donde se efectuó la reacción
6. Se incubaron a 37°C durante 30 minutos con agitación constante
7. Del mismo precipitado se tomaron alícuotas de 10 µl por triplicado para la cuantificación de proteínas

5.5.1 Actividad de la 5 α -esteroide reductasa a diferentes pHs

El pH óptimo para la actividad de la 5 α -reductasa fue determinado en homogenados del tejido glandular y en precipitados, tanto de ratas hembras como de machos

5.5.1.1 Estudio de la actividad enzimática en homogenados totales.

1. El homogenado se obtuvo como se indicó anteriormente y se agregó 1 ml a cada tubo, los cuales contenían el sustrato (T[³H]= 1 000 000 dpm + T radioinerte 8 nmol) disuelto en 1 ml de TC a los diferentes pHs probados (4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0). El volumen final de incubación fue de 2 ml.

2. Los tubos se agitaron y se incubaron a 37°C durante 30 minutos con agitación constante (Incubador metabólico Dubnoff)
3. Terminada la incubación, se adicionaron a cada tubo 3 ml de acetato de etilo saturado con agua destilada y desionizada (ddH₂O).
4. Los tubos se agitaron durante un minuto y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C obteniéndose dos fases la orgánica y la acuosa. La fase orgánica se separó y se depositó en tubos limpios.
5. El paso anterior se repitió dos veces más con el residuo acuoso.
6. Las fases orgánicas reunidas de las 3 extracciones se evaporaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno.
7. Las muestras se resuspendieron en 1 ml de metanol acuoso (MeOH:H₂O, 90:10) saturado con hexano y se agregaron 2 ml de hexano saturado con MeOH acuoso.
8. Los tubos se agitaron durante 60 segundos y se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos a 4°C la fase orgánica (hexano) se separó y se depositó en otros tubos.
9. El paso anterior se repitió 2 veces más adicionando cada vez 2 ml de hexano y se reunieron los tres volúmenes de hexano los cuales se desecharon.
10. La fase acuosa obtenida se evaporó a sequedad y se resolvió con 1 ml de metanol.
11. Se tomaron alícuotas de 10 µl por duplicado para medir radiactividad.
12. Se tomaron alícuotas de cada muestra (100,000 dpm) y se les agregaron estándares radioinertes (T, DHT, Δ⁴A, 5α,3β Adiol y 5αA), 3 µg de cada uno disueltos en metanol.
13. Las muestras se aplicaron en placas de aluminio cubiertas con gel de sílice (Merk, Darmstadt, West Germany) y se corrieron al frente en un sistema cloroformo metanol (98:2:5).
14. La misma placa se corrió al frente en un segundo sistema compuesto por cloroformo éter (9:1).
15. Para la detección de los esteroides la placa se rocía con p-anisaldehído (1.0 ml de p-anisaldehído, 2.0 ml de ácido sulfúrico y 100 ml de ácido acético glacial) y se colocó en un horno a 80°C hasta la aparición de manchas (5-10 minutos).
16. Cada mancha fue marcada con lápiz.

17. Cada carril se cortó en 12 fragmentos, permitiendo que las manchas reveladas quedaran en un solo trozo. Cada fragmento se colocó en frascos de 20 ml
18. A cada frasco se le adicionó 1 ml de etanol absoluto y se agitó durante 30 segundos, posteriormente se adicionaron 5 ml de líquido de centelleo (40 ml de liquifluor "Dupont" en 1000 ml de tolueno) y se agitó nuevamente
19. Los frascos se dejaron reposar toda la noche y posteriormente se les midió la radiactividad en un contador de centelleo líquido (Packard Tri-Carb 1900 TR). La eficiencia del conteo fue de 62% y el apagamiento (quenching) fue corregido en todas las muestras por medio de un estándar externo

5.5.1.2 Estudio de la actividad enzimática en precipitados de las glándulas Harderianas.

1. Los precipitados de glándulas Harderianas, tanto de ratas hembras, como de machos, se obtuvieron como se indicó anteriormente (cfr 5.4.2)
2. Para la incubación se tomaron 0.5 ml de precipitado resuspendido en solución TC (a pHs de 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0) y se depositaron en tubos que contenían el sustrato (T [³H] = 500 000 dpm + T radioinerte 4 nmol) y el cofactor NADPH (500 nmol) disueltos en 0.5 ml de solución TC a los diferentes pHs indicados. El volumen total de incubación fue de 1 ml
3. Se incubaron a 37°C durante 30 min con agitación constante
4. Al terminar la incubación se hicieron 3 extracciones con acetato de etilo saturado con agua.
5. La fase orgánica se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se redisolvió en 1 ml de metanol.
6. Los pasos siguiente fueron similares a los descritos desde el paso 11 (cfr: 5.5.1) en la metodología.

5.5.2 Actividad de la 5 α -esteroide reductasa con diferentes concentraciones de sustrato (Testosterona)

Para efectuar las mediciones en la actividad de la 5 α -reductasa se usaron homogenados de la glándula Harderiana de ratas hembras y machos. Las incubaciones se efectuaron en un volumen total de 2 ml, los cuales incluían 1 ml de homogenado + 1 ml de solución TC a cada pH de 5.5 ó 6.5, en el cual iba disuelto el sustrato (T [3 H]- 1000 000 dpm+ T radioinerte a diferentes concentraciones: 0.3, 0.6, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 y 10.0 μ mol/l). La incubación se realizó a 37°C durante 30 min. con agitación constante.

La metodología utilizada para extraer y cuantificar los productos de reacción fue idéntica a la usada con anterioridad (cfr. 5.5.1).

Los resultados se expresaron en nmol de DHT formada/mgP/h y se analizaron por el método de Eadie-Hofstee (Zivin y Waud, 1982).

5.5.3 Actividad de la 5 α -reductasa con diferentes concentraciones de cofactor (NADPH)

Se utilizaron glándulas Harderianas de ratas hembras y machos de las cuales se obtuvieron sus precipitados (cfr. 5.4.2). Se efectuó la reacción en un volumen final de 1 ml, el cual contenía 0.5 ml del precipitado y 0.5 ml de solución TC (pH=6.5) en la cual iba disuelto el sustrato (T [3 H]=500.000 dpm + T radioinerte 4nmol) y el cofactor (NADPH) a diferentes concentraciones (0, 50, 100, 500 y 1000 nmol). La incubación se hizo a 37°C durante 30 min. con agitación constante. Posteriormente, se extrajeron los productos de la reacción con acetato de etilo, se cromatografiaron y se midió la radiactividad como anteriormente se describió.

5.5.4 Actividad de la 5 α -reductasa en animales intactos y castrados

Para medir la actividad de la 5 α -reductasa se utilizaron homogenados totales de glándulas Harderianas de ratas intactas y castradas. El volumen total de incubación fue de 2ml, el cual incluía 1 ml del homogenado de la glándula Harderiana de ratas hembras o de ratas machos más 1 ml de la solución TC a pH de 6.5, el cual contenía el sustrato (T [³H]- 1000 000 dpm + T radioinerte 8nmol). La mezcla se incubó a 37°C durante 30 min con agitación constante. La metodología empleada para la extracción y cuantificación de los productos es la misma a la anteriormente empleada (5.5.1). Los resultados obtenidos fueron expresados en nmol de DHT formada/mgP/h.

5.6 Amplificación del ARN total de la 5 α -reductasa 1 y 2 en glándula de Harder de rata.

5.6.1 Extracción del ARN total

Se extrajo el ARN total de la glándula de Harder de rata macho y hembra, así como de hígado, epidídimo y próstata. La extracción se efectuó utilizando Trizol (GIBCO-BRL, Grand Island, N Y.).

Los tejidos se homogeneizaron con Trizol (1 ml por cada 50-100 mg de tejido), en Polytron, durante 10 a 15 segundos dos veces. Los homogenados se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se les adicionaron 0.2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol utilizado, se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 8600 rpm (Rotor Beckman JA-20) durante 15 min a 4°C. La fase acuosa se separó, se depositó en un tubo estéril, se mezcló con 0.5 ml de isopropanol por cada ml de solución acuosa obtenida, se incubó 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 8600 rpm 15 min. a 4°C, finalmente, el botón se resuspendió en agua ultrapura estéril.

Se midió la concentración del ARN y se verificó su pureza mediante espectrofotometría. Una unidad de absorción a 260 nm equivale a una concentración de 40 μ g de ARN por ml y la relación de absorción 260/280 deberá ser superior a 1.7, siendo 2.0 el óptimo.

5.6.2 Síntesis de la primera hebra de ADN complementario (ADNc)

Se utilizó el kit 3'RACE de GIBCO-BRL y se siguieron sus especificaciones

1. Se tomaron alícuotas de 1µg de ARN de cada tejido y se llevaron a 11µl con agua estéril y tratada con dietilpírocarbonato (DEPC)
2. Se agregó 1 µl de solución AP (Primer adaptador, 10µM) Se mezcló y se calentó a 70°C durante 10 min . posteriormente se colocó en hielo por 5 min y se centrifugó
3. Se adicionaron 2µl de buffer 10X PCR (Tris-HCl 200 mM, pH=8.4, KCl 500mM), 2µl de MgCl₂ 25 mM, 1µl de mezcla de dNTPs 10mM (dATP, dGTP, dTTP, dCTP, 10 mM cada uno) y 2µl de ditiotritol 0.1M se mezcló y se centrifugó
4. Se calentó a 42°C por 5 min
5. Se agregó 1µl de enzima Super Script II RT, se incubó a 42°C por 50 min y se terminó la reacción incubando a 70°C durante 15 min
6. Se enfrió en hielo, se centrifugó, se adicionó 1µl de RNasa H, se mezcló y se incubó a 37°C durante 20 min los productos de la reacción anterior se pueden guardar a -20°C.

5.6.3 Amplificación del ADNc específico

La amplificación del ADNc específico se hizo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés "Polymerase chain reaction") con el kit 3'RACE de GIBCO-BRL. Se usaron oligonucleótidos tanto para la 5α-reductasa 1 como para la 5α-reductasa tipo 2 (tabla 1). Se usó un termociclador Perkin-Elmer 480 y las reacciones se desnaturalizaron a 94°C durante 2 min, posteriormente se corrieron 30 ciclos para la amplificación a 94°C por 1 min, el alineamiento a 56°C durante 1 min y la extensión a 72°C por 1 min. El producto de la reacción (10µl) se corrió en geles de agarosa (1%) con bromuro de etidio. Se usó como marcador de peso molecular DNA φX174 RF digerido con Hae III de GIBCO-BRL.

TABLA 1

ENZIMA	OLIGONUCLEÓTIDO (5'→3')	EXÓN
5 α -reductasa tipo 1	TGG AGT TGG ATG AGC TGT GCC T	inicio de exón 1
5 α -reductasa tipo 1	CTT GGG GTA ATC TTC AAA CTT CTC	final de exón 5
5 α -reductasa tipo 2	ATG CAG ATT GTC TGC CAT CAG	inicio de exón 1
5 α -reductasa tipo 2	AAA GGC TTG CAT CCC CAG GAA AC	final de exón 5

5.7 Análisis por Northern Blot

La expresión de la 5 α -esteroide reductasa se estudio por medio de la hibridación del ARNm (obtenido del tejido glandular) con sondas específicas. Se obtuvo el ARN total (con Trizol, como anteriormente se describió) de la glándula de Harder de ratas Wistar machos y hembras intactos o castrados, así como de epididimo y de hígado.

5.7.1 Electroforesis del ARN

Muestras de 15 a 20 μ g de ARN se desnaturalizaron mediante la adición de formaldehído y formamida, a concentraciones de 6 y 40 % respectivamente, en buffer MOPS (MOPS 20 mmol/l, pH=8.0, acetato de sodio 5mmol/l, EDTA 1 mmol/l) y calentando a 70°C durante 15 min. Las muestras de ARN desnaturalizadas, se separaron en geles de agarosa (1%) conteniendo formaldehído (40%) y MOPS. La electroforesis se efectuó en buffer MOPS a 40V durante 4-6 horas a temperatura ambiente.

5.7.2 Transferencia a filtros de Nitrocelulosa

- 1 Se preparó una cámara de electroforesis con un soporte más ancho y largo que el gel y se colocó una pieza de papel Whatman 3MM sobre el soporte, se llenó la cámara con una solución SSC 10X a la altura del soporte y se humedeció el papel 3MM completamente.
- 2 Se cortó una membrana de nitrocelulosa del tamaño del gel y se sumergió en la solución de SSC 10X por 5 min
- 3 Se puso el gel sobre el soporte en forma invertida, centrándose sobre el papel 3MM y verificando que no existan burbujas entre el papel y el gel
- 4 Se colocó la membrana de nitrocelulosa humedecida sobre el gel, una vez que es colocada la membrana este ya no se debe mover, se deben quitar las posibles burbujas
- 5 Se humedecieron 2 piezas de papel 3MM (en una solución de SSC 2X) del mismo tamaño del gel y se colocó sobre el filtro humedecido. El sistema se cubre con papel absorbente y un soporte de plástico con dos pesos de 50 g sobre todo este sistema de transferencia
- 6 Se dejó transfiriendo durante 18 horas, al cabo de las cuales se quitaron las toallas y el papel 3MM; el gel junto con la membrana de nitrocelulosa se colocaron sobre un papel filtro seco y se marcaron los pozos del gel sobre el filtro con un lápiz. El gel se desechó al final de este procedimiento
- 7 La membrana se lavó en SSC 6X durante 5 min se dejó escurrir y luego se fijó el ARNm por entrecruzamiento con luz ultravioleta por 30 segundos

5.7.3 Marcaje de la sonda (Método "Random Primer", iniciadores al azar)

Se utilizaron como sondas los ADNc de la 5 α -reductasa 1 y de la 5 α -reductasa 2 de rata. Se usó un kit de Random Primer (GIBCO-BRL, Grand Island N Y) y se siguieron sus especificaciones.

- 1 Se tomaron alícuotas de ADNc (~25ng) y se llevaron a un volumen de 23 μ l con H₂O estéril, se calentaron a 95°C por 5 min y se colocaron en hielo durante 5 min.

- 2 Se adicionaron 15µl de buffer 10X (HEPES 0.67M, Tris-HCl 0.17mM, 2-mercaptoetanol 33 mM, BSA 1.33 mg/ml, hexámeros 18 D O 260 unidades/ml, pH 6.8)
- 3 Se agregaron 2µl de dATP, 2µl dGTP y 2µl dTTP (dNTPs 0.5mM, en Tris-HCl 3 mM, pH=7.0 y EDTA Na₂ 0.2mM) y 5µl de dCTP[α³²P] (ac= 3000 Ci/mmol)
- 4 Al final se adiciono 1µl del fragmento Klenow de la ADN polimerasa de T4 (3 unidades/µl) y la reacción se incubo a temperatura ambiente durante 2-3 horas, al final se le adicionaron 5µl de stop buffer (EDTA Na₂ 0.2M pH 7.5) y 100µl de TE.

Las sondas marcadas se separaron en columnas de sephadex G-50, se desnaturalizaron durante 5 min (en un baño de agua en ebullicion) y se enfriaron en hielo

5.7.4 Hibridación del ARN

- 1 Se colocó la membrana en una bolsa de plástico con solución de prehibridar [Rapid-hyb buffer (Amersham LIFE SCIENCE)] en un volumen de 0.125 ml por cm² de membrana y se incubó a 65°C durante 2-4 horas con agitación continua
- 2 Se tomó un alícuota de 1 ml de la solución de prehibridar y se mezcló la sonda marcada y se adicionó a la bolsa que contenía la membrana. Se eliminaron las burbujas de la bolsa y se volvió a sellar
- 3 Se hibridó durante 18 horas a 65°C en un incubador con agitación constante.
- 4 Se lavó la membrana con una solución de SSC 2X + SDS 0.1% a temperatura ambiente durante 15 minutos
- 5 Se realizó un segundo lavado con la solución de SSC 1X + SDS 0.1% a 65°C durante 15 minutos
- 6 Se midió la radiactividad con ayuda de un contador geiger.

Se dejó secar la membrana sobre papel filtro, se colocó en un cassette con pantallas intensificadoras, se expuso a una placa autoradiográfica (X OMAT-RA-Kodak) y se reveló después de una exposición de 20 horas a 70°C.

RESULTADOS

Los estudios iniciales de este trabajo se enfocaron a demostrar la existencia de la 5α -esteroide reductasa en la glándula Harderiana de la rata, una vez observada la presencia de esta enzima debido a la transformación de Testosterona-[3 H] a 5α -DHT-[3 H], se procedió a determinar las características bioquímicas de esta enzima en la glándula Harderiana de la rata

Actividad de la 5α -esteroide reductasa a diferentes pHs.

Para conocer el pH óptimo de actividad de la 5α -esteroide reductasa en la glándula Harderiana de la rata, se hicieron estudios utilizando tanto homogenados totales del tejido, como precipitados del homogenado centrifugando a 105 000Xg, los cuales se incubaron con el sustrato (T- 3 H) a pHs desde 4.5 a 9.0. Como se observa en la figura 7 el pH óptimo en la glándula Harderiana de la rata macho fue de 7.0, mientras que para la hembra fue de 6.5. En los homogenados totales (fig. 7) se encontraron actividades máximas de 201.1 pmol/mgP/h para los machos y de 192.82 pmol/mgP/h para las hembras. En los precipitados (fig. 8) el pH óptimo para los machos fue de 7.0 y el de las hembras se encuentra en

el intervalo de 6.5-7.0 La actividad específica de la enzima en precipitados se incremento considerablemente, observandose para el macho una actividad máxima de 2114.4 pmol/mgP/h y para la hembra de 3019.05 pmol/mgP/h

TABLA 2. Actividad de la 5 α -esterode reductasa a pH=6.5
ACTIVIDAD MOSTRADA A pH=6.5

En homogenizados de glándula		En precipitados de la glándula	
Machos	Hembras	Machos	Hembras
201.1 pmol/mgP/h	192.82 pmol/mgP/h	2114.4 pmol/mgP/h	3019.05 pmol/mgP/h

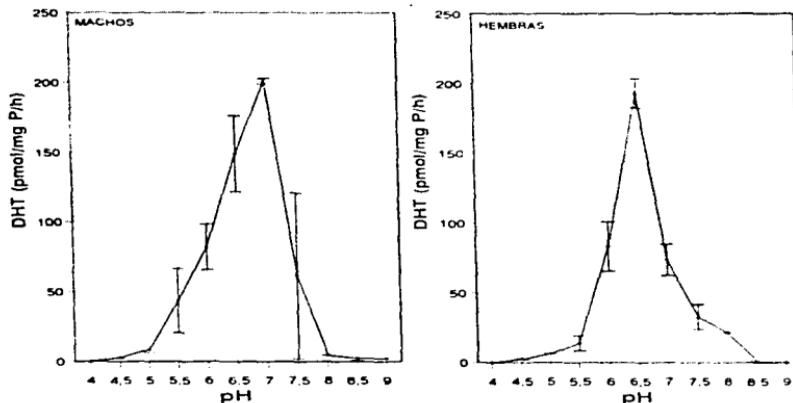


FIGURA 7 Actividad de la 5 α -esterode reductasa en glándula Harderiana de rata a diferentes pHs. Homogenizados (100 mg tejido/ml) de glándula Harderiana de ratas machos (n=10) o hembras (n=10) se incubaron con testosterona- 3 H] (10^6 dpm, 4μ mol/L) a diferentes pHs (4.5 a 9.0) y a 37°C durante 30 min. en un volumen de incubación de 2 ml (buffer Tris-HCl 100 mM, citrato de sodio 100 mM). Los valores graficados son el promedio de 3 experimentos, las barras indican la magnitud de \pm una desviación estandar

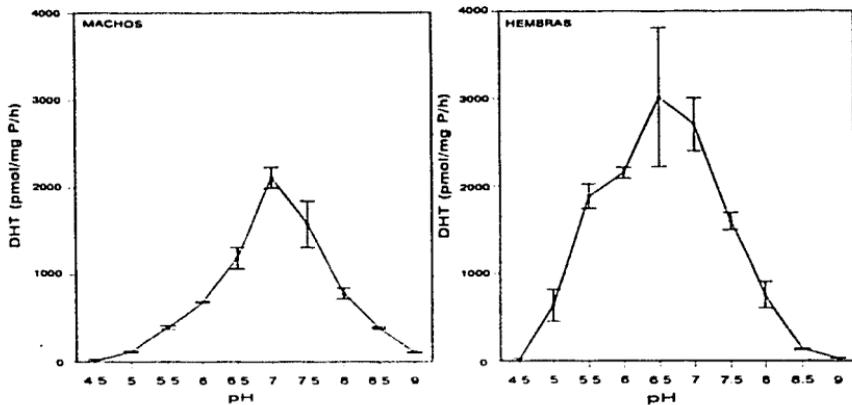


FIGURA 8. Actividad de la 5α -esteroide reductasa en precipitados de glándula Harderiana de rata a diferentes pH's. Homogenizados (100 mg tejido/ml) de glándula Harderiana de ratas hembras ($n=10$) o machos ($n=10$) se centrifugaron 30 min. a 30 000 rpm, el precipitado se resuspendió en solución Tris-citratos (Tris-HCl 100 mM, citrato de sodio 100 mM) a diferentes pH's (4.5 a 9.0) y se incubaron con testosterona- 3H (500 000 dpm, $4\mu\text{mol/L}$) a 37°C durante 30 min. en un volumen de incubación de 1 ml. En las gráficas se muestra el promedio de 3 experimentos, las barras indican la magnitud de \pm una desviación estándar.

Actividad de la 5α -esteroide reductasa con diferentes concentraciones del sustrato (Testosterona)

Para estudiar la actividad de la 5α -esteroide reductasa en la glándula de Harder de la rata se usaron homogenizados del tejido, los cuales fueron incubados con concentraciones crecientes de

Testosterona Tanto en machos como en hembras, la actividad enzimática se incrementó al aumentar la concentración del sustrato hasta alcanzar la saturación a una concentración de sustrato entre 7 y 8 μM . En la figura 9 se observa la actividad de la 5 α -reductasa determinada en homogenizados de glándula Harderiana de ratas macho, al graficarse por el método de Lineweaver-Burk se estimó una K_M de 3.32 μM y una V_{max} de 0.803 nmol/mgP/h. Para la hembra (Fig. 10) se obtuvo una K_M de 3.65 μM y una V_{max} de 1.023 nmol/mgP/h.

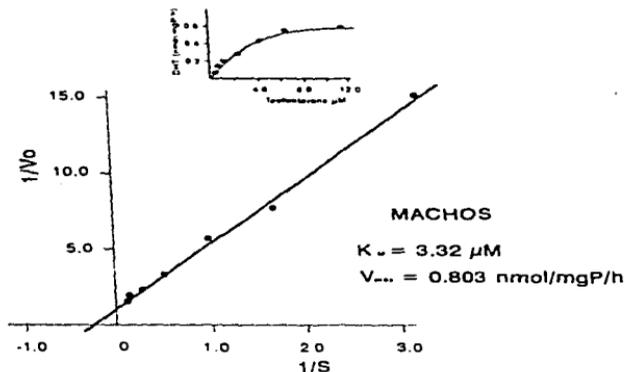


FIGURA 9. Formación de DIT en homogenizados de glándula Harderiana de ratas macho (n=10) variando las concentraciones de sustrato (Testosterona). Homogenizados de glándula de Harder de ratas macho se incubaron con concentraciones crecientes de T- ^3H (0.3, 0.6, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 10.0 μM) a 37°C durante 30 min, el volumen final de incubación fue de 2 ml a un pH de 6.5 (buffer, Tris-citatos). Derecha curva de saturación. Izquierda gráfica de Lineweaver-Burk de donde se calcularon la K_M y V_{max} indicadas. Gráfica representativa de 2 experimentos efectuados por separado.

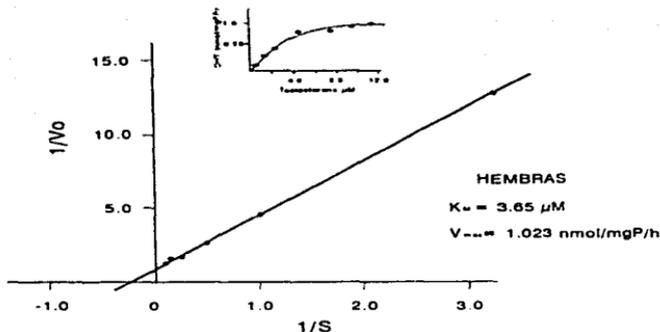


FIGURA 10 Efecto de la concentración del sustrato (Testosterona) sobre la velocidad de reacción catalizada por la 5 α -reductasa de la glándula de Harder de ratas hembras. Homogenizados de ratas hembras (n=10) se incubaron con diferentes concentraciones de T-[3 H] (0.3, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 μ M) a un pH de 6.5 (buffer Tris-citrato) durante 30 min a 37°C. Gráfica de Lineweaver-Burk; la izquierda y la derecha es la curva de saturación

Actividad de la 5 α -esteroide reductasa a diferentes concentraciones de cofactor (NADPH)

Para estudiar la respuesta de la enzima frente a la concentración de su cofactor NADPH, se hicieron estudios usando precipitados de los homogenizados totales, ya que de esta manera se eliminó la mayoría de NADPH endógeno que quedó en el sobrenadante del centrifugado. Los estudios se efectuaron a un pH de 6.5 y en presencia de T-[3 H] (4 μ M) y a concentraciones crecientes de cofactor. Como se observa en la figura 11 no existe actividad enzimática en ausencia de NADPH y esta actividad se detecta en presencia del cofactor (50 μ M), incrementándose al aumentar la concentración del mismo. La máxima actividad para la formación de DHT (barras oscuras fig. 11) se observa a 500 μ M de NADPH y aparentemente decae a 1000 μ M, sin embargo, la formación de dioles (barras con entramado), los cuales son metabolitos formados a partir de DHT, aumentan a esta última concentración. Al sumar la DHT y los dioles formados, dan una curva de saturación que se mantiene constante entre 500 y 1000 μ M. Al transformar estas curvas de saturación a gráficas de doble

recíproca, se obtuvieron las constantes de Michaelis-Menten para NADPH en la actividad de la 5α -reductasa, la K_M en los machos fue de 262 μM (Fig. 12) y para las hembras de 83.09 μM (Fig. 13)

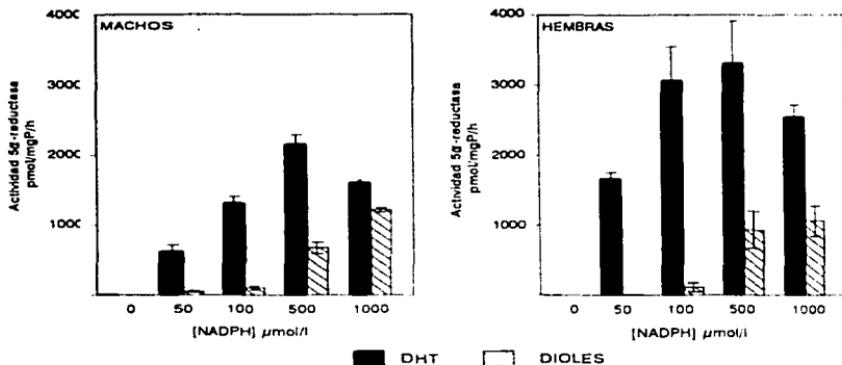


FIGURA 11 Efecto del NADPH en la actividad de la 5α -esteroide reductasa en la glándula Harderiana de rata a pH 6.5 Homogenizados (100 mg/ml) de glándula Harderiana de rata macho (n=5) o hembra (n=5) se centrifugaron 30 min a 30 000 rpm y el precipitado se incubó con testosterona- ^3H (500 000 dpm, 4 $\mu\text{mol/L}$) con diferentes concentraciones de NADPH (0, 50, 100, 500, y 1000 $\mu\text{mol/L}$), a 37°C durante 30 min, en un volumen de incubación de 1 ml y a pH de 6.5. Se analizó la transformación de testosterona- ^3H a 5α -dihidrotestosterona y a dioles (3 α ,5 α Adiol y 3 β ,5 α Adiol). Los valores mostrados son el promedio de 3 experimentos, las líneas delgadas representan la magnitud de \pm una desviación estandar.

MACHOS

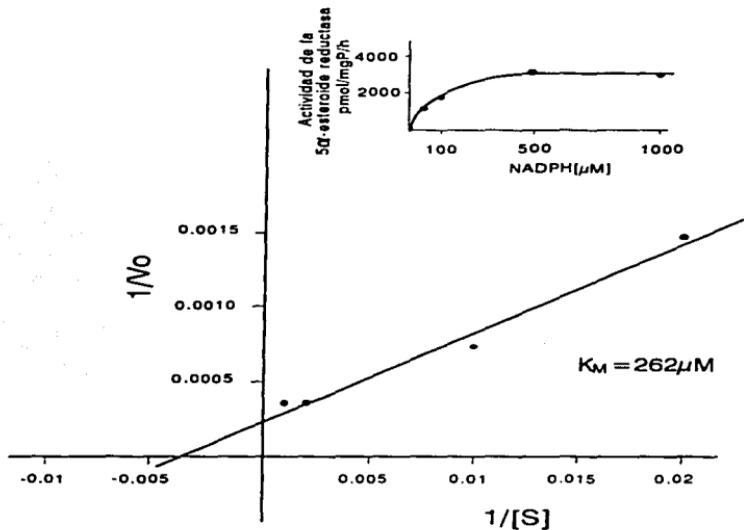


FIGURA 12 Actividad de la 5 α -esteroid reductasa en la glándula Harderiana de ratas machos (n=5) en función de la concentración del cofactor (NADPH). Precipitados de los homogenizados de glándula Harderiana de ratas (100 mg/ml) centrifugados a 30000 rpm por 30 min, se incubaron con testosterona- 3H (500 000 dpm, T m 4nmola/l), con diferentes concentraciones de NADPH (0, 50, 100, 500, 1000 μ mol/l), a 37°C durante 30 min, en un volumen total de 1 ml a pH de 6.5. La K_M fué calculada mediante el análisis de la transformación de T- 3H a DIT + DIOLES graficandola por el metodo de Lineweaver-Burk.

HEMBRAS

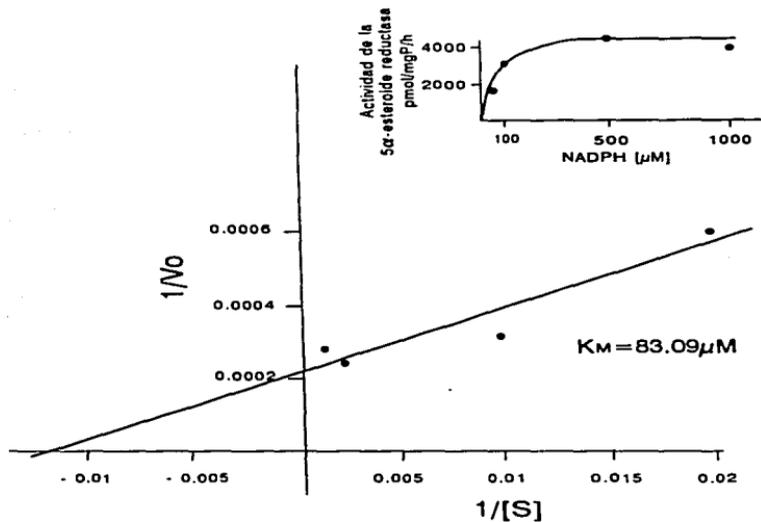


FIGURA 13. Efecto de NADPH sobre la actividad de la 5 α -reductasa en la glándula Harderiana de rata. Precipitados de glándula Harderiana de ratas hembras (n=5) se incubaron con testosterona- ^3H] (500 000 dpm, T 3 4nmola/l), con diferentes concentraciones de NADPH (0, 50, 100, 500, 1000 μ mol/l), en un volumen final de incubación de 1 ml a pH=6.5. La transformación de testosterona- ^3H] a DHT + DIOLES se representa en la grafica de Lineweaver-Burk.

Actividad de la 5 α -esteroide reductasa en animales intactos y castrados

Para conocer el efecto que ejerce la castración sobre la actividad de la 5 α -esteroide reductasa en la glándula Harderiana de la rata se hicieron estudios con animales intactos y castrados durante 20 días. Como se observa en la figura 14, la castración no influyó en la actividad de la 5 α -reductasa en las ratas macho. En las hembras la ovariectomía induce un pequeño incremento en la actividad enzimática la cual no es significativamente diferente a las intactas (metodo T de Student pareado)

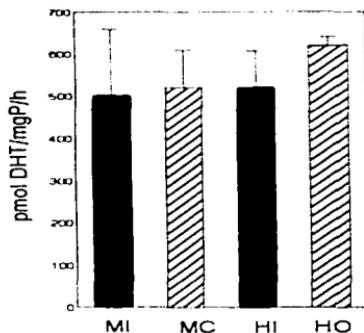


FIGURA 14. Actividad de la 5 α -esteroide reductasa en la glándula Harderiana de ratas hembras y machos, intactas y gonadectomizadas. Homogenizados de glándula Harderiana de ratas intactas y gonadectomizadas (100 mg/ml) se incubaron con testosterona-[3 H] (10^6 dpm, 8 nmola/l), a 37°C durante 30 min, en un volumen de incubación de 2 ml (Buffer, Tris-HCl 100 mM, citrato de sodio 100 mM). El animal fue sacrificado a los 20 días después de la gonadectomía y los valores graficados son el resultado de dos experimentos, las líneas representan la magnitud de \pm una desviación estandar

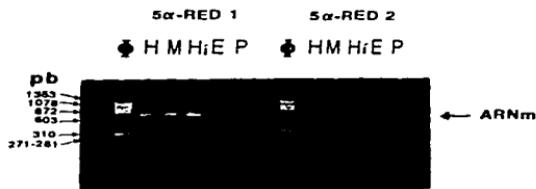


FIGURA 15 Expresión del ARNm de la 5 α -reductasa 1 y 5 α -reductasa 2. Se emplearon alícuotas de 1.5 μ g de ARN total para la síntesis de la primera hebra del ADNc, mediante la actividad de una reversa transcriptasa. Se tomaron alícuotas de 5 μ l y se corrieron en geles de agarosa (1%) con bromuro de etidio. Carril 1. Peso molecular (ϕ digerido con Hae III). Carril 2. Glándula de Harder de hembra (H), Carril 3. Glándula de Harder de macho (M), Carril 4. Hígado (Hi), Carril 5. Epididimo (E) y Carril 6. Próstata (P). A la izquierda expresión de la enzima 5 α -reductasa 1 y a la derecha 5 α -reductasa 2.

Amplificación del ARNm de la 5 α -reductasa

Para investigar la presencia del ARNm de la 5 α -reductasa 1 y/o 5 α -reductasa 2 en la glándula Harderiana de la rata se obtuvo el ADNc a partir del ARNm, mediante la actividad de una transcriptasa reversa, este ADNc se amplificó usando el método de PCR. Como se observa en la figura 15, cuando se amplificó el ADNc de la 5 α -reductasa 1 (derecha) se obtuvieron bandas con una talla dentro de lo esperado (~750 pares de bases [bp]). Tanto las glándulas Harderianas de hembras y machos, así como los controles (hígado, epididimo y próstata) presentaron ésta banda, por lo que, se puede afirmar que en la glándula Harderiana de la rata existe el ARNm de la 5 α -reductasa 1, tanto en machos como en hembras.

En la amplificación del ADNc de la 5 α -reductasa 2 (izquierda) se observó que solamente el epididimo presenta esta banda, esto indica que la 5 α -reductasa 2 no se expresa en la glándula Harderiana de rata hembra y macho.

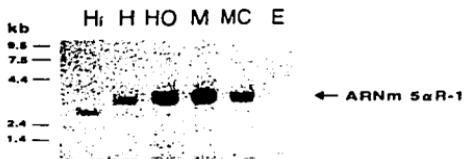


FIGURA 16. Análisis de la hibridación del ARNm de la glándula Harderiana de rata macho y hembra. Alcuotas de ARN total (15-20 µg) aislado de tejido glandular de ratas macho y hembra intactas, machos castrados y hembras ovariectomizadas, fueron sujetos a análisis por Northern blot, usando como sonda el ADNc de la 5α-reductasa 1 de rata, marcado con [32 P]dCTP (H₁) hígado, (H) hembra intacta, (HO) hembra ovariectomizada, (M) macho intacto, (MC) macho castrado y (E) epididimo

Análisis por Northern blot

La hibridación de la sonda de la 5α-reductasa tipo 1, marcada radiactivamente, con el ARN de la glándula Harderiana de ratas hembras y machos, gonadectomizados e intactos, dio como resultado (fig. 16) manchas que se encontraron a una altura entre 2.7 y 4.4 Kb (Kilobases), lo cual concuerda con la talla reportada en la literatura (Normington y Russell, 1992) En este experimento se usó como control ARN de hígado, el cual también dio una mancha, que se localizó abajo (2.5 Kb) de las encontradas para la glándula Harderiana. Lo anterior, demuestra que la 5α-reductasa tipo 1 sí se expresa en la glándula de Harder de rata tanto en hembras como en machos.



FIGURA 17. Análisis por Northern blot de la 5 α -reductasa 2. Se tomaron alícuotas de ARN total (15-20 μ g) aislado de tejidos de rata Wistar, los cuales fueron sujetos a hibridación con la sonda de ADNc de la 5 α -reductasa 2 de rata, marcada con [α^{32} P]dCTP. Hígado (H), epididimo (E), macho intacto (M), hembra intacta (H), macho castrado (MC) y hembra ovariectomizada (HO).

Cuando se hibridó con la sonda de la 5 α -reductasa 2, la señal solamente se encontró en epididimo (que se usó como control) y no en el ARN de las glándulas Harderianas (fig. 17). La señal encontrada presenta dos bandas que se encontraron dentro de la talla esperada (2.7 a 4.4 Kb), la presencia de estas dos bandas se ha reportado previamente por otros investigadores (Normington y Russell, 1992); indicando con estos resultados que la 5 α -reductasa 2 no se expresa en la glándula de Harder de rata hembra y macho.

DISCUSIÓN

En este trabajo se demuestra la existencia de la 5α -esteroide reductasa tipo 1 en la glándula Harderiana de la rata.

La 5α -esteroide reductasa ha sido objeto de numerosos estudios en los últimos años, ya que esta enzima es muy importante en el mecanismo de acción de los andrógenos, debido a que cataliza la conversión de testosterona a un andrógeno más potente; la dihidrotestosterona.

El hecho de que las isoenzimas de la 5α -reductasa presentan diferentes pHs óptimos ha sido de gran utilidad en el estudio de la reducción de testosterona en 5α . La 5α -reductasa 1 actúa en un rango amplio de pH que va de 6 a 8.5 (Andersson y Russell, 1990), mientras que la 5α -reductasa 2 trabaja característicamente a un pH de 5.5. Los resultados obtenidos a diferentes pHs en la glándula de Harder, indican que la enzima que actúa en este tejido es la 5α -reductasa 1, ya que en las hembras se obtuvo un pH óptimo de 6.5 y en machos de 7. Aunque existe una diferencia de media unidad de pH entre los dos sexos, estas se encuentran dentro del rango atribuido a la 5α -reductasa 1.

El pH óptimo de una enzima es usualmente la consecuencia de un estado iónico de los aminoácidos con carga en el sitio activo y una diferencia entre la glándula de Harder de hembras y machos es el ambiente hormonal en el que se encuentran, las hembras a través del ciclo estral pueden tener estrógenos o progesterona y los machos tienen andrógenos continuamente, posiblemente esto influya en los pHs óptimos encontrados en estos experimentos y sería necesario su comprobación.

La constante de Michaelis-Menten (K_M) de la enzima por su sustrato (testosterona) se midió en homogenizados totales de glándula Harderiana, sin adicionar el cofactor NADPH. Para los machos se obtuvo una K_M de $3.32 \mu\text{M}$ y para las hembras de $3.65 \mu\text{M}$, estas constantes concuerdan con las encontradas para la 5α -reductasa 1, ya que se ha observado que esta isoenzima tiene una menor afinidad por la testosterona, que la 5α -reductasa tipo 2, los valores de la K_M para la 5α -reductasa 1 encontrada en diferentes tejidos de rata, como hígado y próstata o en piel de humano, van desde $1 \mu\text{M}$ (Frederiksen y Wilson, 1971; Roy, 1971; Voigt, et al., 1970) hasta $30 \mu\text{M}$ (Schimizaki, et al., 1965). Mientras que para la 5α -reductasa 2 se han observado valores en rangos submicromolares (0.1 - $1.0 \mu\text{M}$) (Thigpen, et al., 1993).

Para estudiar la dependencia de la 5α -reductasa por el cofactor NADPH, se usaron precipitados de homogenizados, de esta manera se eliminó el cofactor endógeno, el cual se encuentra en la fracción soluble de la célula. Como se observa en la fig. 11, cuando no se añade el cofactor, la enzima no tiene actividad detectable, lo que indica un requerimiento absoluto por el cofactor y cuando se adiciona el NADPH, la actividad se incrementa llegando a un máximo en una concentración de $500 \mu\text{M}$.

Es interesante ver que a mayor actividad enzimática (500 y 1000 μM de NADPH) la DHT a su vez se metaboliza a sus androstandioles, no permitiendo de esta manera la acumulación de un andrógeno de alta potencia biológica, como lo es la DHT.

En estos estudios se observa además, que la actividad específica de la enzima se incrementa considerablemente en comparación con los estudios hechos en homogenados, esto es debido, probablemente a que, por una parte se eliminan proteínas que se encuentran en la fracción soluble de la célula y por otro lado, se ha observado que el cofactor NADPH le confiere estabilidad a la enzima (Leshin, et al., 1978)

También se observa en estos estudios, que las hembras presentan una mayor actividad enzimática (4251.01 ± 349 pmol/mgP/h, DHT + Diol a 500 μM de NADPH) en comparación con la actividad en machos (2011.33 ± 238.18 , DHT + Dioles, a 500 μM de NADPH) y al comparar la K_M para NADPH, se encontró que las hembras tienen una K_M menor ($K_M = 83.09$ μM) que los machos ($K_M = 262$ μM) indicando que la 5α -reductasa tiene una mayor afinidad por el cofactor en hembras que en machos. Estas diferencias pueden estar basadas en la presencia de andrógenos en la glándula Harderiana de ratas macho.

Cuando se comparó la actividad enzimática en animales intactos y castrados (fig. 14), no se observaron diferencias, ni entre machos y hembras, ni entre intactos y castrados. El estudio se hizo con homogenados totales y posiblemente debido a esto, no encontramos las diferencias entre macho y hembra observadas cuando se usaron precipitados, a los cuales se les adicionó NADPH (diferentes pHs, fig. 8 y con diferentes concentraciones de NADPH figs. 12 y 13). La adición de NADPH al medio de incubación permite una mayor estabilidad (Span et al., 1995) a la enzima y la ausencia o baja concentración de andrógenos en la glándula Harderiana de ratas hembras, aparentemente, hace que la

afinidad por el cofactor se incrementa (figs. 12 y 13), permitiendo de esta manera, una mayor actividad enzimática (fig. 11)

La regulación por andrógenos en la actividad de la 5α -reductasa ha sido estudiada en diversos tejidos. Los primeros informes acerca de esta regulación, se efectuaron en hígado de rata (Yates, et al., 1958) en donde se observó que la actividad de la enzima es mayor en hembras en comparación con los machos, lo cual da un indicio de que los andrógenos de alguna manera influyen en la actividad de esta enzima. Estudios recientes (George, et al., 1991) efectuados en próstata de rata, demuestran que específicamente la DHT es el esteroide que efectúa la regulación de la enzima, en este tejido se observa que en ausencia de andrógenos endógenos (gonadectomía) la actividad de la 5α -reductasa disminuye notablemente y al administrar DHT se incrementa la actividad, también observaron que esta actividad enzimática está directamente relacionada con la cantidad de ARNm de la enzima en este tejido, lo que implica que la regulación enzimática se efectúa a nivel transcripcional

En estudios "*in vitro*" efectuados en pituitaria de rata macho (Vanderstichele, et al., 1990) se observó que la castración incrementa notablemente la actividad de la 5α -reductasa y este incremento es revertido con la administración de testosterona, sugiriendo que la testosterona está involucrada en la regulación de la actividad de la 5α -reductasa en este tejido

En la glándula Harderiana de Hamster (Vilchis, et al., 1994) también se observó una regulación negativa de la testosterona sobre la actividad enzimática de la 5α -reductasa, además de disminuir la cantidad de ARNm para esta enzima

De una manera general, se ha observado que tanto la actividad como la regulación de la 5α -reductasa es diferente en función de los tejidos y según las especies estudiadas.

La regulación de la 5α -reductasa en cada tejido es muy importante ya que a la 5α -reducción se le han asignado dos papeles importantes: el primero, es el de actuar a nivel de células blanco para andrógenos en donde reduce la testosterona a DHT, el cual es un andrógeno de mayor potencia, el segundo, es el de reducir esteroides para acelerar su catabolismo.

El análisis por Northern blot, así como la amplificación del ARNm de las isoenzimas con actividad de 5α -reducción en la glándula de Harder de la rata nos permitieron comprobar que la enzima presente en este tejido es la 5α -reductasa 1, la cual dio señal positiva, tanto en la glándula Harderiana de machos como de hembras, así como en los controles usados (hígado, epididimo y prostata) no así la de la 5α -reductasa 2 la cual solo dio señal en el tejido control (epididimo), en el cual se ha comprobado su existencia (Normington y Russell, 1992).

La presencia de la isoenzima 5α -reductasa 1 en este tejido podría indicar que la función de esta glándula es fundamentalmente catabólica, en relación a su acción sobre la testosterona.

CONCLUSIONES

En conclusión, mediante los estudios efectuados en este trabajo se encontró que en la glándula Harderiana de la rata está presente la 5 α -reductasa tipo I, cuyas características fisicoquímicas son similares con las encontradas en otros tejidos, además de que su ARNm híbrido con la sonda específica para esta enzima.

El interés por el estudio de la enzima 5 α -reductasa de la glándula Harderiana, es debido a que nos permitirá un mejor entendimiento de los mecanismos involucrados en la actividad de esta enzima, la cual forma parte del mecanismo de acción de los andrógenos.

Además, el agrupamiento de estos datos y los encontrados en otros tejidos por diversos investigadores de alguna manera se podrán aprovechar para entender algunos padecimientos en los cuales está involucrada la actividad de la 5 α -reductasa, como en la hiperplasia prostática, el hirsutismo, el acné y el cáncer de próstata.

REFERENCIAS

- Andersson S., Berman D.M., Jenkins E.P. and Russell D.W. (1991) Deletion of steroid 5 α -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism *Nature* 354:159-161
- Andersson S., Bishop R.W. and Russell D.W. (1989) Expression cloning and regulation of steroid 5 α -reductase, an enzyme essential for male sexual differentiation *J Biol Chem* 264:16249-16255.
- Andersson K.M. y Liao S. (1968) Selective retention of dihydrotestosterone by prostatic nuclei. *Nature* 219:277-279
- Andersson S. and Russell D.W. (1990) Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 α -reductases *Proc Natl Acad Sci USA* 87:3640-3644.
- Berman D.M., Tian H. y Russell D.W. (1995) Expression and regulation of steroid 5 α -reductase in the urogenital tract of the fetal rat *Mol Endocrinol* 9:1561-1570
- Binlingmaier R., Dorr G., Eisenmenger W., Kuhnle R. and Knorr D. (1986) Contribution of the adrenal gland to the production of androstendione and testosterone during the first two years of life *J Clin Endoc Metab.* 62:331-335
- Brownschidle C.M. y Niewenhuis R.J. (1978) Ultrastructure of the Harderian gland in male Albino rats *Anat Rec* 190:735-754
- Bruchovsky N. y Wilson J.D. (1968) The conversion of testosterone to 5 α -androstan-17 β -ol-3-one by rat prostate *in vivo* and *in vitro* *J Biol Chem* 243:2012-2021.
- Bubenik G.A., Brown G.M. and Grota L.J. (1976) Immunohistochemical localization of melatonin in the rat Harderian gland *J Histochem Cytochem* 24:1173-1177
- Buzzell G.R., Menendez-Pelaez A., Hoffman R.A., Vaughan M.K., Reiter R.J. (1990a) N-acetyltransferase activity in the Harderian glands of the Syrian hamster *Mesocricetus auratus*, is regulated by androgens and by hormones of the pituitary-thyroid axis. *Journals of Endocrinology*. 127:59-67
- Buzzell G.R., Menendez-Pelaez A., Troiani M.E., McNeill M.E. and Reiter R.J. (1990b). Effects of short-day photoperiods and of N-(2,4-dinitrophenyl)-5-methoxy tryptamine a putative melatonin antagonist on melatonin synthesis in the Harderian gland of the Syrian hamster. *Mesocricetus auratus*. *Journal of Pineal Research* 8:229-237

- Carson-Jurica M.A., Schrader W.T. y O'Malley B.W.** (1990). Steroid receptor family structure and functions *Endocr Rev.* 11:201
- Chang C., Kokontis J. y Liao S.** (1988) Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* 240 324-327.
- Christensen F. and Dam H.** (1953) A sexual dimorphism of the Harderian gland in hamsters *Acta Physiol Scand.* 27 333-336
- Derrien E. and Turchini J.** (1924) Sur l'accumulation d'une porphyrine dans la glande de Harder des rongeurs du genre *Must* et sur son mode d'excretion *C.R. Soc Biol (Paris)* 91:637-639
- Deslypere J.P., Young M., Wilson J.D. y McPhaul M.J.** (1993) Testosterone and 5α -dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene *Mol Cell Endocrinol* 88 15-22.
- Evans R.M.** (1988) The steroid and thyroid hormone receptor family *Science*. 240 889-895.
- Fleischer D.** (1907) Musculus retractor bulbi and drittes hid bei einer menschlichen missbildung *Anatomischer Anzeiger*. 30 465-470
- Frederiksen D.W. y Wilson J.D.** (1971) Partial characterization of the nuclear reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, Δ^4 -3-ketosteroid 5α -oxidoreductase of rat prostate *J Biol Chem* 246 2584-2593
- French S.F., Lubahn D.B., Brown T.R., Simental J.A., Quigley C.A., Yarbrough W.G., Tan J.-A., Sar M., Joseph D.R., Evans B.A.J., Hughes I.A., Migeon C.J. and Wilson E.M.** (1990) Molecular basis of androgen intensitivity *Rec Prog Horm Res.* 46: 1-42.
- George F.W., Russell D.W. and Wilson J.D.** (1991) Feed-forward control of prostate growth: Dihydrotestosterone induces expression of its own biosynthetic enzyme, steroid 5α -reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 8044-8047
- Giacomini C.** (1887) Sui alcune anomalie di sviluppo dell'embrione umano. *Atti dell'Accademia dell Scienze* (Torino) 23:148-157, 206-221, 1004
- Grino P.B., Griffin J.E., Wilson J.D.** (1990) Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology*. 126:1165-1172.
- Gustafsson J.A., Pousette A.** (1975). Demonstration and partial characterization of cytosol receptors for testosterone. *Biochemistry*. 14:3094-3101

- Ham S., Thomson A., Needham M., Webb P., Parker M.** (1988) Characterization of response elements for androgens, glucocorticoids and progestins in mouse mammary tumor virus *Nucleic Acids Res.* 16 5263-5276
- Hoffman R.A., Johnson L.B., Reiter R.J.** (1985) Harderian glands of golden hamster: temporal and sexual differences in immunoreactive melatonin *Journal of Pineal Research* 2 161-168
- Houston B., Chisholm G.P. and Habib F.K.** (1985) Solubilization of human prostatic 5 α -reductase *J Steroid Biochem.* 22 461-467.
- Jenkins E.P., Hsieh C.L., Milatovich A., Normington K., Berman D.M., Francke U., Russell D.W.** (1991) Characterization and chromosomal mapping of a human steroid 5 α -reductase gene and pseudogene and mapping of the mouse homologue *Genomics* 11 1102-1112
- Jóó Y. and Kahán A.** (1975) The porphyrin content of Harderian glands in rats and the melatonin melanocyte stimulating hormone-system *Endocrinologie.* 65 308-312
- Kanwar K.C.** (1960) Morphological and cytochemical studies on the Harderian glands of rats *Cellule* 61 129-143
- Kase N., Forchielli E. and Dorfman R.I.** (1961) In vitro production of testosterone and androst-4-ene-3,17-dione in human ovarian homogenate *Acta Endocrinol.* 37 19-23
- Kaufman M. and Pinsky L.** (1983) The dissociation of testosterone and 5 α -dihydrotestosterone-receptor complexes formed within cultured human genital skin fibroblasts *J Steroid Biochem.* 18 121-125
- Kelényi G. and Orbán S.** (1964) Electron microscopy of the Harderian gland of the rat. maturation of the acinar cell and genesis of the secretory droplets *Acta Morphol Acad Sci Hung* 13 155-166
- Kennedy G.Y., Jackson A.H., Kener G.W. and Suckling C.J.** (1970) Isolation, structure and synthesis of a tricarboxylic porphyrin from the Harderian glands of the rat *FEBS Lett* 6 9-11
- Labrie F., Sugimoto Y., Luu-the V., Simard J., Lachance Y., Bachvarov D., Leblanc G., Durocher F. and Paquet. N.** (1992). Structure of human type II 5 α -reductase gene *Endocrinology.* 131 1571-1573
- Leshin M. Griffin J.E. Wilson J.D.** (1978). Hereditary male pseudohermaphroditism associated with an unstable form of 5 α -reductase. *J Clin Invest.* 62:685-691
- Loewenthal N.** (1910). Nouvelles recherches sur les glandes sousorbitaire externe et lacrymale. *Bibliographie Anatomique.* 19:301-315.

Lubahn D.B., Joseph D.R., Sullivan P.M., Willard H.F., French F.S. and Wilson E.M. (1988) Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X-chromosome. *Science* 240 327-330

Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G. (1995) The nuclear receptor superfamily The second decade. *Cell* 83 835-839

Marcelli M., Zoppi S., Grino P.B., Griffin J.E., Wilson J.D. and Mc-Paul M.J. (1991) A mutation in the DNA-binding domain of the androgen receptor gene causes complete testicular feminization in a patient with receptor-positive androgen resistance. *J Clin Invest* 87 1123.

McGuire J.S. jr. and Tomkins G.M. (1960) The heterogeneity of Δ^4 -3-ketosteroid reductases (5 α). *J Biol Chem* 235 1634-1638

Menendez-Pelaez A., Reiter R.J., Gonzalez-Brito A., Howes K.A. (1989) N-acetyltransferase activity and indole contents of the male Syrian hamster Harderian gland. Changes during the light dark cycle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 268 20-25

Moore R.J. y Wilson J.D. (1976) Steroid 5 α -reductase in cultured human fibroblasts biochemical and genetic evidence for two distinct enzyme activities. *J Biol Chem* 251 5895-5900

Morris M.D. and Chaikoff I.L. (1959) The origin of cholesterol in liver, small intestine, adrenal gland and testis of the rat dietary versus endogenous contributions. *J Biol Chem*. 234 1095-1097.

Normington K. and Russell D.W. (1992) Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 α -reductase isozymes. *J Biol Chem* 267 19548-19554

Paule W.J., Hayes E.R., Marks B.H. (1955) The Harderian gland of the Syrian hamster. *Anat Rec*. 121 249-350

Pierce J.E. and Parsons T.F. (1981) Glycoprotein hormones, structure and function. *Ann. Rev. Biochem* 50 465

Podesta E.J., Dufau M.L. and Catt K.J. (1976). Cyclic adenosine 3':5' monophosphate dependent protein kinase of rat Leydig cell. Physical characteristics of two holoenzymes and their subunits. *Biochemistry* 17 1566.

Quigley C.A., De-Bellis A., Marschke K.B., El-Awady M.K., Wilson E.M. and French F.S. (1995) Androgen receptor defects, historical, clinical and molecular perspectives. *Endocr Rev* 16 271-321

Rosner W. y Smith R.N. (1975) Isolation and characterization of the testosterone-estradiol-binding globulin from human plasma use of a nival affinity column. *Biochemistry*. 14 4813-4820

- Roy A.B.** (1971) The steroid 5 α -reductase activity of rat liver and prostate. *Biochemic.* 53:1031-1040
- Russell D.W. and Wilson J.D.** (1994) Steroid 5 α -reductase: Two genes/two enzymes. *A Rev Biochem* 63 25-61
- Sakai T.** (1981) The mammalian Harderian gland morphology, biochemistry, function and phylogeny *Archiva Histologica Japonica.* 44:299-333.
- Schneider J.J. and Horstmann P.M.** (1951). Effects of incubating desoxycorticosterone with various rat tissues *J Biol Chem* 191:327-328
- Seyama Y., Kasama T., Yasugi E., Park S-II and Kano K.** (1992) Lipids in Harderian glands and their significance *In Harderian glands: Porphyrin Metabolism, Behavioral and Endocrine Effects* (de Webb S M., Hoffman R.A., Puig-Domingo M. L. & Reiter R J.) Berlin: Springer. 195-217
- Simental J.A., Sar M., Lane M.V., French F.S. and Wilson E.M.** (1991) Transcriptional activation and nuclear targeting signal of the human androgen receptor. *J Biol Chem* 226:510-518.
- Shimazaki J., Ohki Y., Matsuoka M., Tanaka M. and Shida K.** (1972) Further studies on testosterone 5 α -reduction in rat ventral prostate *Endocrinol Japon* 19:69-75.
- Shirama K., Kohda M., Hokano M.** (1987) Effects of lighting conditions and of hormone replacement on the level of porphyrins in the rat Harderian gland *J Endocrinological Investigations* 10:79-82
- Smith D.F. and Toff D.O.** (1993) Steroid receptors and their associated proteins *Mol Endocrinol* 7:4-11
- Span P. N., Smals G.H., Sweep G.J. and Benraad Th.J.** (1995) Rat steroid 5 α -reductase kinetic characteristics: extreme pH-dependency of the type II isozyme in prostate and epididymis homogenates *J Steroid Biochem Molec Biol.* 54: 185-192
- Spike R.C., Payne A.P. and Moore M.R.** (1992) Porphyrins and their possible significance in Harderian glands *In Harderian glands: Porphyrin Metabolism, Behavioral and Endocrine Effects* (de Webb S M., Hoffman R.A., Puig-domingo M L & Reiter R.J.) Berlin:Springer. 156-197
- Strong L.C.** (1942). Sex differences in pigment content of Harderian glands of mice. *Proc Soc Exp Biol Med.* 50:123-125.

ESTA YESA HO ADE
 CALIN DE LO ADE

- Thigpen A.E., Cala K.M. and Russell D.W.** (1993) Characterization of Chinese hamster ovary cell lines expressing human steroid 5 α -reductase isozymes *J Biol Chem* 268: 17404-17412
- Tomio J.M. and Grinstein M.** (1968) Porphyrin biosynthesis 5. Biosynthesis of protoporphyrin IX in Harderian glands *European J Biochem.* 6: 80-83
- Tomkins G.M.** (1957) The enzymatic reduction of Δ^4 -3-ketosteroids *J Biol Chem* 225:13-24.
- Ulrich R., Yuwiler A., Geller E. and Wetterberg.** (1974) Effects of sex hormones and environmental lighting on rat Harderian gland porphyrin *J Endocr.* 63:99-102
- Vanderstichele H., Eechaute W. y Lacroix E.** (1990) Regulation of the pituitary 5 α -reductase activity by gonadotropin-releasing hormone and testosterone in the adult male rat. *J steroid Biochem* 35: 575-581
- Vivien-Roels B., Péuet P., Dubois P., Arendt J., Brown G.M.** (1981) Immunohistochemical evidence for the presence of melatonin in the pineal gland the retina and the Harderian gland. *Cell and Tissue Research* 217: 105-115
- Vlahakes G.J. and Wurtman R.J.** (1972) A Mg⁺⁺ dependent hydroxyindole O-methyltransferase in rat Harderian glands *Biochim Biophys Acta* 261: 194-197
- Vermeulen A., Verdockl., Straetan M.V., Opie N.** (1969) Capacity of the testosterone-binding globulin in human plasma and influence of specific binding of testosterone on its metabolic clearance rate *J Clin Endocrinol Metab* 29: 1470
- Vilchis F., Chávez B., Cerbón M.A., Pérez-Palacios G.** (1992) The Harderian gland as a target for steroid hormone action role and characteristics of intracellular receptors. *In Harderian Glands: Porphyrin Metabolism, Behavioral and Endocrine Effects.* (de. Weebb S M., Hoffman R A., Puig-domingo M L & Reiter R J) Berlin Springer. pp.297-316
- Vilchis F., Enriquez J., Queipo G., Pérez-Palacios G. and Chávez B.** (1994) Steroid 5 α -reductase activity in the Harderian glands of male and female Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) *Gen Comp Endocrinol* 96: 298-308.
- Vilchis F., Hernández A., Pérez A.E., Pérez-Palacios G.** (1987). Hormone regulation of the rodent Harderian gland binding properties of the androgen receptor in the male golden hamster *Journal of Endocrinology* 112: 3-8.
- Voigt W., Fernández E.P., Hsia S.I.** (1970) Transformation of testosterone into 17 β -hydroxy-5 α -androstane-3-one by microsomal preparations of human skin *J Biol Chem.* 245: 5594-5599
- Wetterberg., Yuwiler L.A., Geller E. and Schapiro S.** (1970). Harderian gland development and influence of early hormonal treatment on porphyrin content *Science.* 168: 996-998

Wilbert D.M., Griffin J.E. and Wilson J.D. (1983). Characterization of the cytosol androgen receptor of the human prostate *J Clin Endocrinol Metab.* 56:113-120.

Wilson J.D., Griffin J.E., Russell D.W. (1993). Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Endocr Rev.* 14:577-593

Woolley G.W., Wortley J. (1954). Sexual dimorphism in the Harderian gland of the hamster (*Cricetus auratus*) *Anatomical Record.* 118:416-417.

Yates E., Herbst A. and Urquhart J. (1958). Sex difference in the rate of ring a reduction of 4-3-keto-steroids *in vitro* by rat liver. *Am J Physiol.* 63:887-902.

Zivin J.A. and Waud D.R. (1982). How to analyze binding, enzyme and uptake data. the simplest case, a single phase *Life Sci.* 30:1407-1422.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

(Bradford 1976)

- **Preparación del reactivo para medir proteínas** Se disuelven 100 mg de azul de Coomassie en 50 ml de etanol al 95% (H_2O) más 100 ml de H_3PO_4 al 85%, llevándose a un volumen final de 1000 ml con H_2O , esta solución se mantiene en botella color ámbar
- **Se prepara una curva estándar** pesando 10 mg de albúmina serica bovina (BSA) disolviéndola en 10 ml de solución salina (NaCl 0.15 M, SS) Se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 278 nm empleando como blanco la solución salina, la lectura debe ser de una densidad óptica de 0.66 si no es así se ajusta a que quede la lectura

Preparación de los puntos de la curva

1. 0 μg 100 μl de SS
2. 25 μg Se toman 1.5 de solución stock y se llevan a un volumen de 5 ml con SS (25 $\mu g/100 \mu l$)
3. 50 μg . Se tomaron 2.5 ml de la solución stock y se llevaron a 5 ml con SS (50 $\mu g/100 \mu l$).
4. 75 μg : Se tomaron 3.5 ml de la solución stock y se llevaron a 5 ml con SS (75 $\mu g/100 \mu l$).
5. 100 μg : Se usa el stock sin diluir (100 $\mu g/100 \mu l$).

De cada punto de la curva se toman alícuotas de 100 μl por triplicado y se les adicionan 5 ml del reactivo preparado. Se agitan, se dejan reposar 1 min. y se leen a 595 nm contra un blanco del reactivo empleado.

Las muestras problema se llevan a 100 μl con SS, se les adicionan 5 ml del reactivo de Coomassie, se agitan, se dejan reposar 1 min. y se leen en las mismas condiciones que la curva patrón.

Las lecturas de los problemas se interpolan en la curva patrón.