



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios de Posgrado

Regulación Endócrina de la Glándula de Harder en
Vertebrados: El Papel de las Hormonas Esteroides y sus
Receptores Intracelulares

T E S I S
Que para obtener el grado Académico de
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA)
p r e s e n t a
BIOL. FELIPE DE JESUS / VILCHIS URIBE

Director de Tesis: Med. Cir. Part. Gregorio A Pérez Palacios

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
de Posgrado

OF. NUM. P-952

HED. CIR. GREGORIO ALBERTO PEREZ PALACIOS
P R E S E N T E.

Por este conducto se permite comunicarle que ha sido ratificado(a) como Director(s) de tesis del(a) alumno(a) FELIPE DE JESUS VILCHES URIBE, quien desarrolló el Trabajo de Tesis titulada: Regulación Endócrina de la Glándula de Harder en Vertebrados (El papel de las Hormonas Esteroides y sus Receptores Intracelulares).

Así mismo, les comunico a los siguientes miembros que la Dirección de la Facultad, los ha designado como sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado(a) tiene los méritos para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGÍA).

CARGO	GRADO	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	: DHA.	MARIA LUISA FANJUL PEÑA DE JULES
PRIMER VOCAL	: MED. CIR. PART.	GREGORIO ALBERTO PEREZ PALACIOS
SEGUNDO VOCAL	: DR.	ENRIQUE ANTONIO PEDERNERA ASTECIANO
TERCER VOCAL	: MED. CIR.	FERNANDO LARREA GALLO
SECRETARIO	: H. EN C.	JUAN PABLO MENDEZ BLANCO
SUPLENTE	: DHA.	MARIA DEL CARMEN MENDEZ HERRERA
SUPLENTE	: DR.	JOSE PEDRAZA CHAVEARI

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D. F., a 26 de mayo 1997.
JEFE DE LA DIVISIÓN


DRA. MARGARITA COLCHÁN ORTEGA

HCD/ASR/1996

El trabajo experimental para la elaboración de la presente tesis se realizó en el Laboratorio de Bioquímica Hormonal del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubiran, bajo la dirección del Dr. Gregorio Pérez Palacios.

Los resultados de esta tesis corresponden a los artículos que aparecen en la sección respectiva (RESULTADOS, VI).

CONTENIDO

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
III. ANTECEDENTES	3
1. La glándula Harderiana de Vertebrados Localización y Morfología [3]. Organización Histológica [3]. Embriología [8]. Inervación [8].	
2. Productos de la Glándula Harderiana [9]. Porfirinas [9]. Lípidos [11]. Indolaminas [12].	
3. Función de la Glándula Harderiana [13].	
4. Hormonas y Glándula Harderiana [14].	
5. Mecanismo de Acción de las Hormonas Esteroides [17].	
IV. OBJETIVO DEL ESTUDIO	22
V. MATERIAL Y MÉTODOS	23
VI. RESULTADOS	25
1. Vilchis F. and Pérez-Palacios G. (1989). Steroid hormone receptors and the sexual phenotype of the Harderian gland in hamsters. <i>J. Endocr.</i> 121:149-156.	
2. Vilchis F., Chávez B. and Pérez-Palacios G. (1991). Steroid hormone binding in the Harderian gland of birds: Characteristics of the androgen, estrogen and progestin receptors of <i>Anas platyrhynchos</i> and <i>Gallus domesticus</i> . <i>Gen. Comp. Endocrinol.</i> 82:425-433.	
3. 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 (<i>Mesocricetus auratus</i>). <i>Gen. Comp. Endocrinol.</i> 96:298-308.	
VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	29
VIII. BIBLIOGRAFÍA	39
IX. ANEXO	51

RESUMEN

Este trabajo resume algunas evidencias experimentales que permiten apoyar la idea de que los esteroides ejercen efectos directos sobre la actividad biosintética y la estructura de la glándula Harderiana (GH). Mediante estudios de saturación al equilibrio, análisis inmunohistoquímico y reemplazo hormonal, se estableció la presencia y propiedades fisicoquímicas de receptores intracelulares para hormonas esteroides en tejidos de varias especies, haciendo un mayor énfasis en la glándula del hámster sirio. Los resultados de cinética de unión, usando dimetilnortestosterona- ^3H], estradiol- ^3H], ORG2058- ^3H] y dexametasona ^3H] como ligandos, demostraron la existencia de receptores específicos para andrógenos (RA), estrógenos (RE), progestágenos (RP) y glucocorticoides (RG) respectivamente. Los receptores identificados mostraron características de alta afinidad (K_d s = $0.3\text{-}2.0 \times 10^{-9}\text{M}$), baja capacidad ($B_{\text{max}} = 40\text{-}120 \text{ fmol/mgP}$), velocidad de sedimentación (7-9S) y especificidad, similares a los reportados en otros órganos. Se encontró que el RA es el que se expresa en mayor abundancia en la GH de prácticamente todas las especies examinadas. En el hámster este exhibe una localización preferentemente nuclear y su distribución no se modifica por la gonadectomía. Se reporta además que la formación de 5α -dihidrotestosterona a nivel glandular es determinante para la mediación de actividad androgénica. Otros hallazgos importantes fueron: que en roedores la GH esta desprovista de receptores funcionales de progesterona, mientras que en aves, los estrógenos no modifican los niveles basales de RP intraglandulares. Los datos aquí presentados indican que las hormonas esteroides modulan la actividad de la GH a través de su interacción con receptores intracelulares específicos y aportan evidencia para considerar a la glándula Harderiana de los vertebrados como un órgano blanco para esteroides.

II. INTRODUCCION

La glándula Harderiana (GH) es una estructura tubuloalveolar localizada dentro de la órbita ocular de la mayoría de vertebrados que poseen membrana nictitante (Paule, 1957). Esta glándula se describió originalmente en el ciervo en 1694 (Harder)*. A excepción de los peces, la GH se encuentra en anfibios, reptiles, aves, y mamíferos aunque parece estar ausente en quirópteros, carnívoros y primates (Tabla 1, Anexo). Al respecto se ha mencionado que en antropoides la GH es rudimentaria y que en el humano existe en forma vestigial (en fetos de 11 a 30 semanas) como una estructura embrionaria transitoria (Lowental, 1910; Kennedy, 1970). Las funciones atribuidas a esta glándula son múltiples y variadas. Se piensa que sirve primordialmente para lubricar y humedecer la cornea y la nasofaringe. Se le considera además como un órgano productor de saliva, feromonas, melatonina e inmunoglobulinas y como un fototransductor en un sistema formado por el eje retina-pineal-gónada. No obstante su amplia distribución filogenética y el número de funciones en las que parece estar involucrada la GH, se sabe relativamente poco de los factores y mecanismos que intervienen en su regulación. La información acumulada ha permitido establecer que las hormonas esteroides desempeñan un papel relevante en el control endocrino de este órgano. Se tiene evidencia que los estrógenos, andrógenos, progestágenos y glucocorticoides pueden afectar tanto su estructura como su actividad secretora (Woolley y Worley, 1954; Wetterberg *et al.*, 1970c; Hoffman, 1971; Payne *et al.*, 1977; Shirama *et al.*, 1981; Gupta y Maiti, 1983). Algunos autores han sostenido sin embargo que los esteroides modulan la actividad glandular, a través de mecanismos de retroalimentación y que por lo tanto son las concentraciones de gonadotrofinas y otras hormonas hipofisarias las que mantienen su función normal (Hoffman, 1971; Clabough y Norvell, 1973). A fin de determinar si los esteroides ejercen un efecto directo sobre este tejido, en el presente estudio se investigó la presencia de receptores específicos en la GH de varias especies. Los resultados aquí presentados apoyan la idea que las hormonas esteroides regulan la actividad de la GH mediante su interacción con receptores intracelulares específicos.

* Ver Fig.1 (Anexo)

III. ANTECEDENTES

1.- La Glándula Harderiana de los Vertebrados

Localización y Morfología. La GH forma una estructura unitaria, la cual está adherida firmemente a la parte medial de cada órbita ocular y su ducto desemboca a la superficie del tercer párpado. Esta no ha sido descrita ni en peces ni en anfibios Urodelos, pero está presente en formas acuáticas secundarias como cocodrilos y cetáceos (Paule, 1957; Kennedy, 1970). En la Fig. 2 se muestran las variaciones en forma y talla de la GH de algunas especies. En los anuros es la única glándula orbital, mide alrededor de 2.5 mm y tiene una forma ovoide (Chieffi *et al.*, 1992). El volumen de la GH en los reptiles es variable, en la mayoría de las especies examinadas hasta ahora es relativamente grande y en algunos casos llega a cubrir por completo la superficie posterior del ojo (Bellairs y Boyd, 1947). En contraparte, las serpientes acuáticas exhiben GHs poco desarrolladas (Chieffi *et al.*, 1992). De acuerdo a Burns (1978), la morfología de la GH en las aves es muy similar en las diferentes especies y muestra solo ligeras variaciones. Su forma se asemeja a la de un calzador y presenta una hendidura en la porción central que la divide por lo largo, en dos lóbulos indistinguibles uno del otro. La anatomía macroscópica de la GH de los mamíferos es muy variable. En roedores y lagomorfos está bien desarrollada y puede llegar a ser tan grande como el ojo. A menudo su forma se describe como la de una herradura de contorno alisado con un lóbulo superior (pequeño) y uno inferior (grande). Recientemente, Payne (1994) ha descrito en detalle la posición de la glándula en éste grupo (ver también Sakai, 1981 y 1992).

Organización Histológica. En los vertebrados, la GH puede ser tubular o tubuloalveolar compuesta. En muchas especies es de apariencia homogénea de tal manera que no se reconocen regiones especializadas. Normalmente, los túbulos glandulares están rodeados por una red de células mioepiteliales y tejido intersticial, el cual puede contener algo de tejido linfoide.

Epitelio secretor. Las características del epitelio Harderiano difieren de especie a especie (Paule, 1957; Sakai, 1981; Burns, 1978). En los anfibios, los acinos glandulares están rodeados por células mioepiteliales y contienen un solo tipo de células columnares, las

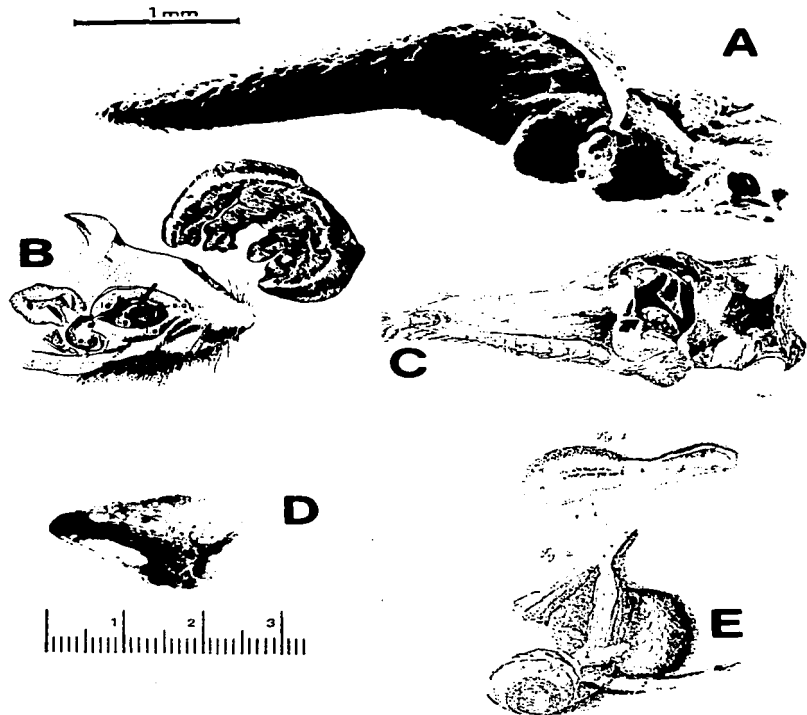


Figura 2. Morfología y localización anatómica de la glándula Harderiana de algunos vertebrados. A, lagartija (Chietti et al.1990) ; B, rata (Venable y Grafflin,1940) ; C, cabra (Miesner,1900) ; D, cerdo (Kulmel,1974) ; E, ciervo (Harder,1694).

cuales muestran una considerable variación en talla (DiMateo *et al.*, 1989). A nivel ultraestructural, las células son piramidales o columnares, con gránulos secretorios usualmente concentrados en el ápice. Además, las células glandulares se caracterizan por la presencia de un retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado (Chieffi *et al.*, 1991) y su secreción es básicamente merocrina o apocrina (Chieffi *et al.*, 1992). En la mayoría de los reptiles estudiados, la GH presenta características histológicas similares. Por ejemplo, en la tortuga *Testudo graeca*, ésta consiste de tubulos de gran lumen, recubiertos de epitelio cuboidal simple; en éste grupo, el modo de secreción es principalmente merocrino (Chieffi *et al.*, 1992). Las GHs de las aves han sido clasificadas en tres tipos principales, de acuerdo a su estructura lobular y a las diferentes clases de células secretoras que conforman los túbulos y acinos (Burns, 1978). Las tipo I (Gallo), se componen de una sola clase de células epiteliales y contienen gran cantidad de células plasmáticas en el intersticio (Bang y Bang, 1968). Las GHs tipo II (Pato), contienen dos tipos de células en el revestimiento epitelial y una población de células plasmáticas mucho menor (Ballantyne y Fourman, 1967). Las tipo III (Cuervo), se consideran glándulas mixtas ya que tienen dos tipos de lóbulos, uno de los cuales es tubular compuesto y el otro, el tubuloalveolar compuesto contiene células plasmáticas (Burns, 1978). En los mamíferos se han descrito una gran variedad de tipos celulares y organelos subcelulares (Sakai, 1981, 1992; Payne, 1994). El número de células epiteliales dentro de una glándula varía de 1 a 3, e invariablemente existen especializaciones intracelulares que hacen, que en cada especie, la GH sea diferente. Así, se han identificado hasta tres formas distintas de células secretoras (tipos I, II y III) en el ratón Australiano *Pseudomys australis* (Johnston *et al.*, 1985). En los gerbos *Meriones meridianus* y *M. unguiculatus*, el epitelio secretor está conformado exclusivamente por células tipo I (Sakai y Yohro, 1981; Johnston *et al.*, 1983), mientras que en conejo, ratón y rata albina (Shirama y Hokano, 1992), éste se conforma de 2 tipos celulares (A y B). Las GHs del delfín *Tursiops truncatus* y del hámster Sirio *Mesocricetus auratus*, son únicas entre los mamíferos debido a que presentan un marcado dimorfismo sexual; en ambas especies la glándula femenina posee únicamente células tipo I, mientras que en los machos contiene dos tipos de células secretoras (Hoffman, 1971; Bodyak y Stepanova, 1994). En la otra especie en la que se han encontrado diferencias asociadas al género,

la glándula femenina es la que contiene dos tipos celulares distintos (Minucci *et al.*, 1989). En el hámster Sirio, los alvéolos harderianos están forrados por una capa simple de células epiteliales. Estas son células de forma piramidal con núcleos de localización basal que presentan dos o mas nucléolos. En la hembra, la GH está conformada por células que contienen numerosas vacuolas lipídicas pequeñas y una gran cantidad de pigmentos café-rojizos, los cuales no se observan normalmente en el macho (Fig. 3). Las células tipo I, presentan además numerosas mitocondrias y un citoplasma rico en retículo endoplásmico rugoso (Woolley y Worley, 1954; Hoffman 1971; Bucana y Nadakavukaren, 1973).

Las células tipo II (exclusivas del macho) contienen relativamente pocos organelos debido a que su citoplasma esta dominado por vacuolas lipídicas grandes; éstas vacuolas son muy prominentes en la región apical y parecen fusionarse al lumen (Fig. 3). A nivel ultraestructural se ha observado la presencia de racimos de túbulos cilíndricos distribuidos al azar en todo el citoplasma. En el macho, aproximadamente un tercio de las células alveolares son de tipo II (Bucana y Nadakavukaren, 1972; Payne *et al.*, 1977; Lin y Nadakavukaren, 1979; Sun y Nadakavukaren, 1980).

En esta especie, las características de la glándula pueden ser revertidas mediante la orquidectomía y/o reemplazo hormonal (McMasters y Hoffman, 1984). En el macho por ejemplo, la castración produce la desaparición gradual de las células tipo II y la acumulación de pigmentos intraglandulares (Hoffman, 1971; Payne *et al.*, 1977). Se ha sugerido que las células tipo II se diferencian a partir de las tipo I por acción de los andrógenos (Rodríguez-Colunga *et al.*, 1993).

Células mioepiteliales

En la GH de prácticamente todas las especies estudiadas se ha documentado la presencia de células mioepiteliales. Éstas se encuentran interpuestas entre la superficie basal de las células epiteliales y la membrana basal que rodea a los túbulos. Se distinguen por presentar dos clases de filamentos (Brownscheidele y Niewenhuis, 1978), y por la distribución de sus mitocondrias hacia la región perinuclear (Strum y Shear, 1982). Se ha sugerido que la función primaria de estas células sería la expulsar o expeler los productos de secreción (Payne, 1994).

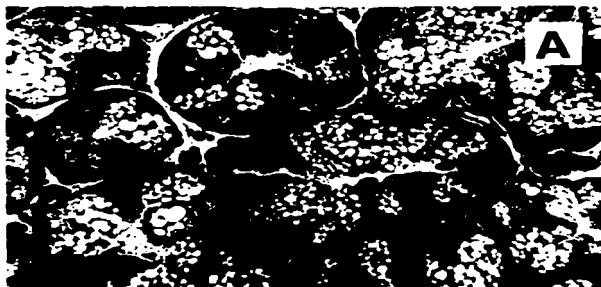


Figura 3. Micrografía de la glándula Harderiana del hámster adulto (*Mesocricetus auratus*). En el macho (A), los alvéolos muestran dos formas diferentes de células secretoras, las células Tipo I presentan numerosas vacuolas pequeñas y núcleos basales con dos o mas nucléolos ; las células Tipo II. se caracterizan por su contenido lipídico almacenado en grandes vacuolas. En la hembra (B), el epitelio glandular esta conformado exclusivamente por células microvacuoladas Tipo I. Notese en este corte la acumulación de pigmentos (Porfirinas) en el lumen de algunos alvéolos (*). Tinción: Azul de Toluidina, 250X. (Cortesía del Dr. H. Merchant, UNAM).

Embriología

En la literatura, los datos sobre éste tema son escasos y la información disponible se limita exclusivamente al desarrollo embrionario de la GH de anfibios. En éste grupo, la glándula se desarrolla a partir del epitelio conjuntival en estadios premetamórficos tardíos. En *Rana esculenta* y *Bufo viridis*, el blastema glandular es formado a partir de un racimo de células, las cuales se organizan mas tarde en un acino circular (DiMateo *et al.*, 1989). El primordio de la glándula en *Rana japonica* es detectable dentro de la órbita en etapas premetamórficas tardías (39-40), o bien en la etapa 42 del desarrollo como es el caso de *Bufo bufo*. En el *Xenopus laevis* por el contrario, la GH no aparece sino hasta el estadio 62 cuando sus tentáculos se han reabsorbido (Shirama *et al.*, 1982). En los reptiles, las aves y los mamíferos, el origen y el desarrollo embrionario de la glándula se desconocen por completo. Payne y cols. (1992) consideran que por analogía es permisible admitir que en los mamíferos, la GH es de origen ectodérmico.

Inervación

En la glándula del conejo y en la de otras especies se han encontrado fibras nerviosas autónomas. En los especímenes examinados, los alvéolos glandulares parecen recibir inervación colinérgica con terminaciones nerviosas, ya sea dentro (conejo y hámster) o cerca de la lamina basal (rata, ratón y gerbo) de las células secretoras. En el hámster, se han encontrado terminaciones nerviosas asociadas a células mioepiteliales, células secretoras y vasos sanguíneos (Bucana y Nadakavukaren, 1972). En la rata, las fibras colinérgicas derivan del ganglio pterigiopalatino y el nervio zigomático, el cual, inerva también a las glándulas lagrimales (Huhtala *et al.*, 1977). También se ha registrado la contribución de fibras del ganglio pterigiopalatino a la glándula del pichón y el ganso, al respecto Fourman y Ballantyne (1967), sugirieron que la inervación colinérgica en el pato podría regular el flujo sanguíneo y por lo tanto su actividad secretora.

En la GH del hámster, rata, ratón y conejo en adición a la colinérgica se ha observado inervación adrenérgica y peptidérgica (Shirama y Hokano, 1992). Tsukahara y Jacobowitz (1987), encontraron reacción positiva para el neuropéptido Y, neurotensina y el polipéptido intestinal vasoactivo. También se ha demostrado la presencia de oxitocina, arginina-vasopresina y neurofisinas en éste tejido (Olcese y Wesche, 1989).

2. Productos de la glándula Harderiana

La GH produce una variedad de secreciones. En términos histoquímicos, se considera que en anfibios su secreción es mucosa aunque también produce algo de lípidos (Paule, 1957). Se dice que en reptiles, como las culebras acuáticas, ésta es seromucosa o bien que produce una secreción oleosa como en lacértidos y cocodrilos (Kennedy, 1970). En las aves es en su mayoría mucosa, pero también se ha observado algo de secreción lipídica. Los lípidos son el producto principal de la GH en los mamíferos y se cree que poseen propiedades bactericidas y lubricantes (Sakai, 1981; Olcese y Wesche, 1989). En general las porfirinas, lípidos e indolaminas se consideran los productos principales de la glándula (Payne, 1994).

Porfirinas

Una de las características más notables de la GH de algunos roedores, es su capacidad para sintetizar y almacenar gran cantidad de protoporfirinas. Este órgano contiene el sistema enzimático completo para sintetizar porfirinas *de novo*, a partir de glicina y succinil CoA (Tomio y Grinstein, 1968). Las porfirinas se han encontrado en la GH de la mayoría de roedores examinados hasta ahora, no obstante su contenido muestra variaciones considerables entre las especies y a menudo, existen también diferencias asociadas al sexo del animal (tabla 2). Se ha observado que en la rata, el hámster y el ratón la glándula Harderiana fluoresce bajo luz ultravioleta, debido a su alto contenido de pigmentos (Grafflin, 1942). En un estudio cuantitativo en el que se midió la cantidad de porfirina sintetizada por homogenados glandulares, se demostró una gran variación en la actividad enzimática, la cual correlacionó a su vez, con el grado de fluorescencia observada (Davidheiser y Figue, 1958).

La aparición de porfirinas intraglandulares varía en las diferentes especies. En la rata por ejemplo, la acumulación es ya evidente en animales de dos semanas y coincide con la apertura del ojo (Wetterberg *et al.*, 1970), mientras que en el hámster, ésta coincide con el inicio de la pubertad (Bucana, 1973). Entre los compuestos principales que se han identificado en la GH se encuentran, la protoporfirina IX, que representa del 85

Tabla 2. Contenido de porfirinas en glándula Harderiana de roedores (nmol/g de tejido \pm D.E.)

ESPECIE	MACHO	HEMBRA
<i>Pseudomys australis</i>	237 \pm 83	1932 \pm 772
<i>Meriones unguiculatus</i>	89 \pm 35	213 \pm 69
<i>Apodemus sylvaticus</i>	61 \pm 22	125 \pm 64
<i>Mesocricetus auratus</i>	42 \pm 9	3300 \pm 302
<i>Mus musculus</i> C3H/HeJ	99 \pm 53	880 \pm 89
<i>Rattus rattus</i> *	45 \pm 8	36 \pm 5
<i>Neotomodon alstoni</i> *	1.0 \pm 0.3	1.0 \pm 0.5

+ = Modificado de Spike et al., 1992

* = Valores expresados en μ g/100 mg de tejido \pm D.E.

al 96% del pigmento total, coproporfirinas (3-15%) y otros que se encuentran en menor proporción como la uroporfirina (1 a 2%), y un derivado tricarbóxico o Harderporfirina, exclusivo de la rata (Kennedy, 1970; Spike et al., 1992).

En preparaciones histológicas, los pigmentos son visibles como acresiones intraluminales solidas, solo cuando la cantidad de éstos es excesiva (ver Fig. 3). Mediante estudios *in vitro*, Thompson y cols. (1984) determinaron la actividad de 7 de las enzimas involucradas en la biosíntesis de la hemina y encontraron un marcado dimorfismo sexual en 5 de ellas, incluyendo la 5-aminolevulinato sintetasa, porfobilinogeno desaminasa, uroporfirin descarboxilasa, coproporfirinogeno oxidasa y porfirinogeno oxigenasa; en todos los casos, la actividad enzimática fue mayor en las hembras. Por el contrario, la actividad de la ferroquelatasa fue casi indetectable y mostró valores similares en la glándula de machos y hembras. Es por esto, que a diferencia de otros órganos porfirinogénicos como el hígado o la suprarrenal, la formación de hemina no se lleva a cabo en la GH y por lo tanto los pigmentos se acumulan en forma de protoporfirina IX.

Hasta ahora se conoce poco de los mecanismos que regulan la acumulación y secreción de porfirinas en la GH. Estudios experimentales han sugerido que los esteroides gonadales, particularmente los andrógenos ejercen un efecto represor sobre su síntesis (Payne *et al.*, 1977, 1979; Vilchis y Pérez-Palacios, 1989). Por otro lado, mucho se ha cuestionado acerca de la función que podrían desempeñar estos pigmentos glandulares. Algunos autores les han asignado un papel fototransductor por su propiedad de absorber la luz ultravioleta y cambiarla al rojo visible (Wetterberg, 1971). Otros como Thiessen (1980), sostienen que los pigmentos esparcidos durante el acicalamiento, oscurecen el pelaje e incrementan la absorción de la radiación solar, elevando así la temperatura corporal; esto es, cumplen una función termorreguladora. Se ha sugerido además, que éstas secreciones podrían actuar como un filtro ocular, protegiendo las células inmunocompetentes, las cuales son afectadas adversamente por los rayos UV (Payne, 1994).

Lípidos

Una de las funciones adscritas a esta glándula es la secreción de una sustancia oleosa, la cual facilitaría el movimiento del parpado (Kennedy, 1970). Los lípidos son productos característicos de la GH en mamíferos, aunque también se han encontrado en aves y anfibios, pero no en reptiles. En los primeros, constituyen entre el 26 y el 35% del peso seco glandular. En muchas especies, los lípidos se almacenan en las células epiteliales en forma de vacuolas secretoras (Fig. 3). La GH representa un caso único de glándula exócrina en donde los lípidos son secretados mayoritariamente por exocitosis (Payne, 1994). Este tejido contiene el complejo enzimático relacionado con la síntesis de lípidos, la acil-CoA ligasa, aciltransferasa y acetil-CoA carboxilasa son ejemplos de enzimas extensamente estudiadas en la GH (Seyama *et al.*, 1992).

El 1-alkil-2,3-diácil-glicerol ha sido identificado como el compuesto principal secretado por la GH de cobayo, ratón y gerbo (Lin y Nadakavukaren, 1981), mientras en la rata las ceras esterificadas son el producto glandular predominante. Adicionalmente, la GH contiene varios tipos de lípidos neutros como mono-, di- y triacilglicerol y colesterol, los cuales se cree no son secretados; también fosfolípidos como la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina, esfingomielina y algunos cerebrosidos (Seyama *et al.*, 1992).

Los lípidos excretados por la GH actúan como lubricantes entre la membrana nictitante y el ojo (Lin y Nadakavukaren, 1982), y al parecer sirven como solventes de feromonas (Sakai, 1981) y otros compuestos biológicamente activos como por ejemplo, ciertos factores de crecimiento (Yokohama *et al.*, 1989). Se ha especulado que en gerbos, los lípidos glandulares podrían desempeñar un papel termorregulador (Thiessen, 1992). En los topos ciegos *Spalax ehrenbergi*, se ha reportado que las descargas de la glándula sirven como atenuantes de la agresividad extrema, típica, de éstos roedores subterráneos (Shanas y Terkel, 1995). En el sapo *Bufo viridis*, la GH de la hembra contiene numerosas vacuolas lipídicas; basados en este hallazgo Minucci y cols. (1989) sugirieron que tales lípidos podrían tener una función feromonal, ya que modifican el comportamiento sexual del macho.

Al igual que las porfirinas e indolaminas, la síntesis y el contenido de lípidos glandulares parecen estar bajo control endócrino. En la rata, los andrógenos y la hormona de crecimiento ejercen un marcado efecto sebotrópico (Ebling *et al.*, 1975). En el hámster dorado, el patrón de ácidos grasos glandulares presenta un marcado dimorfismo sexual (Lin y Nadakavukaren, 1981).

Indolaminas

De acuerdo a Payne (1994), la producción de indolaminas es una característica que la GH comparte con la pineal y la retina. Esto ha llevado a sugerir que podría estar involucrada con mecanismos de fotorrecepción y fototransducción (Wetterberg *et al.*, 1970; Bubenik *et al.*, 1978). Aunque en la actualidad no está completamente esclarecido si tales productos son sintetizados y/o liberados por las células epiteliales, se ha demostrado en varios estudios que el tejido Harderiano, al igual que la pineal, contiene las enzimas necesarias para la formación de N-acetilserotonina y melatonina. Así, la actividad de N-acetiltransferasa (NAT) y de hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) ha sido determinada en glándula de rata (Wetterberg *et al.*, 1970), hámster (Buzzell *et al.*, 1990) y gerbo (Menéndez-Pelaez y Buzzell, 1992).

Se sabe también que la actividad de la HIOMT harderiana, difiere de la enzima pineal, por su gran dependencia a cationes divalentes (Vlahakes y Wurtman, 1972).

La idea de que la GH producía melatonina, se vio reforzada por un estudio de Reiter y

cols. (1983) en donde se demuestra, que las concentraciones intraglandulares de melatonina inmunorreactiva, se incrementan en animales pinealectomizados. Además, un número de estudios inmunohistoquímicos han confirmado la presencia de melatonina en la GH de varias especies (Bubenik *et al.*, 1976; Meusy y Tillet, 1992). En mamíferos y reptiles por ejemplo, ésta se ha localizado preferencialmente en el citoplasma perinuclear de las células secretoras (Vivien-Roels *et al.*, 1981).

Por otro lado, se ha observado que en el hámster sirio, tanto los niveles de melatonina, así como el número de sitios de unión para [¹²⁵I]melatonina, son mayores en la hembra que en el macho (Hoffman *et al.*, 1985 ; Menéndez-Pelaez *et al.*, 1993). Estos últimos autores han sugerido que la melatonina producida por la GH, podría tener un efecto autócrino o parácrino, afectando a su vez los niveles de porfirinas.

3. Función de la glándula Harderiana

El hecho de que esta estructura se encuentre únicamente en los vertebrados terrestres ha llevado a la aceptación casi generalizada de que la GH evolucionó en paralelo con la glándula lagrimal a fin de lubricar y humedecer la cornea y la nasofaringe (Kennedy, 1970; Sakai, 1981; Payne, 1994). Sin embargo, su función parece ir mas allá de la simple lubricación ocular ya que su actividad guarda una estrecha relación con múltiples procesos fisiológicos (Olcese & Wesche, 1989). Así, se ha sugerido que la glándula podría funcionar como un órgano fototransductor y/o fotoprotector siendo parte de un eje entre la retina-la pineal-y la gónada (Wetterberg *et al.*, 1970a,b; Wetterberg, 1974). La glándula parece estar también relacionada con mecanismos inmunológicos locales (Burns, 1978,1992), y con la formación de feromonas (Payne *et al.*, 1977; Payne, 1979) y otras sustancias atenuantes de agresividad (Shanas & Terkel, 1995). Se ha especulado además que podría ser una fuente importante de factores de crecimiento (Yokohama *et al.*, 1989), de lípidos termorreguladores (Thiessen, 1980) y de saliva (Payne, 1994). El papel mediador de la GH en la función reproductiva (Reiter & Klein, 1971), el balance hídrico (Kennedy, 1970) y la osmorregulación (Thiessen, 1992), también ha sido planteado.

4. Hormonas y glándula Harderiana

No obstante que en los últimos años se han acumulado numerosas evidencias que sugieren la participación de diversas hormonas en el control de la glándula Harderiana, aun existe gran controversia respecto a los factores endócrinos y mecanismos involucrados en su regulación. La información disponible indica que las hormonas de origen tiroideo, hipofisiario y gonadal pueden alterar la morfología y la actividad secretora de la glándula.

En 1953, Christensen y Dam, reportaron que la GH del hámster exhibía un marcado dimorfismo sexual en términos de pigmentación. Posteriormente Woolley y Worley (1954) extendieron estas observaciones y demostraron que las glándulas del macho castrado, presentaban características similares a las encontradas en la hembra. En ese estudio los autores mostraron además que las hembras tratadas con compuestos "androgénicos" desarrollaban glándulas tipo macho. Tales observaciones fueron confirmadas por Hoffman (1971) y Payne y cols. (1977), así como por Lin y Nadakavukaren (1979) quienes demostraron cambios a nivel ultraestructural.

En 1954 Boas y Bates examinaron el papel de la hipófisis y de la tiroides en el mantenimiento de la GH. En ese estudio los autores concluyeron que tanto la hipofisectomía como la tiroidectomía llevaba a la atrofia glandular, mientras que la adrenalectomía y/o la castración no alteraban significativamente ni el peso ni la composición de la glándula. En un reporte similar, Lorincz y Lancaster (1957) informaron que la administración de una preparación "sebotrópica" (en combinación con progesterona, somatotropina o bien con "tirotropina") a ratas hipofisectomizadas y castradas no inducía cambios significativos en el peso de la GH, pero si en otros tejidos como la glándula prepuccial y sebácea.

En un estudio cuantitativo en el que se comparó la producción de porfirinas en hígado y GH de ratas hipofisectomizadas Figge y Davidheiser (1960) concluyen que la hipófisis prácticamente no tiene influencia sobre esta actividad glandular. Sin embargo, en reportes

subsecuentes estos hallazgos no pudieron ser reconfirmados del todo. Así, Ebling y cols. (1975a), observaron que la hipofisectomía, pero no la castración, alteraba considerablemente el peso glandular de la rata. También observaron que la administración simultánea de hormona de crecimiento + testosterona (T), o bien de hormona estimulante de los melanocitos + T, a animales hipofisectomizados y castrados restauraba solo en forma parcial el peso de este tejido (Ebling *et al.*, 1975a,b).

En 1973, Brooksbank y cols. reportaron la retención selectiva de la delta-16-androstadienona-[³H] por la GH de ratas castradas, se observó que la acumulación de esta feromona era inclusive mayor que en la hipófisis, próstata o glándula prepuccial. Así mismo mediante estudios autoradiográficos se ha demostrado la captación de estradiol radiactivo en acinos glandulares de armadillo (Weaker *et al.*, 1983).

En 1972 Winand y Kohn demostraron la unión específica de tirotropina tritiada [³H-TSH] a preparaciones membranales de GH de cobayo. Posteriormente se demostró que las hormonas tiroideas eran capaces de modificar tanto el peso como las características morfológicas de la glándula del hámster (Hoffman *et al.*, 1979a,b).

Por otro lado Wetterberg y cols. (1970c), informaron que en ratas recién nacidas, la administración de tiroxina adelantaba la aparición de porfirinas en la glándula, mientras que el tratamiento con cortisol producía un efecto opuesto. Estos mismos autores informaron que en la rata adulta, la ovariectomía provoca una disminución significativa del contenido de porfirinas y que la administración de estradiol, propionato de testosterona o progesterona a ratas ovariectomizadas no modifica la concentración de pigmentos intraglandulares (Ulrich *et al.*, 1974).

Al respecto, se ha visto que el tratamiento prolongado con progestinas sintéticas no induce alteraciones visibles en la glándula de la rata (Maiti y Sahu, 1981). Otros informes indican que la progesterona natural tampoco modifica las concentraciones de pigmentos en la rata ovariectomizada pero sí en el ratón ovariectomizado y adrenalectomizado (Shirama *et al.*, 1981, 1987).

Además, se ha observado que en las hembras el contenido intraglandular de porfirinas varía considerablemente a lo largo del ciclo estral (Shirama *et al.*, 1981) y que su nivel máximo se alcanza durante el estro y en la gestación (Payne *et al.*, 1979).

En los machos, la castración induce cambios no solo morfológicas sino también a nivel metabólico y ultraestructural. Se ha visto por ejemplo que la castración incrementa las concentraciones intraglandulares de melatonina (Hoffman *et al.*, 1985), somatostatina inmunorreactiva (Puig-Domingo *et al.*, 1988) y protoporfirinas (Payne *et al.*, 1977; Shirama *et al.*, 1981, 1987). Incrementa además el número de sitios de unión para dihidropiridinas (Kumar *et al.*, 1992), receptores β -adrenérgicos (Pangerl *et al.*, 1989) y melatonina (Menéndez-Pelaez *et al.*, 1993).

De igual forma se han informado un número de características dimórficas asociadas al género que incluyen; diferencias en el patrón de secreción (Feria-Velasco *et al.*, 1983) en el número de células cebadas (Payne *et al.*, 1982; Menéndez-Pelaez *et al.*, 1992), diferencias en la estructura fina de las células acinares (Lin y Nadakavukaren, 1979; Sun y Nadakavukaren, 1980), en el contenido de metales (Hoffman y Jones, 1981), lípidos (Lin y Nadakavukaren, 1981) y proteínas (Hoh *et al.*, 1984) así como en la actividad de varias enzimas glandulares (Thompson *et al.*, 1984; Menéndez-Pelaez *et al.*, 1988; Buzzell *et al.*, 1990).

Adicionalmente se ha informado que la remoción de la GH o hardierianectomía causa agrandamiento del útero (Reiter y Klein, 1971), reduce la concentración de melatonina intrapineal (Panke *et al.*, 1979) y modifica los niveles circulantes de tiroxina y triiodotironina (Hoffman *et al.*, 1989a,b).

5. Mecanismo de acción de las hormonas esteroides

Una vez sintetizadas por los órganos esteroidogénicos, las hormonas esteroides son transportadas a los tejidos blanco por globulinas acarreadoras, y debido a sus propiedades lipofílicas pueden atravesar la bicapa lipídica de la membrana celular (Yamamoto, 1995). Las hormonas esteroides (andrógenos, estrógenos, progestágenos, glucocorticoides y mineralocorticoides), son considerados como una clase de mensajeros intracelulares que regulan numerosas respuestas fisiológicas (crecimiento, diferenciación celular), por interaccionar con receptores intracelulares de alta afinidad. La formación del complejo hormona-receptor (Fig.4), representa el paso inicial en la acción de los esteroides (Evans, 1988; Truss y Beato, 1993).

La unión del receptor con su ligando, provoca la disociación de proteínas de choque térmico (heat shock proteins) e induce cambios conformacionales en el receptor que facilitan el transporte nuclear (translocación), la formación de heterodímeros (dimerización), y la interacción con segmentos del ADN, dando como resultado la regulación génica (Truss y Beato, 1993; Mangelsdorf *et al.*, 1995).

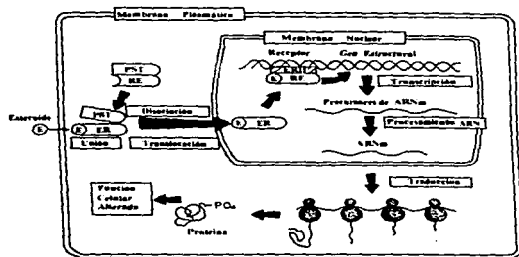


Figura 4

Los receptores para glucocorticoides, estrógenos, progestinas, andrógenos y mineralocorticoides, pertenecen a una familia de proteínas que se unen al ADN y que incluye también a los receptores para hormonas tiroideas, vitamina D y ácido retinoico (Lubahn *et al.*, 1989; French *et al.*, 1990).

En términos generales, los receptores de hormonas esteroideas (RHEs) son proteínas nucleares que funcionan a manera de factores de transcripción ligando-dependientes. Los RHEs, activan o inducen la transcripción de genes mediante su unión a secuencias específicas del ADN conocidas como elementos de respuesta hormonal (HRE por sus siglas en Inglés) o ERH (Marschke *et al.*, 1995).

Los RHEs tienen una estructura modular, definida por sus dominios funcionales (Green y Chambon, 1987). Un dominio de unión al ADN (DUA), el cual es similar en todos los miembros de ésta subfamilia de transactivadores (Fig 5), se localiza en la región central y está compuesto por dos dedos de zinc, que son hélices coordinadas mediante cuatro cisteínas a un átomo de zinc (Marschke *et al.*, 1995). La variación en los aminoácidos, dentro del DUA determina la especificidad por los ERH, en particular dos aminoácidos de la caja P localizados hacia el lado carboxilo del primer dedo de zinc. Por lo tanto, el DUA media el reconocimiento específico por los ERH (Mangelsdorf *et al.*, 1995). Los ERH, son secuencias palindrómicas de 15 bases (5'-A/GGNACAnnnTGTNCT-3'), dispuestas en dos sitios medios de 6 pares de bases que se unen por un espaciador de 3 pares de bases (Marschke *et al.*, 1995).

La porción carboxilo-terminal del receptor, abarca el dominio de unión al esteroide (DUE), el cual posee la propiedad esencial de reconocimiento del ligando, y asegura la especificidad y selectividad de la respuesta fisiológica. El DUE se considera como el "switch" molecular, que, después de la unión de la hormona, transforma al receptor a un estado activo. Mediante estudios de mutagénesis, se ha podido establecer que los sitios involucrados en la dimerización de los receptores, se localizan tanto en el DUA como en el DUE (Simental *et al.*, 1991). El dominio amino-terminal (A), es la región mas grande de los RHEs codificada por un solo exón. Su secuencia es la menos conservada entre los diferentes receptores y es la mas variable en talla (Fig 5). Esta región parece contribuir a la estructura tridimensional del receptor, a través de su interacción con otras regiones de la proteína.

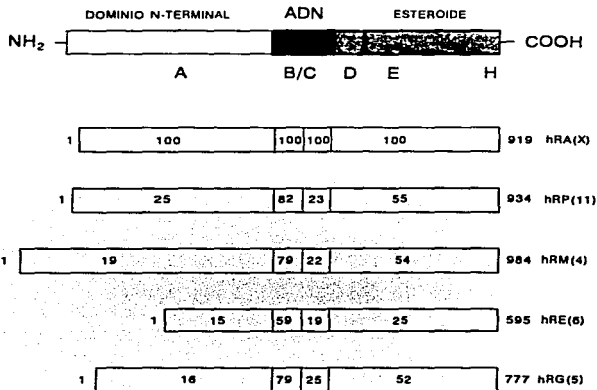


Figura 5. Representación esquemática de la estructura de los receptores a hormonas esteroides. En la parte superior se presentan los principales dominios funcionales del receptor: la región amino-terminal y los dominios de unión al ADN y al esteroide. Los exones que codifican para cada segmento están indicados por las letras A-H. Los números dentro de los rectángulos, muestran la homología de secuencia (a.a.) que existe en los diferentes dominios, cuando se comparan con los del receptor de andrógenos (=100%). Entre paréntesis está indicado el cromosoma (humano) en donde se localiza el gen de cada receptor. Los números de la derecha, indican los residuos de aminoácidos que conforman cada proteína, según lo reportado originalmente: **HRA**, receptor de andrógenos (Lubahn et al., 1988); **HRP**, receptor de progesterona (Misrahi et al., 1987); **HRM**, receptor de mineralocorticoides (Arriza et al., 1987); **HRE**, receptor de estrógenos (Green et al., 1986); **HRG**, receptor de glucocorticoides (Hollenberg et al., 1985).

En la región amino terminal del receptor se han detectado al menos dos regiones esenciales para la activación transcripcional. En algunos receptores se ha identificado además, un dominio en el extremo 5' del exón 4 que exhibe una baja homología de secuencia. Por su localización entre el DUA y el DUE se le conoce como región bisagra (Hinge región). Este dominio contiene una secuencia bipartita, compuesta por varios residuos de aminoácidos básicos (Arg-Lys-Lys-Leu-Lys) que le confieren las propiedades de un signo o señal de localización nuclear (Silver, 1991; Nigg *et al.*, 1991). Estudios inmunohistoquímicos y de mutagénesis dirigida, han sugerido que éste dominio media la transferencia del receptor, del citoplasma hacia su sitio de acción en el núcleo (Picard y Yamamoto, 1987; Guiochon *et al.*, 1989; Simental *et al.*, 1991). En todos los casos, la presencia del esteroide es requerida para la activación, fosforilación y el importe nuclear del receptor. Así mismo, los receptores de esteroides presentan mecanismos de regulación autólogos (Truss y Beato, 1993; Mangelsdorf *et al.*, 1995).

Receptor de Andrógenos (RA). La testosterona (4-androsten,17 β -hidroxi-3-ona; T) y la 5 α -dihidrotestosterona (5 α -androstan,17 β -hidroxi-3-ona; DHT) se consideran los ligandos naturales del RA. Ambos ejercen sus efectos hormonales a través del mismo receptor. El RA es un gen de copia simple, cuyo locus se localiza en la región q11-13 del cromosoma X (en el humano), abarcando entre 75 y 90 kilobases (kb) del ADN genómico (French *et al.*, 1990). El gen tiene un marco de lectura de 2757 pares de bases que codifican para una proteína de 919 aminoácidos (a.a.) y 98 227 Da en talla (Lubahn *et al.*, 1988, 1989). Estructuralmente está conformado por 8 exones (A-H), separados por intrones de hasta 26 kb (Quigley *et al.*, 1995). La identificación y clonación del ADN complementario (ADNc) del RA, ha permitido conocer su secuencia de aminoácidos y su estructura funcional, a la fecha, solo se conoce el ADNc de rata, ratón y humano (Lubahn *et al.*, 1988; Tan *et al.*, 1989).

Receptor de estrógenos (RE). El estradiol-17 β (1,3,5[10]-estratrien-3 β ,17 β -diol) es el estrógeno biológicamente activo en la mayoría de las especies, y representa el ligando natural para el RE. El RE es una proteína monomérica de 66182 Da y 595 aminoácidos.

El gen del RE esta localizado en el cromosoma 6 y su estructura funcional comprende 8 exones (Walter *et al.*, 1985). El RE es el de menor talla entre los RHEs por lo que se le considera como una protefna constitutivamente nuclear (Green y Chambon, 1988).

Receptor de progesterona (RP). La progesterona (4-pregnen-3,20-diona), es el principal esteroide natural de origen ovárico que se une al RP. En el humano, el gen del RP se localiza en el cromosoma 11 y codifica para una protefna de 934 a.a. (Misrahi *et al.*, 1987). El RP es el único entre los RHEs que exhibe dos formas; A y B, cuyo peso molecular deducido a partir de la secuencia de sus ADN complementarios, es de 86 y 72 kDa en el pollo, y de 98 y 86 kDa en el humano (Carson-Jurica *et al.*, 1990). Se ha mostrado que ambas proteínas (A y B), son sintetizadas a partir del mismo ARN mensajero, el cual contiene dos codones de iniciación (AUG) alternos (Conneely *et al.*, 1989). En contraparte, el RP del conejo exhibe al parecer una sola forma (Misrahi *et al.*, 1988).

Receptor de glucocorticoides (RG). A partir de ensayos experimentales clásicos, los corticoesteroides fueron clasificados, como glucocorticoides; por su efecto sobre la captación de glucógeno hepático y como mineralocorticoides, por su efecto sobre la regulación de electrólitos renales (Arriza *et al.*, 1987). El cortisol ó hidrocortisona (4-pregnen-11 β ,17 β ,21-triol-3,20-diona) es el ligando natural que el RG reconoce con mayor especificidad. El RG (humano), es una protefna de 777 a.a., codificada por un gen del cromosoma 5 (Evans, 1988). Su ADNc fue el primero en ser clonado (Hollenberg *et al.*, 1985) y es tal vez, el RHEs mas estudiado a la fecha (Mangelsdorf *et al.*, 1995).

Receptor de mineralocorticoides (RM). La aldosterona (11 β ,21-dihidroxi-4-pregnen-18 α -3,20-diona; ALD) es el esteroide adrenal con mayor actividad mineralocorticoide y representa el ligando natural del RM. Los efectos mas conocidos de la ALD, son la promoción de la retención de sodio por el riñon, y la regulación del balance hídrico en el intestino. El gen del RM (humano) está localizado en el cromosoma 4 y codifica para una protefna de 984 aminoácidos con un peso molecular estimado en 107 kDa (Arriza *et al.*, 1987).

IV. OBJETIVO DEL ESTUDIO

Está bien establecido que las hormonas esteroides regulan un gran número de actividades biológicas modulando la expresión génica. La habilidad para responder a los esteroides se ha atribuido exclusivamente a la presencia de receptores funcionales. Varias líneas de investigación han señalado que la glándula Harderiana es influenciada por estos compuestos. Por consiguiente la identificación de receptores específicos resulta de particular relevancia para comprender parte de los mecanismos que intervienen en su regulación.

En este trabajo se presentan los resultados de estudios de saturación al equilibrio, análisis inmunohistoquímico y reemplazo hormonal, realizados con el propósito de establecer la presencia de receptores para hormonas esteroides en la glándula Harderiana de los vertebrados. Se presenta además el estudio de la 5α -esteroide reductasa en la glándula del hámster como una evidencia de regulación génica mediada por receptores.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Animales. Para este estudio se utilizaron tejidos obtenidos de especies representativas de los diferentes grupos de vertebrados, incluyendo roedores, aves y reptiles. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones controladas de luz/oscuridad y temperatura y con libre acceso a alimento y agua. En algunos casos los animales fueron sometidos a tratamiento quirúrgico y/o farmacológico a fin de modificar su condición endócrina. En otros, se trabajó con especímenes disponibles sin tratamiento alguno.

Material. Para el estudio de las características fisicoquímicas de los diferentes receptores, se usaron esteroides naturales y sintéticos marcados con tritio y de alta actividad específica. Dimetilnortestosterona [17α -(metil- ^3H)]DMNT (mibolerona), a.e. 1.15 TBq/mmol; 17β -estradiol [$2,4,6,7$ - ^3H] E₂, a.e. 3.4 TBq/mmol; [6,7- ^3H] ORG2058, a.e. 2.11 TBq/mmol; testosterona [$1,2,6,7$ - ^3H] T, a.e. 3.89 TBq/mmol; [6,7- ^3H] dexametasona, a.e. 1.84 TBq/mmol, se obtuvieron de Amersham Bucks (Reino Unido) o New England Nuclear (Boston, U.S.A). En la mayoría de los casos, los compuestos, reactivos y solventes utilizados fueron de grado analítico. Los esteroides no marcados se purificaron mediante recrystalizaciones sucesivas en metanol.

Análisis de unión

En forma general: se analizaron las características de unión de los receptores de andrógenos, estrógenos, progestágenos y glucocorticoides en preparaciones subcelulares de glándula Harderiana de varias especies. Se realizaron estudios de saturación al equilibrio, incubando la fracción soluble celular con diferentes concentraciones de radioligando (10^{-6} - 10^{-9} M), en presencia o ausencia de compuestos no marcados. Los resultados se analizaron por el método de Eadie-Hofstee o bien por el método Scatchard para obtener su constante de disociación (Kd) así como el número de sitios de unión o B_{max} (Zivin y Waud, 1982).

La especificidad de unión para cada receptor se determinó mediante ensayos de competencia, incubando alícuotas de citosol con el radioligando a concentraciones saturantes, en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de compuestos no

marcados radiactivamente. En cada caso se probaron al menos seis esteroides de estructura química diferente y cuatro concentraciones de competidor (1-500 nmol/l). Los resultados se graficaron como el porcentaje de desplazamiento específico (del esteroide [³H]) contra la concentración de competidor que se requiere para inhibir el 50% de la unión total (Liao *et al.*, 1973).

Para determinar la velocidad de **sedimentación** de los receptores de esteroides se incubaron alícuotas de citosol con el correspondiente radioligando [³H]-DMNT, [³H]-E₂, [³H]-ORG2058, [³H]-dexametasona, a concentraciones saturantes (2-4 nmol/l). Los incubados se aplicaron sobre gradientes lineales de sacarosa 20-35% y se centrifugaron a 370 000X g por 2-4 h a 4°C. El coeficiente de sedimentación (S) de los complejos [³H]-hormona-receptor se determinó, mediante el uso de marcadores externos corridos en paralelo (Kouvonen *et al.*, 1978).

Para determinar la **localización** celular del receptor de andrógenos (RA) se realizaron estudios inmunohistoquímicos usando secciones de tejidos congelados y anticuerpos policlonales anti-RA. Se examinaron preparaciones obtenidas de dos especies cuya glándula exhibe alta (hamster) y moderada (rata) sensibilidad hormonal. La visualización de los receptores se llevó a cabo mediante la inmunotinción del anticuerpo primario con el sistema avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain, Vector Labs., U.S.A.), usando diaminobenzidina como cromógeno (Sar, 1985).

La actividad de la 5 α -reductasa se determinó por métodos estándar (Bruchovsky y Wilson, 1968), mediante la conversión de testosterona-[³H] a 5 α -dihidrotestosterona y otros metabolitos 5 α reducidos. La actividad enzimática se examinó en homogenados glandulares de hámsters adultos de ambos sexos, intactos o gonadectomizados y tratados con diferentes andrógenos. Los resultados se analizaron por el método de Michaelis-Menten y/o Eadie-Hofstee (Zivin y Waud, 1982).

Los métodos y técnicas utilizadas se describen en detalle en la sección correspondiente de Resultados.

VI. RESULTADOS

Steroid hormone receptors and the sexual phenotype of the Harderian gland in hamsters

F. Vilchis and G. Pérez-Palacios

Department of Reproductive Biology, National Institute of Nutrition, Salvador Zubiran, Calle Vasco de Quiroga 15, Delegación Tlalpan, 14000 Mexico City, Mexico

RECEIVED 1 June 1988

ABSTRACT

To investigate the participation of intracellular steroid hormone receptors in the sexual transformation process of the Harderian gland, a series of experiments were undertaken in adult golden hamsters. The *in vitro* labelling of cytosolic steroid-binding sites with appropriate radioligands revealed the presence of androgen, oestrogen and glucocorticoid but not progestin receptors in the glands from animals of both sexes. The androgen receptor of the female gland was further characterized because it was found to be the predominant intracellular steroid receptor. Studies of binding kinetics using [³H]7 α ,17 α -dimethyl-17 β -hydroxy-4-oestren-3-one (DMNT) as ligand, demonstrated a high affinity androgen-binding site with an apparent dissociation constant (K_d) of 0.7 nmol/l and maximal saturation binding capacity of 84.0 \pm 3.0 (S.D.) fmol/mg protein. Specificity of the androgen receptor was assessed by displacement analysis; DMNT,

5 α -dihydrotestosterone, testosterone and 3 α -androstenediol were efficient competitors for the androgen-binding site, while oestradiol-17 β , progesterone and dexamethasone exhibited very little, if any, competitive potency. The sedimentation coefficient of the androgen receptor in sucrose density gradients was 8–9S. These data indicate that the physicochemical characteristics of the androgen receptor from the female gland are similar to those previously described in the male gland. The striking observation of a complete lack of oestrogen-inducible and oestrogen-insensitive progestin receptors in glands *in vitro*, even after stimulation with cholera toxin, adds further support to the concept that the androgen receptor is the key molecule mediating the hormone-induced sexual transformation of the Harderian gland in this species. *Journal of Endocrinology* (1989) **121**, 149–156

INTRODUCTION

Evidence has been accumulated which suggests that the sexual dimorphism of the Harderian gland in the golden hamster is regulated by hormones (Christensen & Dam, 1953; Hoffman, 1971; McMasters & Hoffman, 1984). The definitive cellular pattern of the gland is settled during week 4 after birth (Bucana & Nadakavukaren, 1973) and thereafter clear differences between male and female glands can be recognized; two forms of alveolar cells (types I and II) being found normally in adult male glands, while the female gland possesses a single class of cells (type I) and a high content of porphyrins (Hoffman, 1971; Payne, McGadey, Moore & Thompson, 1977). Furthermore, sexual differences in the activity of several enzymes involved in porphyrin biosynthesis (Thompson, Hordovatz, Moore *et al.* 1984) as well as in the concentrations of intraglandular immunoreactive melatonin (Hoffman, Johnson & Reiter, 1985) have

been documented. Differences in the number of mast cells in the gland (Payne, McGadey, Johnston *et al.* 1982) and in the concentrations of some metals, lipids and non-enzyme proteins have also been reported in the hamster (Hoffman & Jones, 1981; Hoh, Lin & Nadakavukaren, 1984). Various experimental studies have demonstrated that the Harderian gland is under gonadal and pineal regulation (Clabough & Norvell, 1973; McMasters & Hoffman, 1984; Hoffman *et al.* 1985), and the existence of a retinal-pineal-Harderian gland-gonadal axis has also been documented (Wetterberg, Geller & Yuwiler, 1970; Wetterberg, Yuwiler, Ulrich *et al.* 1970). In accordance with this proposal the gonadal steroids are essential for the biological expression of sexual dimorphism of this intraorbital glandular structure. To investigate whether intracellular steroid receptors mediate the phenotypic development of the Harderian gland, we studied steroid-receptor interactions in glands of gonadectomized adult males. Further impetus for

this study was furnished by our previous demonstration of a high-affinity, low-capacity, specific 8-9 S androgen receptor in the male Harderian gland (Vilchis, Hernández, Pérez & Pérez-Palacios, 1987).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Dimethylnortestosterone (17 α ,17 β -dimethyl-17 β -hydroxy-4-oestren-3-one; DMNT), 5 α -dihydroxytestosterone (17 β -hydroxy-5 α -androstane-3-one; DHT), 3 α -androstenediol (5 α -androstane-3 α ,17 β -diol), 3 β -androstenediol (5 α -androstane-3 β ,17 β -diol), androstenedione (4 α -androstene-3,17-dione), oestradiol-17 β (1,3,5(10)-oestratriene-3,17 β -diol), ORG 2058 (16 α -ethyl-21-hydroxy-19-nor-4-pregnene-3,20-dione) and dexamethasone (9 α -fluoro-16 α -methyl-11 β ,17 α ,21-trihydroxy-1,4-pregnenedione-3,20-dione), were obtained from Amersham International plc (Amersham, Bucks, U.K.), Sieraloids Inc. (Wilton, NH, U.S.A.) and Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, U.S.A.). Non-radioactive steroids were purified by crystallizations from methanol. [17 α -methyl-³H]DMNT (3.15 TBq/mmol), [2,4,6,7-³H]oestradiol (3.40 TBq/mmol), [6,7-³H]ORG 2058 (1.67 TBq/mmol) and [6,7-³H]dexamethasone (1.84 TBq/mmol) were purchased from Amersham International plc and New England Nuclear (Boston, MA, U.S.A.). The radiochemical purity of the steroids was verified by paper or thin-layer chromatography as reported by Chávez, Vilchis, Pérez *et al.* (1985). Cholera toxin from *Vibrio cholerae* was obtained from Sigma Chemical Co.

Animals

Adult female and male hamsters (*Mesocricetus auratus*), weighing 100–120 g, were maintained under a 14 h light:10 h darkness cycle. Water and food pellets were available *ad libitum*. All animals were ovariectomized or orchidectomized under ether anaesthesia 3–5 days before experiments. When required they were adrenalectomized and maintained with 0.9% (w/v) NaCl.

Animals were killed by decapitation and the tissues immediately removed and placed on ice-cold buffer. All subsequent procedures were carried out at 4 °C.

Cytosol preparations

The Harderian glands, anterior pituitaries and uteri were homogenized in TEDMG buffer: Tris-HCl (20 mmol/l, pH 7.4) containing EDTA (1.5 mmol/l), dithiothreitol (0.25 mmol/l), sodium molybdate (10 mmol/l) and 10% (v/v) glycerol, as described previously (Vilchis, Chávez, Pérez *et al.* 1986; Vilchis *et al.* 1987). Tissue homogenates were centrifuged at

105 000 g for 1 h at 4 °C. The cytosol fractions were obtained and used immediately. Protein content of the cytosol fractions was determined by the method of Bradford (1976).

Binding studies

Aliquots of Harderian gland cytosol (0.1 ml) from ovariectomized hamsters were incubated with a range of concentrations of [³H]DMNT dissolved in TEDMG buffer (0.1 ml), final [³H]DMNT concentrations, 0.1–10.0 nmol/l for 18 h at 2–4 °C. Non-specific binding was determined in parallel incubations containing a 100-fold excess of unlabelled DMNT. Bound and free steroids were separated by the addition of dextran-coated charcoal suspension (250 mg norit-A (Pfanstiehl Chemical Co., Waukegan, IL, U.S.A.) and 25 mg dextran T-70 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) in 100 ml TEDMG buffer) and incubated for 10 min at 4 °C with continuous shaking, as described previously (Chávez *et al.* 1985). Following centrifugation at 800 g for 10 min, aliquots of the supernatants were assayed for radioactivity. Results were analysed by the method of Scatchard (1949).

Specificity of the Harderian gland cytosol [³H]DMNT binding

Aliquots of Harderian gland cytosol (0.1 ml) from ovariectomized hamsters were incubated with [³H]DMNT alone, or in the presence of a wide range of concentrations of various unlabelled steroids dissolved in TEDMG buffer (0.1 ml). Final [³H]DMNT concentrations in the incubates was 1.5 nmol/l, while unlabelled steroid concentrations ranged from 5 to 250 nmol/l. Bound and free steroid fractions were separated as described above. Radioactivity was determined in a Packard Tri-Carb model 2660 liquid scintillation spectrometer with a counting efficiency for ³H of 40%; quenching was corrected in all samples by external standardization.

Sedimentation profile of ³H-labelled steroid-receptor complexes of the Harderian gland

The sedimentation patterns of the steroid receptor complexes were assessed by the use of linear sucrose gradient centrifugation. In all cases, aliquots of Harderian gland cytosol were incubated overnight *in vitro* with appropriate radioligands at saturating concentrations in TEDMG buffer. At the end of the incubation period, samples of incubates were treated with dextran-coated charcoal for 10 min, applied on the top of low salt, linear sucrose gradients (20–35%) prepared in TEDMG buffer, pH 7.4 and centrifuged at 370 000 g for 2.5 h in a vertical (Vti 65) rotor (Beckman Instruments). Fractions were collected by

tube puncture and radioactivity was counted. Control gradients containing bovine serum albumin (BSA), naphthol blue black as marker were run in parallel (Kouvoonen, Petterson & Lovgren, 1978).

Androgen receptor

[³H]DMNT (1–2 nmol/l) was used as the radioligand in the incubation of female Harderian gland cytosol (7.0–8.0 mg protein/ml) from ovariectomized animals. Non-specific binding was determined by the addition of an excess (100-fold) of radioinert DMNT.

Progesterin receptor

Oestrogen-induced and oestrogen-insensitive progesterin-specific binding sites were studied in the soluble fraction of Harderian glands from male and female animals. Before experiments gonadectomized hamsters were treated with oestradiol benzoate (10 µg/day for 3 consecutive days; s.c.), vehicle (corn oil; s.c.) or cholera toxin (10 µg/day for 3 consecutive days; i.p.). Aliquots (0.5 ml) of Harderian gland were incubated overnight with saturating concentrations of [³H]ORG 2058 at 4 °C and submitted to linear sucrose gradient centrifugation. For comparative purposes the progesterin receptor of the uterine cytosol from ovariectomized oestradiol benzoate-treated animals was also labelled with [³H]ORG 2058. The addition of a 100-fold excess of unlabelled ORG 2058 was used to determine non-specific binding.

Oestrogen and glucocorticoid receptors

Oestrogen-specific binding sites were studied in the Harderian gland and anterior pituitary gland of male and female gonadectomized hamsters using [³H]oestradiol as radioligand. The sedimentation profiles of labelled glucocorticoid-receptor complexes were examined in Harderian gland cytosols from male and female animals which were gonadectomized or adrenalectomized 5 days before the experiments. [³H]Dexamethasone was used as radioligand.

RESULTS

Androgen receptor

The results of studies on binding kinetics revealed the presence of a high-affinity, low-capacity specific androgen-binding site in the Harderian gland of the female golden hamster. Figure 1 shows a representative saturation curve of [³H]DMNT-specific binding in the Harderian gland cytosol. Scatchard analysis of the data from three experiments indicates that the high-affinity binding component exhibited an equilibrium dissociation constant (K_d) of 0.7 ± 0.1 (s.d.) nmol/l, and a maximal binding capacity of

84.0 ± 3.0 fmol/mg cytosol protein (mean values \pm s.d.). The effects of increasing concentrations of non-radioactive natural and synthetic steroids on the [³H]DMNT specific binding to androgen receptors from Harderian glands are shown in Fig. 2. Sa-DHT and DMNT were the most potent competitors, followed by testosterone and 3 α -androstenediol, whereas 3 β -androstenediol, progesterone, androstenedione, oestradiol-17 β , dehydroepiandrosterone and dexamethasone exhibited very little, if any, competitive potency. The synthetic progesterin ORG 2058 and the non-steroidal hormone melatonin did not compete (data not shown).

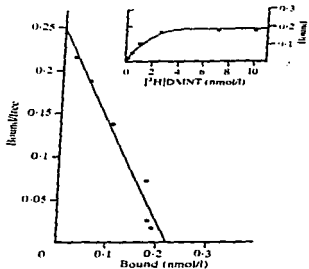


FIGURE 1. Representative Scatchard plot and saturation analysis of specific androgen binding in the Harderian gland from gonadectomized hamsters. Cytosol samples (2.7 mg protein/ml) were incubated in triplicate with [³H]7 α -dimethyl-17 β -hydroxy-5 α -oestren-3-one (DMNT; 0.1–10.0 nmol/l), in the presence or absence of a 100-fold excess of radioinert DMNT. Specific binding was calculated by subtracting non-specific binding from total binding. The saturation curve is shown in the inset. The apparent affinity of the androgen receptor in the female gland is 0.7 nmol/l.

The sedimentation behaviour of the radioactive labelled Harderian gland cytosolic androgen receptor in linear sucrose gradients is depicted in Fig. 3. In the presence of sodium molybdate (10 mmol/l), the stabilized [³H]DMNT-receptors complexes sedimented at 8–9 S. As shown in Fig. 3, the addition to incubates of a 100-fold excess of DMNT completely abolished

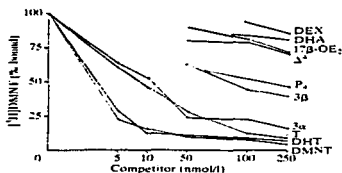


FIGURE 2. Steroid-binding specificity of the androgen receptor in the Harderian gland of the female golden hamster. Cytosol samples (0.1 ml) from ovariectomized hamsters were incubated for 18 h at 4 °C with [3 H]7 α ,17 β -dimethyl-17 β -hydroxy-4-oestren-3-one (DMNT; 1.5 nmol/l), alone or with increasing concentrations of the unlabelled steroids indicated: DEX, dexamethasone; DHT, 5 α -dihydrotestosterone; T, testosterone; 3 α , 3 α -androstenediol; 3 β , 3 β -androstenediol; 17 β -OE $_2$, oestradiol-17 β ; P $_4$, progesterone; Δ^4 , androstenedione; DHA, dehydroepiandrosterone; DEX, dexamethasone. The unbound fraction was removed by dextran-coated charcoal treatment. Total [3 H]DMNT binding in the absence of competitor was set at 100%. Each point represents the mean of two experiments in triplicate.

androgen receptor labelling in the female Harderian gland.

Progestin-binding sites

Since androgens may exert their cellular and biochemical effects through progestin receptors in a number of mammalian structures it was of interest to evaluate the presence and characteristics of the progestin receptor in Harderian glands. The incubation of Harderian gland cytosol from gonadectomized oil-treated animals with [3 H]ORG 2058 and their centrifugation in linear sucrose gradients demonstrated the complete absence of specific progestin-binding sites. Furthermore, neither oestrogen priming nor treatment with cholera toxin were able to induce any significant increase in terms of progestin receptors in the Harderian glands of female animals (Fig. 4). Identical results were obtained in male glands. The absence of progestin-binding sites in the Harderian gland was in sharp contrast with the results of incubations of uterine cytosol with [3 H]ORG 2058 used as control. Indeed Fig. 4 demonstrates the presence of an 8 S molybdate-stabilized progestin receptor in the uterine cytosol from ovariectomized hamsters (Fig. 4a) and its further stimulation with oestradiol benzoate treatment (Fig. 4b). The addition of an excess of

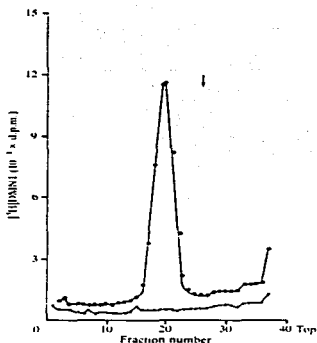


FIGURE 3. Density gradient sedimentation profile of bound [3 H]7 α ,17 β -dimethyl-17 β -hydroxy-4-oestren-3-one (DMNT) complexes in the cytosol from Harderian glands of female hamsters. Gland cytosol from animals ovariectomized 3 days previously was labelled *in vitro* with [3 H]DMNT (final concentration 1.2 nmol/l). Incubations were carried out in the absence or presence of an excess of unlabelled DMNT. Labelled cytosol samples (0.5 ml) were layered onto linear sucrose gradients (20–35%) and centrifuged in a vertical rotor for 2.5 h. BSA-naphthol blue black (arrow) was used as sedimentation standard.

radioinert ORG 2058 resulted in the suppression of uterine progestin-receptor labelling (data not shown).

Oestrogen receptor

The lack of oestrogen-induced and oestrogen-insensitive populations of progestin receptors in the Harderian gland prompted us to examine the presence of oestrogen-specific binding sites in female and male glands. When aliquots of female Harderian gland cytosol were incubated with [3 H]oestradiol-17 β and analysed in linear sucrose gradients, a small labelled area sedimenting in the 8 S region corresponding to the oestrogen receptor was demonstrated as indicated in Fig. 5. A similar though larger 8 S area was obtained in the hamster anterior pituitary used as a control tissue (Fig. 5). The addition of an excess of

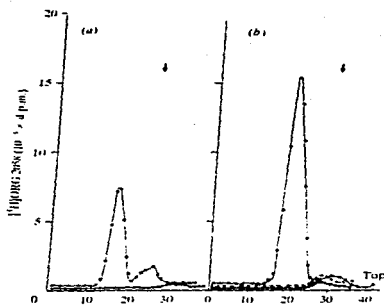


FIGURE 4. Sedimentation profile in linear sucrose gradients of Harderian gland and uterine cytosol from ovariectomized hamsters. Cytosol preparations were incubated with $1.0 \text{ nmol } [^3\text{H}]\text{ORG 20581}$ for 18 h at 4°C . Labelled cytosols (0.5 ml) were layered onto linear sucrose gradients and centrifuged at $370\,000 \text{ g}$ for 2.5 h. (a) Sedimentation profiles of Harderian gland (Δ) and uterine (\blacktriangle) cytosols from oil-treated animals. (b) Sedimentation profiles of Harderian gland cytosols from animals treated with oestradiol benzoate (\circ) and cholera toxin (\blacktriangle) and that of the uterine cytosol from animals treated with oestradiol benzoate (\bullet). BSA-naphthol blue black (arrow) was used as sedimentation marker. (For further details see text.)

non-radioactive oestradiol abolished the oestradiol receptor labelling in both tissues (Fig. 5). Identical results were obtained with male Harderian gland cytosols (results not shown).

Glucocorticoid receptor

Since glucocorticoids may exert several effects on the Harderian gland, the presence of their specific binding sites in gland cytosol was examined. Cytosol preparations from female and male gonadectomized and adrenalectomized animals were labelled *in vitro* with $2.0 \text{ nmol } [^3\text{H}]\text{dexamethasone}$. Figure 6 shows the sedimentation profile of the labelled cytosols. An 8 S sedimenting complex was identified in the Harderian gland from female hamsters. The addition of an excess of radioinert dexamethasone (100-fold) abolished the

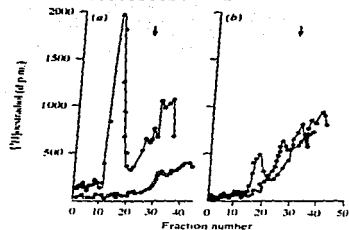


FIGURE 5. Sedimentation pattern in linear sucrose gradients of oestrogen-receptor complexes in (a) anterior pituitary and (b) Harderian glands from hamsters. Anterior pituitary and Harderian gland cytosols were incubated with $0.8 \text{ nmol } [^3\text{H}]\text{oestradiol-17}\beta$ in the absence (\bullet) or presence (\circ) of an excess of the radioinert ligand. Labelled cytosol samples were layered on the top of linear ($20\text{--}35\%$) density sucrose gradients and centrifuged as described in the text. BSA-naphthol blue black (4.6 S) was used as sedimentation marker (arrow).

formation of $[^3\text{H}]\text{ligand-receptor}$ complexes. Identical results were found in Harderian gland cytosol from males (data not shown).

Relative occurrence of steroid hormone receptors in the Harderian gland

An overall analysis of the experimental results revealed that the most abundant steroid hormone binder in the Harderian gland of the hamster was the 8-S androgen receptor, being followed by the glucocorticoid receptor molecule, whereas a very small number of oestradiol receptors and a lack of progesterin receptors were observed. Furthermore, no differences in terms of steroid hormone receptors were noticed between the male and female glands from adult gonadectomized animals.

DISCUSSION

The present results provide evidence for the existence of a cytoplasmic androgen receptor in the female Harderian gland in the golden hamster. This androgen-binding molecule has the essential physicochemical properties of the classical androgen receptor. Indeed, it binds $[^3\text{H}]\text{DHT}$ with high-affinity (K_d 0.7 nmol/l)

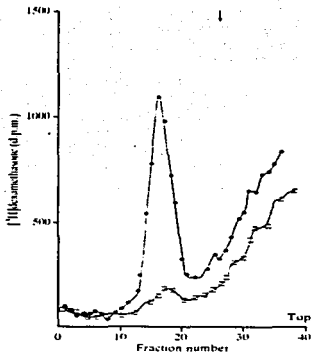


FIGURE 6. Sucrose gradient sedimentation profile of in-vitro labelled cytosols of Harderian glands with [3 H]dexamethasone. Glands were obtained from ovariectomized-adrenalectomized hamsters. Cytosols were incubated overnight with 1-7-20 nmol [3 H]dexamethasone 1 (●), and centrifuged as described in the text. Addition of an excess of unlabelled dexamethasone abolished the formation of the 3 H-labelled complex (□). BSA-naphthol blue black (4-6 S) was used as sedimentation marker (arrow).

and limited capacity (84 ± 3 fmol/mg protein) and sediments at 8-9 S in low salt, linear sucrose gradients (Figs 1 and 3). Displacement analysis disclosed that solely those steroid molecules with high androgenic intrinsic potency (DMNT, DHT, testosterone and 3 α -androstenediol) were efficient competitors for the androgen-binding site of the female Harderian gland, while progesterone and 3 β -androstenediol exhibited very little, if any, binding affinity for the androgen receptor. Other steroid (oestradiol-17 β , DHA, androstenedione, dexamethasone) and non-steroid (melatonin) hormones did not compete (Fig. 2).

The androgen receptor was characterized in the female gland using [3 H]DMNT as the radioligand because of its well-known specificity of this binding macromolecule (Liao, Liang, Fang *et al.* 1973) and its

androgenicity (Segaloff, 1963). Although a specific interaction of [3 H]DMNT with the progesterin receptor has been claimed to occur in several tissues (Traish, Muller & Wotiz, 1986), it seems not to be the case in the Harderian gland, since this lobular structure is devoid of intracellular progesterin receptors.

From the present results it appears that the androgen receptor is involved in the regulation and maintenance of the sexual phenotype of the gland. Thus administration of testosterone to female hamsters induces a number of structural and ultrastructural changes in the gland, including the presence of clusters of cylindrical tubules and large vacuoles in acinar cells, resembling the appearance of a male gland (Sun & Nadakavukaren, 1980). Furthermore, the suggestion that the transformation of the Harderian gland may be mediated through androgen receptors is in accordance with the observation that the masculinization of the gland in long-term blinded female hamsters is induced by ovarian androgens (McMasters & Hoffman, 1984).

Under specific circumstances and at certain doses the biological effects of androgenic steroid hormones may be mediated by the intracellular progesterin receptors (Giannopoulos, 1971; Kopu, 1981; Janne, Ismaa, Torkkeli *et al.* 1983). These are examples of a given hormone acting through a wrong receptor. To ascertain whether the androgen-induced phenotype of the male gland and the sexual transformation (masculinization) process of the female gland in the golden hamster may be also mediated by intracellular receptors other than androgen receptors, we carried out a search for the progesterin receptor in the Harderian gland. No evidence for the presence of progesterin-binding intracellular macromolecules was achieved in the glands from either male or female hamsters as assessed by ultracentrifugation studies on density sucrose gradients (Fig. 4). Further support for this finding was derived from the experiments in which two different stimuli, oestradiol benzoate and cholera toxin, failed to provoke the induction of progesterin receptors in the Harderian gland, whereas the uterus which was used as a control tissue exhibited a baseline concentration of progesterin receptor and successfully responded to oestradiol-17 β stimulus (Fig. 4). A similar increase on uterine progesterin receptors by cholera toxin has been documented previously (Aileva, Kenimer, Jordan & Lammana, 1983). The lack of response of progesterin receptor in the Harderian gland to exogenous stimulation was noticed in both male and female animals. These observations further support the concept that androgen-induced masculinization of the female Harderian gland is mediated by the androgen receptor.

The absence of oestrogen-induced and oestrogen-insensitive progesterin receptor populations in the male

and female glands raises the question as to whether or not this tissue possesses intracellular oestrogen receptors. As indicated in Fig. 5, the presence of very low [³H]oestradiol-binding activity was noticed in the glands from female animals. This finding is consistent with the observation that ovarian steroid hormones with oestrogenic activity exert very little, if any, biological effects upon the female gland (Hoffman, 1971). The observation that 5-aminolevulinic acid synthetase activity is markedly reduced in the glands from long-term ovariectomized animals has suggested that ovarian steroid hormones might be involved in the metabolic regulation of the Harderian gland (Spike, Johnson, McGadey *et al.* 1985, 1986). Whether the small oestrogen receptor content of the gland demonstrated in this study may explain the reduction of the porphyrinogenic enzyme activity or whether this metabolic alteration is due to other endocrine or biochemical changes associated with ovariectomy cannot yet be ascertained and remains to be elucidated. A similar low content of oestrogen receptors was also noticed in the male Harderian gland. Although on theoretical grounds, glucocorticoids of adrenal origin may participate in the development of the male gland, there is evidence suggesting that they do not play a role in this process (Hoffman, 1971; Lin & Nadakavukaren, 1979; McMasters & Hoffman, 1984). Nevertheless, it has been reported that glucocorticoids may exert some metabolic and biochemical effects on the Harderian gland (Wetterburg, Yuwiler, Geller & Schapiro, 1970; Butler, Wilson & Youson, 1978). Our own data demonstrated the presence of an 8 S glucocorticoid binding molecule in both male and female Harderian gland (Fig. 6), but the precise role, if any, of the glucocorticoid receptor in this glandular structure cannot be established. The results reported herein indicate that the relative occurrence of steroid hormone receptors in the female Harderian gland are identical to that of the male in this species. Interestingly, a close similarity on the binding properties and stereospecificity of the androgen receptor in female and male glands was noticed (see Vilchis *et al.* 1987).

Since there is no sexual dimorphism in terms of androgen receptor concentration and characteristics in the Harderian gland, the development of the male phenotype in the golden hamster should be modulated mainly by the circulating levels of androgens. It is clear, however, that alternate mechanisms such as those involving the pineal and its secretory products may also participate in the regulation of the sexual phenotype of the Harderian gland, particularly under some experimental circumstances (Clabough & Norvell, 1973).

The overall data were interpreted as demonstrating that the androgen receptor and the androgenic steroid

hormones are key molecules in the development of sexual type in the Harderian gland of the golden hamster.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the National Council of Science and Technology (Mexico) and the Rockefeller Foundation (New York). We thank Ms B. Alarcón for preparation of the manuscript.

REFERENCES

- Allea, J. J., Kenner, J. G., Jordan, A. W. & Lammana, C. (1983). Induction of estrogen and progesterone receptors and decidualization in the hamster uterus by cholera toxin. *Endocrinology* **112**, 2095-2106.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Bucana, C. D. & Nadakavukaren, M. J. (1973). Ultrastructural investigation of the postnatal development of the hamster Harderian gland. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* **142**, 1-12.
- Butler, D. G., Wilson, J. N. & Youson, J. H. (1978). Transformation of corticosterone by nasal, Harderian and lacrimal glands of the domestic duck (*Anas platyrhynchos*) *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology* **34**, 475-479.
- Chavez, B., Vilchis, F., Pérez, A. E., Garcia, G. A., Grillasca, I. & Pérez-Palacios, G. (1985). Stereospecificity of the intracellular binding of testosterone by nasal, Harderian and lacrimal metabolites. *Journal of Steroid Biochemistry* **22**, 21-25.
- Christensen, F. & Dam, H. (1953). A sexual dimorphism of the Harderian glands in hamsters. *Acta Physiologica Scandinavica* **23**, 333-336.
- Clabough, J. W. & Norvell, J. E. (1973). Effects of castration, binding, and the pineal gland on the Harderian glands of the male golden hamster. *Neuroendocrinology* **12**, 344-353.
- Giannopoulos, G. (1971). Binding of testosterone to cytoplasmic components of the immature rat uterus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **44**, 943-951.
- Hoffman, R. A. (1971). Influence of some endocrine glands, hormones and binding on the development of the Harderian glands of golden hamsters. *American Journal of Anatomy* **132**, 463-474.
- Hoffman, R. A., Johnson, L. B. & Reiter, R. J. (1985). Harderian glands of golden hamsters: temporal and sexual differentiation in immunoreactive melatonin. *Journal of Pineal Research* **2**, 161-168.
- Hoffman, R. A. & Jones, J. W. (1981). Concentrations of metals in the Harderian glands of male and female hamsters. *Comparative Biochemistry and Physiology* **69A**, 153-156.
- Hoh, J. H., Lin, W. L. & Nadakavukaren, M. J. (1984). Sexual dimorphism in the Harderian gland proteins of the golden hamster. *Comparative Biochemistry and Physiology* **77B**, 729-731.
- Janic, O. A., Homaa, V. V., Torkkeli, T. K., Ispolat, H. E. & Kopu, H. T. (1983). Hormonal regulation of urogenital synthesis in the rabbit uterus. In *Progressive and Progressins*, pp. 33-47. Eds C. W. Bardini, E. Nilgrom & P. Nisavau-Jarvis. New York: Raven Press.
- Kopu, H. (1981). 5 α -Dihydrotestosterone-induced urogenital

- synthesis in rabbit uterus is not inhibited by antiandrogen administration but is prevented by estradiol. *Biochimica et Biophysica Acta* 654, 293-296.
- Kouvonen, J., Pettersson, K. & Lovgren, T. (1978). Amido black 10-b-stained bovine serum albumin (BSA) in density gradient centrifugation. *Analytical Biochemistry* 89, 306-308.
- Liao, S., Liang, T., Fang, S., Castañeda, E. & Shao, T. C. (1973). Steroid structure and androgenic activity. *Journal of Biological Chemistry* 248, 6154-6162.
- Lin, W. L. & Nadakavukaren, M. J. (1979). The androgenic effects on the fine structure of the Harderian gland in the male hamster. *Cell and Tissue Research* 196, 119-127.
- McMasters, K. M. & Hoffman, R. A. (1984). Harderian gland: regulation of sexual type by gonads and pineal gland. *Biology of Reproduction* 31, 579-585.
- Payne, A. P., McGadey, J., Johnston, H. S., Moore, M. R. & Thompson, G. G. (1982). Mast cells in the hamster Harderian gland: sex differences, hormonal control and relationship to porphyrin. *Journal of Anatomy* 139, 451-461.
- Payne, A. P., McGadey, J., Moore, M. R. & Thompson, G. G. (1977). Androgenic control of the Harderian gland in the male golden hamster. *Journal of Endocrinology* 75, 73-82.
- Scaichard, C. (1949). The attraction of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 51, 660-672.
- Sepaloff, A. (1963). The enhanced local androgenic activity of 19-nor steroids and stabilization of their structure by 7 α - and 17 α -methyl substituents to highly potent androgens by any route of administration. *Steroids* 1, 296-312.
- Spike, R. C., Johnston, H. S., McGadey, J., Moore, M. R., Thompson, G. G. & Payne, A. P. (1985). Quantitative studies on the effects of hormones on structure and porphyrin biosynthesis in the Harderian gland of the female golden hamster. I. The effects of ovariectomy and androgen administration. *Journal of Anatomy* 142, 39-72.
- Spike, R. C., Johnston, H. S., McGadey, J., Moore, M. R., Thompson, G. G. & Payne, A. P. (1986). Quantitative studies on the effects of hormones on structure and porphyrin biosynthesis in the Harderian gland of the female golden hamster. II. The time course of changes after ovariectomy. *Journal of Anatomy* 145, 67-77.
- Sun, C. Y. & Nadakavukaren, M. J. (1980). Effect of testosterone on the female hamster Harderian gland pigmentation and ultrastructure. *Cell and Tissue Research* 207, 511-517.
- Thompson, G. G., Hordovatz, X., Moore, M. R., McGadey, J. & Payne, A. P. (1984). Sex differences in haem biosynthesis and porphyrin content in the Harderian gland of the golden hamster. *International Journal of Biochemistry* 16, 849-852.
- Trainor, A. M., Muller, R. E. & Weitz, H. H. (1986). Binding of 7 α , 17 α -dimethyl-19-nortestosterone (Mibolerone) to androgen and progesterone receptors in human and animal tissues. *Endocrinology* 118, 1327-1333.
- Vilchis, F., Chavez, B., Perez, A. E., Garcia, G. A. & Perez-Palacios, G. (1986). Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induced estrogen-dependent pituitary progesterin receptors. *Journal of Steroid Biochemistry* 24, 525-531.
- Vilchis, F., Hernandez, A., Perez, A. E. & Perez-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.
- Weiterberg, L., Geller, E. & Yuwiler, A. (1970). Harderian gland: An extra-retinal photoreceptor influencing the pineal gland in neonatal rats? *Science* 167, 884-885.
- Weiterberg, L., Yuwiler, A., Geller, E. & Schapiro, S. (1970). Harderian gland: development and influence of early hormonal treatment on porphyrin content. *Science* 168, 996-998.
- Weiterberg, L., Yuwiler, A., Ulrich, R., Geller, E. & Wallace, R. (1970). Harderian gland: Influence on pineal hydroxyindole-O-methyltransferase activity in neonatal rats. *Science* 170, 194-196.

Steroid Hormone Binding in the Harderian Gland of Birds: Characteristics of the Androgen, Estrogen, and Progesterin Receptors of *Anas platyrhynchos* and *Gallus domesticus*

FELIPE VILCHIS,¹ BERTHA CHÁVEZ, AND GREGORIO PÉREZ-PALACIOS

Department of Reproductive Biology, National Institute of Nutrition S. Zubirán, México City, México

Accepted September 7, 1990

A series of experiments was carried out in immature female chicks and ducks to establish whether the avian Harderian gland contains specific receptors for sex steroids. Cytosol preparations of Harderian glands were submitted to hormone saturation analysis using radiolabeled estradiol, ORG-2058, and dimethylnortestosterone as ligands. In addition, the sedimentation characteristics of the hormone-receptor complexes were studied by ultracentrifugation of linear sucrose gradients. The presence of high affinity binding sites for estrogens ($K_D = 2.4$ and 1.6 nM), progesterins (0.8 and 1.0 nM), and androgens (1.0 and 1.0 nM) was indicated in the chick and duck glands, respectively. The sedimentation coefficients were $7-7.5$ S, $7-8$ S, and 8 S for estrogen, progesterin, and androgen receptor-ligand complexes, respectively. The concentration of the androgen receptor was significantly higher in chick than in duck Harderian glands whereas the estrogen and progesterin receptor concentrations were similar in both species. A striking finding was the presence of progesterin receptors, which apparently do not exist in the glands of many mammals. Priming with estrogens did not modify the concentration of ORG-2058 binding sites in either species studied, indicating that gland progesterin receptor is not estrogen-regulated. Overall the data suggest intracellular mechanisms whereby circulating gonadal hormones regulate avian Harderian gland function. © 1991 Academic Press, Inc.

The Harderian gland occurs in many, if not all, terrestrial vertebrates (Payne, 1957; Sakai, 1981). In most cases it is present in the ocular orbit closely associated with the nictitating membrane. The gland of Harder is the principal orbital structure in birds (Burns, 1975, 1978), being multilobular composed of many tubules lined with a single layer of tall columnar cells; the high mucopolysaccharide and lipid contents indicate that it secretes mucus (Ballantyne and Fourman, 1967; Wight *et al.*, 1971). The secretions of the gland, which differ in each group of vertebrates, probably lubricate the eyeball and third eyelid (Kennedy, 1970).

¹ To whom correspondence and reprint requests should be addressed at Department of Reproductive Biology, National Institute of Nutrition, S. Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, México, D. F. 14000, México. Telefax: (52-5) 655.98.59.

However, the function of the gland goes beyond ocular lubrication and include local immunological mechanisms (Bang and Bang, 1968), extraretinal photoreception to influence the pinal (Wetterberg *et al.*, 1970), and a source of pheromones (Payne, 1977). In addition, the gland appears to play a role in reproduction (Reiter and Klein, 1971) and thermoregulation (Pandergrass and Thiessen, 1981).

Although steroid hormones seem to regulate certain functions of the avian Harderian gland, very little is known in terms of their cellular mode of action. Indeed, the avian gland is increasingly being recognized as a target for both male (Baba *et al.*, 1981) and female sex hormones; in ducks, for example, the administration of estradiol dipropionate increases mitosis but decreases cell size and mucous substances, while progesterone provokes a drastic cell

desquamation (Gupta and Maiti, 1981, 1983). It seems, therefore, that gonadal steroids and glucocorticoids (Butler *et al.*, 1978) have direct presumably receptor-mediated effects upon the avian gland.

This study aimed to assess the presence of intracellular sex steroid binding sites in two avian species. To determine the physicochemical characteristics and binding properties of the steroid receptors in the avian Harderian gland, the immature female chick and duck were chosen to exemplify two different types of glandular structures. According to Burns' classification, based on histological criteria, the chick possesses the type I gland, characterized by having a single lobe composed of a single type epithelium, whereas the lobular structures of the duck gland (type II) contain two types of cells in the epithelial lining (Burns, 1975, 1978). The results provide evidence for androgen, estrogen, and progesterone binding sites in the Harderian glands of two species of birds with glands of different histology.

METHODS

Chemicals. [3 H]Dimethylhormosterone (17 α -[methyl- 3 H]DMNT) (3.15 TBq/mmol), [2,4,6,7- 3 H]estradiol (3.40 TBq/mmol), and [6,7- 3 H]ORG-2058 (2.11 TBq/mmol) were obtained from Amersham Int. (Amersham Bucks, UK). The radiochemical purity of steroids was verified by paper or thin layer chromatography (Chávez *et al.*, 1985). Unlabeled DMNT (7 α , 17 α -dimethyl-17 β -hydroxy-4 α -stren-3-one), ORG-2058 (16 α -ethyl-21-hydroxy-19-nor-4 α -pregnen-3,20-dione), 17 β -estradiol, and 17 α -estradiol were obtained from Amersham or Steraloids Inc. (Wilton NH).

Animals. Immature female ducks (*Anas platyrhynchos*), 200–250 g body wt, and immature leghorn chicks, 150–200 g body wt, 8–10 weeks old, purchased locally, were used. In some experiments adult 30-week-old laying ducks were used. Animals were maintained under natural lighting (c. 12 hr) with standard poultry feed and water available *ad libitum*. Animals were used without previous experimental manipulations but where indicated they were treated with either 17 β -estradiol benzoate (50 μ g), or 17 α -estradiol (50 μ g) daily for 5 consecutive days. Injections were given into the breast muscle on alternate sides. Control birds received vehicle (corn oil) only. Animals were killed

by decapitation and the Harderian glands were immediately dissected out and placed in ice-cold buffer. All subsequent procedures were carried out at 4 $^{\circ}$.

Harderian gland cytosolic preparations. The tissues from both ducks and chicks were cleaned on filter paper; weighed and homogenized in TEDMG buffer: Tris-HCl (20 mmol/liter; pH 7.4), containing EDTA (1.5 mmol/liter), diethylenetriol (0.5 mmol/liter), sodium molybdate (10.0 mmol/liter), and 10% (v/v) glycerol; and supplemented with 5000 U.K. aprotinin/ml. Cytosol preparations were made by centrifugation of homogenates at 105,000g for 1 hr at 2 $^{\circ}$. Protein content was determined following Bradford (1976).

Steroid binding studies. The steroid binding studies were performed in the soluble fractions of Harderian glands from ducks and chicks. For saturation analysis aliquots (0.2 ml) of the cytosol (3–4.4 mg protein/ml) were incubated with a range of concentrations of appropriate radioligands, [3 H]DMNT, [3 H]ORG-2058, 17 β -[3 H]estradiol were used to label the androgen, progesterin, and estrogen receptors, respectively. Incubations were 18 hr long (a time established to achieve maximal steroid binding in preliminary experiments) at 2–4 $^{\circ}$. Nonspecific binding was determined in identical, parallel incubations containing a 100-fold excess of unlabeled ligand. After incubation, bound and free steroid fractions were separated by the addition of dextran-coated charcoal (DCC) suspension. Following centrifugation at 800g, the radioactivity content was determined in aliquots of supernatants using a Tri-Carb Packard 2660 counter as previously described (Chávez *et al.*, 1985).

Experiments were carried out in duplicate or triplicate. Binding measurements were done in triplicate for each experiment. Results were analyzed by the method of Eadie-Hofstee following Zivin and Waud (1982). Statistical analysis was done by comparing two regression models (Seber, 1977).

Sucrose density gradient sedimentation of cytosol-bound 3 H-labeled steroid complexes. To determine the sedimentation characteristics of androgen, progesterin, and estrogen receptors of Harderian glands of chicks and ducks, aliquots (500 μ l) of clear supernatants (prepared in 5 vol of TEDMG buffer/tissue) were incubated for 16 hr at 2–4 $^{\circ}$ with saturating concentrations of [3 H]DMNT (3.0 nmol/liter), [3 H]ORG-2058 (4.0 nmol/liter), and [3 H]estradiol (3.0 nmol/liter), respectively. Samples of each incubate were applied to linear 20–35% sucrose gradients prepared in TEDMG buffer and centrifuged for 2.5 hr at 370,000g using a VTi 65 rotor in a L8-70 ultracentrifuge (Beckman Instruments) at 2 $^{\circ}$. Parallel incubations containing the 3 H-labeled steroids plus a 100-fold excess of their respective unlabeled ligands were also ultracentrifuged to determine nonspecific labeling. Control gradients containing bovine serum albumin (BSA, 5%) as a sedimentation marker were run in parallel (Kouvoonen *et al.*, 1978).

Progesterin binding sites in glands of estrogen-primed animals. To assess possible estrogen regulation of the progesterone receptor of the gland, groups of chicks and ducks were treated with either 17 β -estradiol benzoate or vehicle as before. In addition, a group of ducks was treated with 17 α -estradiol. Cytosol samples from each group were incubated with saturating concentrations of [3 H]ORG-2058 (final concentration 3.0–4.0 nmol/liter) in the presence or absence of an excess of unlabeled ORG-2058. Bound radioactivity in the samples was determined as before. Limited capacity binding was measured as the difference in binding between incubates with and without unlabeled ORG-2058 and results were expressed as femtomoles per milligram cytosol protein. The evidents from these birds were used as control tissue. Statistical analysis employed Student's *t* test. A value of *P* < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Pilot experiments described optimal binding times for 3 H-labeled steroids to duck and chick Harderian gland cytosols. Maximum binding for the three radioligands occurred after 16 hr and remained constant for up to 24 hr. In all subsequent experiments, incubations were carried out for 16–20 hr at 2–4°. Demonstrable levels of androgen, progesterin, and estrogen receptors were detected in the cytosols from both species. It must be stressed that in all experiments data derived from Eadie-Hofstee plots were consistently repeatable.

The androgen receptor of the avian Harderian gland binds [3 H]DMNT with high affinity (Fig. 1). Under the assay conditions employed, no more than one class of binding sites could be distinguished. In ducks and chick glands the apparent dissociation constants (K_d) (mean \pm SD) for [3 H]DMNT were 1.0 ± 0.16 and 1.0 ± 0.19 nM, respectively. The number of detectable androgen binding sites (mean \pm SD) was, however, significantly (*P* < 0.05) greater in chick (144.0 ± 7.0 fmol/mg protein) than in ducks glands (44.0 ± 4.8 fmol/mg protein) (Fig. 1).

Figure 2 shows that the progesterin (progesterone) receptors in the gland of the two species were saturated at a concentration of 3.0 nmol [3 H]ORG-2058/liter. In Eadie-Hofstee plots of the data, the Harderian

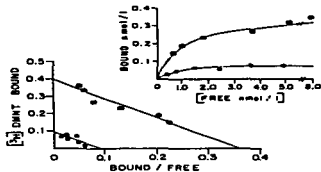


FIG. 1. Saturation and Eadie-Hofstee analysis of cytosolic-specific androgen binding. Harderian gland cytosols from sexually immature female ducks (●) or chicks (■) were incubated with 0.5–8.0 nmol [3 H]dimethylnortesterone (DMNT)/liter with or without a 100-fold excess of unlabeled DMNT. Specific binding saturates at 2–3 nM [3 H]DMNT (inset) with an apparent dissociation constant of 1.0×10^{-9} M in both cases. Specific binding was calculated by subtracting nonspecific binding from total binding.

gland cytosol fractions were found to possess a single class of high affinity binding sites with a K_d of 0.88 ± 0.14 nM in the chick and of 1.1 ± 0.15 nM in the duck gland, with maximal binding capacity of

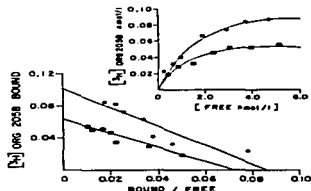


FIG. 2. Kinetic parameters of progesterin binding to Harderian gland cytosols from female ducks (●) or chicks (■). Aliquots of each cytosol were incubated with increasing concentrations of [3 H]ORG-2058 (0.5–6.0 nmol/liter) in the presence or absence of unlabeled ligand (100 \times). Specific binding data from saturation curves (inset) were converted into Eadie-Hofstee plots. For details see the text.

36.5 \pm 5.7 and 54.0 \pm 5.0 fmol/mg, respectively. No significant differences were found between chick and duck glands. Addition of 100-fold excess of cortisol, triamcinolone acetonide, and dexamethasone did not affect the ORG-2058 binding to the progesterin receptor.

Representative saturation curves for [³H]estradiol-specific binding in chick and duck Harderian gland cytosols are shown in Fig. 3. Edie-Hofstee analysis of the data indicates that the binding component in duck glands has a K_d of 1.6 \pm 0.39 nM and a maximal binding capacity of 60.0 \pm 10 fmol/mg protein, while in the chick gland the equivalent values were 2.4 \pm 0.4 nM and 75 \pm 10 fmol/mg protein, respectively. No significant differences were found between chick and duck glands.

Androgen, estrogen, and progesterin receptors in duck Harderian cytosols were labeled with [³H]IDMNT, 17 β -[³H]estradiol, or [³H]ORG-2058, respectively and sedimented through 20–35% sucrose gradients prepared in low-salt TEDMG buffer. The sedimentation profiles obtained after gradient centrifugation are shown in Fig. 4. The

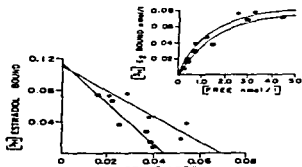


FIG. 3. Representative Edie-Hofstee plots and saturation analysis of specific estradiol binding in the Harderian gland of duck (●) and chick (○). Cytosol samples were incubated with 0.1–5.0 nmol [³H]estradiol/liter at 2–4° for 18 hr with or without an excess of radioligand (100×). The apparent affinity for the estrogen receptor in the glands of duck and chick was 1.6 \times 10⁻⁹ and 2.4 \times 10⁻⁹ M, respectively. The saturation curves are shown in the inset.

labeled androgen receptor complex sedimented in the 8–9 region, while the labeled estrogen and progesterin receptor complexes sedimented at 7.0 S–7.5 S; the addition of excess radioligand abolished the formation of ³H-labeled ligand-receptor complexes (Fig. 4). Incubation of saturating concentrations of [³H]IDMNT, 17 β -[³H]estradiol, and [³H]ORG-2058 with chick Harderian gland cytosol also gave specific ³H-labeled steroid-receptor complexes.

Figure 5 shows the sedimentation behavior of the ³H-labeled receptors in sucrose linear gradients. The values of the receptor sedimentation coefficients in the chick glands were similar to those of the duck glands, that is 8.0 S for the androgen and progesterin receptors and 7.0 S for the estrogen receptor. Comparison between cytosols from oil- and estrogen-17 β benzoate-treated ducks and chicks suggested no significant changes in the progesterone receptor concentrations (Fig. 6). Indeed, the mean concentrations of [³H]ORG-2058 binding sites in the Harderian gland of estrogen-treated animals were similar to those in cytosols of oil-treated animals ($P < 0.05$).

Interestingly, the oviduct cytosols of the estradiol-benzoate-treated animals exhibited an increase in the mean concentration of ORG-2058 binding sites as compared to those of oil-treated birds, as depicted in Fig. 6. Furthermore, the administration of 17 α -estradiol for 5 consecutive days to female ducks did not modify the number of available high affinity progesterone binding sites in the Harderian glands (Fig. 6). When the progesterone receptor was examined in the Harderian glands of laying ducks, it was found that its concentration was similar to those found in the immature oil-treated animals (Fig. 6)

DISCUSSION

These studies demonstrate the presence

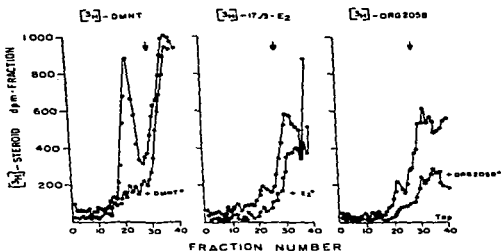


FIG. 4. Representative sucrose gradient sedimentation of cytosol androgen-, and progestin-binding sites. Harderian gland cytosol from intact female ducks was incubated with 3.0 nmol [3 H]DMNT/liter or 3.0 nmol [3 H]estradiol/liter or 4.0 nmol [3 H]ORG-2058/liter with (open circles) or without (closed circles) an excess of the corresponding unlabeled steroids. Bound and free steroids were separated with DCC. The bound fractions (0.5 ml) were applied to 20–35% sucrose gradients and centrifuged for 2.5 hr at 370,000g. Bovine serum albumin (shown by arrows) was run in parallel gradients as a sedimentation marker (4, 6, 5).

of specific binding sites for sex steroid hormones in the Harderian gland of two domestic species of birds.

By using 17β -[3 H]estradiol as the radioligand in a number of experiments, a specific high affinity, low capacity, 7.5 to 8.5 estrogen receptor was identified in the cytosol preparations of Harderian glands of both species. The characteristics of the estrogen binding sites of the avian Harderian gland resembled those previously reported in rodent glands (Vilchis and Pérez-Palacios, 1989) and are similar to those found in other mammalian target organs. The observation that administration of estradiol dipropionate to male ducklings accelerates mitosis and cell breakdown of the gland and increases mitosis in female ducklings, though with a decreased cell size and mucous glandular substances (Gupta and Maiti, 1981, 1983), strongly suggests a physiological action of estrogen on the avian Harderian gland. It is thus plausible that the es-

trogen effects are mediated via the observed intracellular estradiol receptor. Additional support stems from studies in other species; for example, Weaker *et al.* (1983) suggested that in female armadillos estrogens could affect the development of the duct system and the secretions by a receptor-mediated mechanism.

There are marked species variation with respect to the actions of progesterone upon the Harderian gland in vertebrates. In rodents for example no effects or only limited metabolic changes have been reported (Lorines and Lancaster, 1957; Maiti and Sahu, 1981; Shirama *et al.*, 1981) to occur after progesterone administration, while in female ducklings it induces a drastic cell desquamation (Gupta and Maiti, 1983), indicating a distinctive feature of the endocrine regulation of the avian Harderian gland. The results obtained in this study, using a synthetic labeled progestin ([3 H]ORG-2058) as the ligand, provided ev-

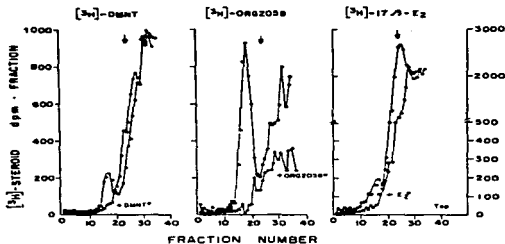


Fig. 5. Density gradient sedimentation of chick Harderian gland cytosolic androgen-, progesterin- and estrogen-binding sites using ^3H -labeled synthetic and natural steroids as ligands (closed circles). Incubation and receptor assay conditions were similar to those described in the legend to Fig. 4. Addition of a 100-fold excess of nonlabeled steroids abolished the formation of the ^3H -labeled hormone receptor complexes (open circles).

idence for the existence of a high affinity, 7 S-8 S progesterin receptor in the Harderian glands of both chicks and ducks. The number of progesterin binding sites were similar in the two species. Evidence that ORG-2058 does not bind to the avian glucocorticoid receptors is derived from the experiments in which an excess of radioinert cortisol, triamcinolone acetonide, and dexamethasone did not affect the ORG-2058 binding in the chick and duck gland cytosols. This observation sharply contrasts with the lack of progesterin binding activity found in the Harderian glands of golden hamsters, mice, rats, and guinea pigs (Vilchis and Pérez-Palacios, 1989; Vilchis *et al.*, 1989).

Whether the different structure and genomic regulation of the mammalian and avian progesterin receptors (Wei and Horwitz, 1985) accounts for this striking observation remains to be ascertained. Interestingly, two immunoreactive proteins have been identified with monoclonal anti-progesterone receptor antibody in the

Harderian glands of four mice strains, which do not bind progesterone (Chávez, B., Vilchis, F., Cerbón, M. A., and Pérez-Palacios, G., unpublished). The characteristics of the progesterin receptor identified in the birds glands are similar to those other avian and reptilian progesterone-sensitive tissues (Renoir *et al.*, 1982a,b; Kleis-San Francisco and Callard, 1986; Dufrene *et al.*, 1989; Reese and Callard, 1989). Priming with either estradiol-17 β benzoate and estradiol-17 α did not change the number of progesterin sites in the glands of immature chicks and ducks, at least at the dose employed, suggesting that the progesterin receptor in the avian gland is not estrogen-inducible. Further support for this finding is derived from the observation that estrogen priming resulted in a sharp increase in oviduct binding sites for progesterone in the same animals (Fig. 6). This finding deserves further examination, particularly since other observations indicate an estrogen dependency of the progesterin avian receptor in other organs (Renoir *et al.*, 1982a,b), al-

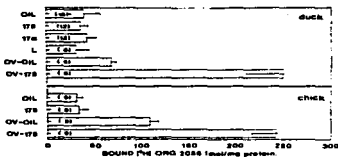


FIG. 6. Effect of the administration of estrogens on the concentration of progesterone receptors in the Harderian gland and oviducts of ducks and chicks. Cytosolic fractions from oil- and estrogen-treated animals were incubated with 3–4 nmol [³H]ORG-2058/liter, alone or in the presence of unlabeled ORG-2058 for 18 hr at 4°. Bound [³H]ORG-2058 was measured in samples (0.2 ml) of the incubates by DCC adsorption. Birds were treated with 17β-estradiol benzoate (17β), 17α-estradiol (17α), or vehicle (oil) for five consecutive days. L, laying ducks. The oviducts from oil (OV-oil) or 17β-estradiol benzoate (OV-17β)-treated animals were used as controls. Horizontal lines refer to SD of the mean; the number in parenthesis = n.

though the existence of nonestrogen-regulated progesterin receptor population has been reported in a number of species (MacLusky and McEwen, 1978; Cerbón *et al.*, 1989).

Androgens play an essential role in the sexual differentiation of the male Harderian gland in some mammalian species (McMasters and Hoffman, 1984) and are believed to exert their effects at the transcriptional level via the androgen receptor. In the male hamster a role of such binding molecules in mediating inhibitory effects on the glandular production of porphyrins and somatostatin has been suggested (Puig-Domingo *et al.*, 1988; Buzzel *et al.*, 1989; Vilchis and Pérez-Palacios, 1989). In birds, Baba *et al.* (1988) reported that testosterone reduces lacrimal concentrations of immunoglobulins presumably by a direct action at the glandular level. The finding in this study of high affinity androgen binding sites in the Harderian glands of chicks and ducks suggests that androgen actions upon this avian

intraorbital organ are mediated by their specific intracellular receptors. The observation that chick glands possess a significantly higher content of androgen binding sites than those of the duck may reflect a different hormonal responsiveness between the two species. A similar interspecies difference has been noticed in the glands of golden hamsters and rats; indeed, the hamster gland appears to be more sensitive to androgens and contains more androgen binding sites than that of the rat gland (Urueta, 1988). The characteristics of the avian androgen receptor are similar to those of the mammalian gland (Vilchis *et al.*, 1987, 1989) and other androgen sensitive tissues (Lea *et al.*, 1979; Chávez *et al.*, 1985).

In summary, the Harderian glands of ducks and chicks contain androgen and estrogen receptors and, unlike the mammalian gland, they also contain nonestrogen inducible progesterone receptors. Recently alternate nongenomic mode of steroid hormone action at target organs, involving cell membrane binding, has been proposed (Pietras and Szego, 1977; Etchegoyen *et al.*, 1986; Majewska *et al.*, 1986). The data presented herein are evidence for an intracellular receptor-mediated mechanism by which circulating sex steroid hormones regulate the Harderian gland functions in birds. The data also support the concept that the Harderian gland of birds is multi-hormonally regulated, as in other vertebrates.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National Council of Science and Technology (Mexico City) and the Rockefeller Foundation (New York). We thank Ms. B. Alarcón for preparing the manuscript.

REFERENCES

- Baba, T., Masumoto, K., Nishida, S., Kajikawa, T., and Mitsui, M. (1988). Harderian gland dependency of immunoglobulin A production in the lacrimal fluid of chicken. *Immunology* 65, 67–71.
- Ballantyne, B., and Fourman, J. (1967). The histology

- and histochemistry of the Harderian gland of the domestic duck. *J. Anat.* 101, 194.
- Bang, B. G., and Bang, F. B. (1968). Localized lymphoid tissues and plasma cells in paracranial and paranasal organ system in chickens. *Am. J. Pathol.* 53, 73-81.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Burns, R. B. (1975). Plasma cells in the avian Harderian gland and the morphology of the gland in the rook. *Can. J. Zool.* 53, 1258-1269.
- Burns, R. B. (1978). "Immunological Studies on the Avian Harderian Gland with Particular Reference to the Domestic Fowl." PhD dissertation, University of London.
- Butler, D. J., Wilson, J. X., and Youson, J. H. (1978). Transformation of corticosterone to 11-dehydrocorticosterone by Nasal, Harderian, and Lacrymal glands of the domestic duck (*Anas platyrhynchos*) in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 34, 475-479.
- Buzzel, G. R., Menendez-Pelaez, A., Porkka-Heiskanen, T., Pangerl, A., Pangerl, B., Vaughan, M. K., and Reiter, R. J. (1989). Bromocriptine prevents the castration-induced rise in porphyrin concentration in the Harderian glands of male Syrian hamster, *Mesocricetus auratus*. *J. Exp. Zool.* 249, 173-176.
- Cerbón, M. A., Martínez, M., and Pérez-Palacios, G. (1989). Oestrogen-insensitive progesterin receptors in the central nervous system: Physicochemical and immunoreactive characteristics. *J. Neuroendocrinology*, 1, 291-298.
- Chávez, B. A., Vilchis, F., Pérez, A. E., García, G. A., Grillasca, I., and Pérez-Palacios, G. (1983). Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J. Steroid Biochem.* 22, 121-126.
- Dufrene, L., Pageaux, J. F., Fanidi, A., Renoir, J. M., Laugier, C., and Baulieu, E. E. (1989). Biochemical characterization and subunit structure of quail oviduct progesterone receptor. *J. Steroid Biochem.* 32, 703-713.
- Etchegoyen, G. S., Cardinali, D. P., Pérez, A. E., Tamayo, J., and Pérez-Palacios, G. (1986). Binding and sites of catecholamines on adenylate cyclase activity, and adrenoreceptors, benzodiazepine and GABA receptors in guinea pig hypothalamic membranes. *Eur. J. Pharmacol.* 129, 1-10.
- Gupta, S. K., and Maiti, B. R. (1981). Effect of estradiol on the Harderian gland in the male domestic duckling. *Mikroskopie* 38, 200-203.
- Gupta, S. K., and Maiti, B. R. (1983). Influence of sex-hormones on the Harderian gland activity in female domestic duckling. *Mikroskopie* 40, 132-137.
- Kennedy, G. Y. (1970). Harderoporphyryne a new porphyrin from Harderian glands of the rat. *Comp. Biochem. Physiol.* 36, 21-36.
- Klein-San Francisco, S. M., and Callard, I. P. (1986). Identification of a putative progesterone receptor in the oviduct of a viviparous water snake (*Nerodia*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 61, 490-498.
- Kouvoonen, J., Pettersson, K., and Lovgren, T. (1978). Amido black 10-B-stained bovine serum albumin (BSA) in density gradient centrifugation. *Anal. Biochem.* 89, 306-308.
- Lea, O. A., Wilson, E. M., and French, F. S. (1979). Characterization of different forms of the androgen receptors. *Endocrinology* 105, 1350-1360.
- Lorincz, A. L., and Lancaster, G. (1957). Anterior pituitary preparation with tropic activity for sebaceous, preputial and Harderian gland. *Science* 126, 124-125.
- MacLusky, N. L., and McEwen, B. S. (1978). Oestrogen modulates progesterin receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature* 274, 276-278.
- Maiti, B. R., and Sahu, A. (1981). Effects of a long-term treatment with norethisterone (a progesterone-only contraceptive) on the epidermis, the sebaceous glands, the Meibomian gland and the Harderian gland in the cycling female rat. *Mikroskopie* 38, 309-313.
- Majewska, M. D., Harmon, N. L., Schwartz, R. D., Barker, J. L., and Paul, S. M. (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 232, 1004-1007.
- McMasters, K. M., and Hoffman, R. A. (1984). Harderian gland: Regulation of sexual "type" by gonads and pineal gland. *Biol. Reprod.* 31, 579-585.
- Pargergross, M. L., and Thiessen, D. D. (1981). Body temperature and autogrooming in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Behav. Neural Biol.* 33, 524-528.
- Paule, J. P. (1957). "The Comparative Histochemistry of the Harderian Gland." PhD dissertation, Ohio State University.
- Payne, A. P. (1977). Peromonal effects of Harderian gland homogenates on aggressive behaviour in the hamster. *J. Endocrinol.* 73, 191-192.
- Pietras, R. J., and Szego, C. M. (1977). Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 265, 69-72.
- Puig-Domingo, M., Guerrero, J. M., Reiter, R. J., Peinado, M. A., Menendez-Pelaez, A., Santana, C., and Webb S. M. (1988). Androgenic control of immunoreactive somatostatin in the Harderian gland of the Syrian hamster. *J. Reprod. Fert.* 82, 753-759.
- Reese, J. C., and Callard, I. P. (1989). Two progester-

- one receptors in the oviduct of the freshwater turtle *Chrysemys picta*: Possible homology to mammalian and avian progesterone receptor systems. *J. Steroid Biochem.* 33, 279-310.
- Reiter, R. J., and Klein, D. C. (1971). Observation on the pineal gland, the Harderian glands, the retina, and the reproductive organs of adult female rats exposed to continuous light. *J. Endocrinol.* 51, 117-125.
- Renoir, J. M., Yang, C. R., Formstecher, P., Lustenberger, P., Wolfson, A., Redeuilh, G., Mester, J., Richard-Foy, H., and Baulieu, E. E. (1982a). Progesterone receptor from chick oviduct: Purification of molybdate-stabilized form and preliminary characterization. *Eur. J. Biochem.* 127, 71-79.
- Renoir, J. M., Radanyi, C., Yang, C. R., and Baulieu, E. E. (1982b). Antibodies against progesterone receptor from chick oviduct: Cross-Reactivity with mammalian progesterone receptors. *Eur. J. Biochem.* 127, 81-86.
- Sakai, T. (1981). The mammalian Harderian gland: Morphology, biochemistry, function and phylogeny. *Arch. Histol. Jpn.* 44, 299-333.
- Seber, G. A. F. (1977). In "Linear Regression Analysis," pp. 42-124. Wiley, New York.
- Shirama, K., Furiya, T., Takeo, Y., Shimizu, K., and Maekawa, K. (1981). Influences of some endocrine glands and of hormone replacement on the porphyrins of the Harderian glands of mice. *J. Endocrinol.* 91, 305-311.
- Urueña, A., (1968). "Caracterización del receptor de andrógenos en la glándula de Harder." Thesis. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vilchis, F., Hernández, A., Pérez, A. E., and Pérez-Palacios, G. (1987). Hormone regulation of the rodent Harderian gland: Binding properties of the androgen receptor in the male golden hamster. *J. Endocrinol.* 112, 3-8.
- Vilchis, F., and Pérez-Palacios, G. (1989). Steroid hormone receptors and the sexual phenotype of the Harderian gland in hamsters. *J. Endocrinol.* 121, 149-156.
- Vilchis, F., Chávez, B., and Pérez-Palacios, G. (1989). Identificación de receptores intracelulares para esteroides de la glándula de Harder de aves y mamíferos. XXXII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, C. 63. México.
- Weaker, F. J., Villareal, C., and Sheridan, P. J. (1983). Cellular localization of estradiol in the Harderian gland of the female armadillo. *J. Exp. Zool.* 225, 5-7.
- Wei, L. L., and Horwitz, K. B. (1985). The structure of progesterone receptors. *Steroids* 46, 678-695.
- Wetterberg, L., Geller, E., and Yuwiler, A. (1970). Harderian gland: An extra-retinal photoreceptor influencing the pineal gland in neonatal rats? *Science* 167, 884-885.
- Wight, F. A. L., Burns, R. B., Rothwell, B., and McKenzie, G. M. (1971). The Harderian gland of the domestic fowl. I. Histology with reference to the genesis of plasma cells and Russell bodies. *J. Anat.* 110, 307-315.
- Zivin, J. A., and Waud, D. R. (1982). How to analyse binding, enzyme and uptake data: The simplest case, a single phase. *Life Sci.* 30, 1407-1422.

Steroid 5 α -Reductase Activity in the Harderian Glands of Male and Female Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*)F. VILCHIS,¹ J. ENRIQUEZ, G. QUEIPO, G. PÉREZ-PALACIOS, AND B. CHÁVEZ

Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F., Mexico

Accepted August 10, 1994

The activity of the enzyme steroid 5 α -reductase in Harderian glands of adult syrian hamsters was assessed by measuring the conversion of testosterone (T) to 5 α -dihydrotestosterone (DHT). The optimal conditions for this reaction were determined *in vitro* using whole gland homogenates and [³H]testosterone as substrate. Enzyme activity was maximal at pH 5.5. The Michaelis-Menten constant of the Harderian enzyme for T was $4.6 \pm 1.2 \times 10^{-8}$ M in females and $4.2 \pm 0.39 \times 10^{-8}$ M in males, estimated by Eadie-Hofstee plots. On the basis of relative maximum velocity values, there was 9 or 10 times more 5 α -reductase in females (2.8 ± 0.67 nmol/mg protein/hr) than in males (0.289 ± 0.029 nmol/mg protein/hr). Consistently, glands of intact male hamsters had lower 5 α -reductase activities than those of females. Castration of males significantly increased the enzymatic activity, which within 4 weeks reached female-like values. The levels of 5 α -reductase mRNA also increased with castration. There was a direct correlation between activity and mRNA levels of the enzyme in castrated male glands. Further, the administration of T or DHT to ovariectomized hamsters led to intact male values in the enzymatic activity of the gland. The sex differences in 5 α -reductase activity may be of relevance to the differential regulation exerted by androgen upon the physiology of male and female glands. The results are consistent with the view that 5 α -dihydrotestosterone is the active androgen in the Harderian gland. © 1994 Academic Press, Inc.

The vertebrate Harderian gland is under complex endocrine control. In the golden hamster this intraorbital structure displays a pronounced sexual dimorphism at histological, biochemical, and ultrastructural levels (Woolley and Worley, 1954; Hoffman, 1971; Nadakavukaren, 1992). The distinctive cellular patterns of the male and female glands are settled around puberty (Bucana and Nadakavukaren, 1973; Lopez *et al.*, 1992) and thereafter clear differences are apparent; two types of alveolar cells (I and II) are found in adult male glands, whereas the female possesses a single type of cells (I) and a high content of porphyrins

(Hoffman, 1971; Payne *et al.*, 1977). In addition, there are sex-specific differences in the activities of several enzymes involved in porphyrin and melatonin synthesis (Thompson *et al.*, 1984; Menendez-Pelaez *et al.*, 1988) as well as in the intraglandular concentrations of melatonin (Hoffman *et al.*, 1985), somatostatin (Puig-Domingo *et al.*, 1988), and many other bioactive substances (see Oleese and Wesche, 1989).

The Harderian gland activity is influenced by various hormones (prolactin, melatonin, thyroid, and steroid hormones) and by photoperiod (Hoffman *et al.*, 1989; Buzzell *et al.*, 1989; Menendez-Pelaez *et al.*, 1993). These and other studies have clearly highlighted gonadal androgens as essential for the biological expression of such dimorphism (McMasters and Hoffman, 1984; Vilchis and Pérez-Palacios, 1989), and

¹ To whom correspondence should be addressed at Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, México, D.F., 14000, México. Fax: (525) 655.9859.

while ovarian steroids have little or no effect on gland structure, naturally occurring androgens affect the growth and morphology of the gland (Payne *et al.*, 1992). Although the characteristics of the male gland are induced and maintained with testosterone (Hoffman, 1971; Payne *et al.*, 1977), its effects appear to reflect the actions of its 5 α -reduced metabolite, dihydrotestosterone (DHT), and not by testosterone (T) itself. In androgen-sensitive tissues, T is converted to DHT via the NADPH-dependent/androgen-regulated enzyme, 5 α -reductase (Bruchoovsky and Wilson, 1968; George *et al.*, 1991). The occurrence of this enzyme in Harderian tissues has not been documented to date, although research strongly suggests that DHT has been clearly indicated as the hormone acting upon the gland (Marrujo *et al.*, 1989; Menendez-Pelaez *et al.*, 1990); indeed, the androgen receptor of the hamster Harderian gland binds 5 α -DHT with a higher affinity than T and other C₁₉ androgens (Vilchis *et al.*, 1987, 1989). Since the enzyme-mediated conversion of T to DHT seems to determine androgen action at glandular level, the present study assesses the presence and kinetic properties of 5 α -reductase in Harderian glands of adult Syrian hamsters. In addition, the effects of gonadectomy and androgen replacement on the activity of the enzyme in glands of males and females are described.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

[1,2,6,7-³H]testosterone (3.89 TBq/mmol) was purchased from Amersham International, Amersham Bucks. Chemical purity of [³H]testosterone was checked by thin-layer chromatography using chloroform:methanol (95:5) and used without further purification. T, 5 α -dihydrotestosterone (17 β -hydroxy-5 α -androstane-3-one), 3 β -androstenediol (5 α -androstane-3 β ,17 β -diol), 3 α -androstenediol (5 α -androstane-3 α ,17 β -diol), androstenedione (4-androstene-3,17-dione), and androstenedione (5 α -androstane-3,17-dione) were obtained from Steraloids Inc. (Pauling, NY) or from Sigma Chemical Co. (St.

Louis, MO). Nonradioactive steroids were purified by successive recrystallizations in methanol.

Animals and Tissues

Adult male and female Syrian hamsters (150–180 g) were housed under a lighting schedule of 14 hr light/10 hr dark and given free access to food and water. Mice from required animals were gonadectomized under light ether anesthesia.

In other sets of experiments, ovariectomized animals were treated with either T or DHT at 1.0 mg/day for different time periods of with vehicle alone (20 μ l of propylenglycol). Animals were killed by decapitation and the Harderian glands immediately removed, cleaned, weighed, and submitted for RNA extraction or tissues were placed in ice-chilled Tris-citrate (TC) buffer (0.1 mol/liter Tris-HCl; 0.1 mol/liter sodium citrate), homogenized, and used for determination of enzyme activities.

Determination of 5 α -Reductase Activity

The standard method of assay for the enzyme was used for all experiments except where indicated otherwise. Harderian gland tissues (150 mg) from intact male and female animals were homogenized in 1.0 ml of TC buffer using 10-sec bursts in a polytron homogenizer (Brnkman Instruments, Westbury, NY). The pH optima were determined over the range of 4.5–8.5 using TC buffer, thereafter all assays were performed at pH 5.5. To measure 5 α -reductase activity, whole gland homogenates were incubated with 0.5 μ Ci of [³H]T and nonradioactive testosterone (2 μ mol/liter). Incubations were carried out at 37° for 60 min with continuous shaking; final incubation volume was 2.0 ml. Under these conditions the concentrations of NADPH were varied from 0 to 1 mmol/liter to ascertain cofactor dependence. To determine 5 α -reductase kinetics (Michaelis constant, K_m ; maximum velocity, V_{max}), whole gland homogenates (3 or 4 mg protein/ml) were incubated with 0.5 μ Ci of [³H]T and increasing concentrations of unlabeled T (1–10 μ mol/liter). All assays were done in duplicate and repeated at least twice. Tissueless incubations were used as controls. At the end of the incubation period, the reaction was stopped by the addition of 1.5 vol of ethyl acetate and extracted three times; the organic extracts were partitioned between hexane and 10% aqueous methanol. The methanolic phases were evaporated to dryness under nitrogen and redissolved in 1.0 ml of methanol. Samples of 10 μ l were taken to calculate radioactivity recovery. Aliquots of organic extracts containing 100,000 dpm received 2 μ g each of authentic T, DHT, androstenedione, and androstenedione, and 3 α - and 3 β -androstenediols. Samples were then dried, reconstituted in 20 μ l methanol, and applied to aluminium

plates precoated with silica gel (Merk, Darmstadt, West Germany). After chromatography in chloroform:methanol (98:2) and chloroform ether (9:1), the steroids were visualized by spraying with anisaldehyde reagent (1.0 ml *p*-anisaldehyde, 2.0 ml sulfuric acid, and 100 ml glacial acetic acid) after heating for 5 min. Spots corresponding to each steroid standard were placed in counting vials containing 1 ml of ethanol, shaken for 2 min, and then 5 ml of counting solution was added to each vial and the samples were assayed for radioactivity in a liquid scintillation spectrometer (Packard Tri-Carb 2660). The counting efficiency for ^3H was 45% and quenching was corrected in all samples by external standardization. 5α -Reductase activity was calculated from the percentage of radioactively labeled 5α -reduced metabolites, taking into account recovery, blank values, and specific activity of [^3H]T to unlabeled T. Results were expressed as pmol/mg protein/hr (pmol/mgP/hr). Values of K_m and V_{max} were derived from Eadie-Hofstee plots (Zivin and Waud, 1982). Protein concentrations were determined by the method of Bradford (1976).

Identification of Radioactive 5α -DHT

Isolation and radiochemical purity of the radioactive 5α -DHT was achieved by a reverse isotope dilution technique which included (a) successive recrystallizations to obtain constant specific activity (sp act), and (b) identical behavior to that of the steroid carriers in two different thin-layer chromatographic systems (chloroform:methanol, 98:2; chloroform:ether, 9:1). These systems allowed good separation of 5α -DHT from other steroids; R_f values of 0.25, 0.35, 0.40, 0.46, 0.61, and 0.71 were respectively obtained for 3α : β androstenediols, T, 5β -DHT, 5α -DHT, androstenedione, and 5α -androstenedione.

Statistics

Data were analyzed by ANOVA table for comparing K' treatments followed by a multiple *t* confidence intervals procedure (Bhattacharyya and Johnson, 1977).

RNA Isolation and Northern Blot Analysis

Total cellular RNA was isolated by the guanidium thiocyanate method (Cathala *et al.*, 1983). Aliquots (15 μ g) of total cellular RNA were denatured before electrophoresis by adding formaldehyde and formaldehyde to final concentrations of 6 and 40% in MOPS buffer (20 mmol/liter MOPS, pH 8.0, 5 mmol/liter sodium acetate, 1 mmol/liter EDTA) and by heating the mixture for 15 min at 70°. The denatured RNA samples were separated in 1% agarose-formaldehyde containing gels. Electrophoresis was performed in MOPS buffer

at 40 V for 4-6 hr at room temperature. RNA was transferred to hybridization transfer membranes (GeneScreen, Dupont, Boston, MA) and baked at 80° for 90 min. The filters were rinsed in 2 \times SSC and prehybridized overnight in a solution containing 6 \times SSC, 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), 5 \times Denhardt's reagent, 100 μ M/ml denatured, fragmented salmon sperm DNA, and 50% *v/v* formamide. Membranes were hybridized to cDNA probes which were labeled with ^{32}P by random priming. The probe used was a cDNA corresponding to the full-length mRNA for human 5α -reductase type I (kindly provided by Dr D. W. Russell, University of Texas). After hybridizations (18 hr at 42° in shaking water bath), the filters were rinsed in 2 \times SSC at room temperature and washed twice (15 min) in 0.1 \times SSC-0.1% SDS at 50°. Membranes were autoradiographed by exposure to Kodak X-OMAT AR films (Eastman Kodak, Rochester, NY) with intensifying screens at -70°.

RESULTS

To determine the optimal conditions for the measurement of 5α -reductase activity, a number of *in vitro* assays were done using whole homogenates of Harderian glands from intact animals. The identification of [^3H] 5α -DHT after tissue incubations with [^3H]T was achieved by successive recrystallizations to a constant sp act (Table 1). As shown in Fig. 1, maximal conversion of T to its 5α -reduced derivatives by glandular homogenates was achieved at acid pH (5.5) in both male and female tissues; thus, the enzyme activity decreases with increasing pH, reaching the lowest values at basic pH. The results also suggest higher 5α -

TABLE I
RECRYSTALLIZATION DATA OF ISOLATED
 5α -DIHYDROTESTOSTERONE FROM HARDERIAN
GLAND TISSUES AFTER *IN VITRO* INCUBATION
WITH [^3H]T

5α -DHT	sp act ^3H dpm/mg*	
	Crystals	Mother liquors
1st crystallization	838	728
2nd crystallization	896	785
3rd crystallization	802	740

* Specific activity of crystals (dpm/mg carrier).

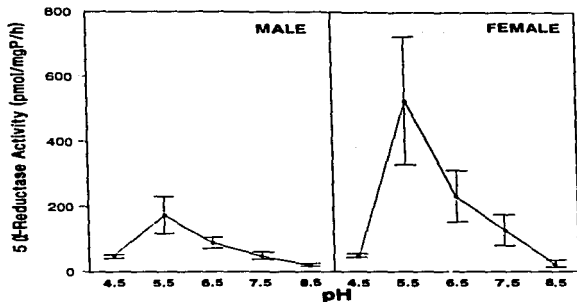


FIG. 1. Schematic diagram of the relation between pH and 5 α -reductase activity in extracts of Harderian gland of adult intact hamsters. Tissues of males and females were homogenized in Tris-citrate (0.1 mol/liter) buffer and 5 α -reductase activity was assayed at varying pH as described in the text. In both cases, enzymatic reaction developed preferentially at pH 5.5. A lot of six glands was used for each determination. Values are means \pm SEM.

reductase activities in female than in male glands.

When the effect of NADPH upon 5 α -reductase activity was examined in glandular homogenates from intact hamsters, it was found that enzyme activity increased alongside increased cofactor concentrations (Fig. 2) but in addition, certain metabolic differences between males and females were apparent. In the absence of NADPH 5 α -DHT was the main bioconversion product of T in both tissues studied, whereas there was very little formation of 3 α /3 β androstane diols. In all cases the formation of 5 α -reduced metabolites in female glands was greater than that observed in male glands. The addition of increasing concentrations of cofactor to male homogenates produced a parallel increase in the DHT and androstane diol formation. On the contrary, the addition of moderate or large

amounts of NADPH (0.050–1.0 mmol/liter) to the female homogenates resulted in a disparity of androstane diols production with respect to DHT, it being more evident at high concentrations (see Fig. 2). Thus, the apparent drop in DHT coincided with a gradual increase in the formation of androstane diols. Since the DHT/androstane diols ratio was higher in homogenates containing no cofactor, the addition of NADPH to incubates was omitted in further experiments.

The effect of substrate concentrations on the 5 α -reductase activity of Harderian gland from intact hamsters is shown in Fig. 3. The enzyme activity increased with increased substrate concentrations. The activity reached near maximal values at 7 to 20 μ mol/liter of testosterone in males as in females. The K_m of this enzyme, for testosterone was 4.6 ± 1.2 (\pm SD) $\times 10^{-6}$ M in

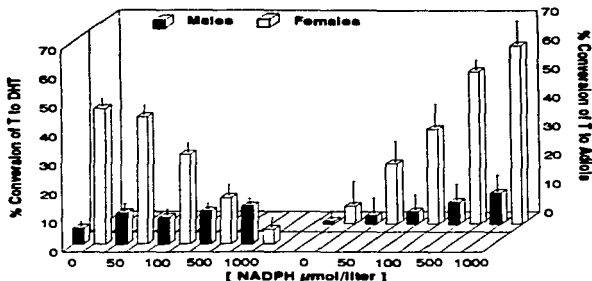


FIG. 2. Effect of NADPH on the conversion of [3 H]T to 5α -reduced products of Harderian gland homogenates. Tissues were homogenized in Tris-citrate buffer, pH 5.5, and 5α -reductase activity was assayed at varying concentrations of NADPH. Incubation mixtures were prepared as described in the text. After incubation samples were analyzed for radioactive 5α -dihydrotestosterone and 3α -(β)-androstane diols (Adiols). $n = 4$ animals per NADPH concentration. Values are means \pm SD.

females and 4.2 ± 0.39 (\pm SD) $\times 10^{-6}$ M in males, as estimated from Eadie-Hofstee plots, whereas the mean V_{max} was about 10-fold higher in females (2.8 ± 0.67) (\pm SD) ($\text{nmol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$) than in males (0.289 ± 0.029 $\text{nmol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$).

To investigate whether sex steroid hormone levels account for this difference, the enzyme activity was measured in glands from castrated hamsters as well as in glands obtained from ovariectomized animals treated or not with androgens. As shown in Fig. 4, orchidectomy for different time periods results in a gradual increase of the Harderian 5α -reductase activity, which after 32 days reached values (5.44 ± 64 $\text{pmol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$) similar to those found in glands from intact females (5.06 ± 37 $\text{pmol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$). The enzymatic activity was unchanged in 24-hr castrated males, but significant changes were observed at 7, 17, and 32 days post-

castration ($P < 0.002$), seemingly in a time-dependent fashion.

Figure 5 shows that when ovariectomized females were treated with androgens for several consecutive days, the Harderian 5α -reductase activity fell after 1 week, reaching male intact values. Thus, the administration of androgens for 21 consecutive days led to the lowest enzymatic activities, whereas at 1 day of treatment no changes were observed. In this regard, T and DHT were equally effective. To verify that such effects were due to exogenous androgens, a group of nontreated spayed animals was included as control; unexpectedly, ovariectomy alone reduced Harderian 5α -reductase activity, but it was less pronounced compared with the treated groups.

Because the Harderian 5α -reductase activity was low in intact males and spayed androgen-treated animals but increased in long-term castrates, it may be concluded that androgen levels regulate the enzyme

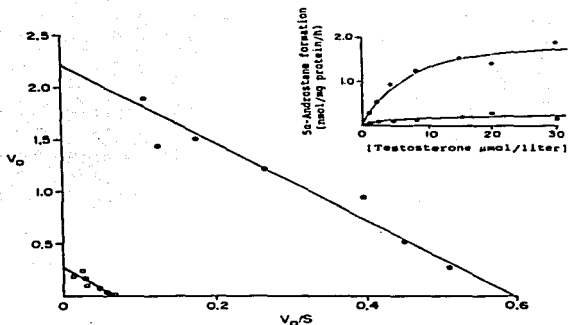


FIG. 3. 5 α -Reductase activity in Harderian glands of male (O) and female (●) hamsters as a function of the substrate (testosterone) concentration (insert) and transformation of these values to Eadie-Hofstee plots. The incubation conditions were outlined in the text using seven testosterone concentrations ranging from 1.0 to 30.0 μ mol/liter. Each point is the mean of two incubation mixtures from a single tissue homogenate.

expression. To assess whether this regulation occurs at genomic level, mRNA levels were determined in glands from intact and orchidectomized hamsters. When glandular preparations of intact animals were used, the 5 α -reductase cDNA probe hybridized to an mRNA of approximately 2.5 kb (Fig. 6); these bands showed characteristics similar to those 5 α -reductases species found in other rodent tissues (Viger and Robaire, 1992). Interestingly, the 5 α -reductase mRNA levels progressively increased after castration.

DISCUSSION

The presence of a 5 α -reductase in Harderian glands of adult Syrian hamsters is reported. This enzyme displays a clear sexual dimorphism with respect to its activity,

being much greater in females than in males. Data also indicate the physiological regulation of its expression is at least mediated by androgens.

The steroid 5 α -reductase (EC 1.3.1.22) catalyzes the NADPH-dependent reduction of 4-ene-3-keto steroids to their corresponding 5 α -dihydro-3-keto steroids. This enzyme is widely distributed among different tissues and organisms. The best-known role of 5 α -reductase is the reduction of T to 5 α -DHT at target cells (Labrie *et al.*, 1992). Early biochemical studies suggested the existence of multiple 5 α -reductases in reproductive and peripheral tissues of mammals (Dorfman and Ungar, 1965); to date, two of these isoenzymes (I and II in human / I and 2 in rat) have been isolated and cloned (Andersson and Russell, 1990; Andersson *et al.*, 1991). The isozymes of rat, identified

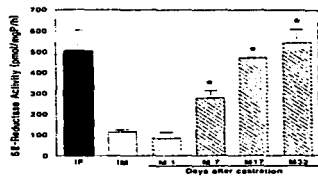


FIG. 4. 5 α -Reductase activity in Harderian glands of castrated male hamsters. Animals ($n = 4$) were intact (IM) or castrated at 1, 7, 17, and 32 days. Values are means \pm SD. * $P < 0.002$ compared with IM.

as type 1 and type 2, are proteins of 255 and 254 aminoacids in length, and they differ in their kinetic properties, pH optimas, expression levels, and sensitivity to certain inhibitors (Andersson *et al.*, 1989; Normington and Russell, 1992). The number of genes and/or 5 α -reductase isoenzymes present in the hamster are not known; however, the enzyme of the Harderian gland shares certain functional characteristics with those described for the rat isoenzymes. Under the experimental conditions employed the Harderian enzyme has an acidic pH optimum of 5.5 (as for the rat isozyme type 2). Studies in hamster androgen-sensitive tissues, such as the sebaceous gland or testicle, revealed that the 5 α -reductase develops maximal activity at pH values of 8.0 and 7.4, respectively (Takayasu and Adachi, 1972; Furubayashi *et al.*, 1982). In contrast, the conversion of T to DHT by Harderian gland homogenates was low or almost undetectable at neutral or basic pH (Fig. 1); in the former, T was preferentially converted to Δ^4 -androstenedione (data not shown), indicating a 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity. The fact that the maximal 5 α -reductase activity developed at an acidic pH strongly suggested the occurrence of a single enzyme within this glandular structure. The kinetic parameters support this view.

As expected, the addition of NADPH to incubation mixtures enhanced enzyme activity, but the effect of cofactor markedly differed in males and females. In the absence of cofactor, the formation of DHT was several-fold greater in females than in males although in both cases the accumulation of 3 α /3 β -androstane diols was low. When concentrations of cofactor were increased from 50 to 1000 μ mol/liter, there was an apparent increment in the formation of total 5 α -reduced metabolites (Fig. 2). However, in male tissues, the ratio DHT/androstane diols remained unmodified at all concentrations assayed, while in female glands this ratio diminished drastically at the higher concentrations, and a large percentage of 5 α -reduced steroids was recovered as 3 α /3 β androstane diols. The accumulation of androstane diols in the incubates containing high concentrations of NADPH may be explained by an increase in the activity of 3 α /3 β steroid ketoreductase enzymes. Frederiksen and Wilson (1971) reported similar results using purified nuclear fractions from rat ventral prostate. Thus, to avoid further conversion of

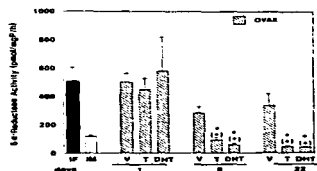


FIG. 5. 5 α -Reductase activity in Harderian glands of spayed hamsters treated with androgens. Ovariectomized animals (OVAX) received either testosterone (T) or 5 α -dihydrotestosterone (DHT) for 1, 8, and 22 days (1.0 mg/day sc). Glands from intact males (IM), intact females (IF), and OVAX vehicle-treated hamsters (V) served as control ($n = 4$ animals per group). Values are means \pm SD; * $P < 0.002$ compared with IM; * $P < 0.002$ compared with vehicle-treated groups.

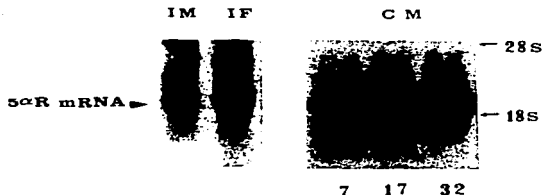


FIG. 6. Northern blot analysis of 5 α -reductase mRNA in Harderian glands of Syrian hamsters. Aliquots of total RNA (20 μ g) isolated from tissues of intact animals and castrated males (CM) at 7, 17, or 32 days were analyzed by blot hybridization using as a probe a 32 P-labeled human 5 α -reductase cDNA.

5 α -DHT into androstane diols the kinetic measurements of the enzyme were assessed without exogenous cofactor.

The apparent K_m values for testosterone in male and female glands were similar to those reported in other androgen-responsive tissues of the rat (Martini, 1982), dog (Liang *et al.*, 1985), macaque (Resko *et al.*, 1988), and man (Liang *et al.*, 1985; Andersson and Russell, 1990). In this regard, the Harderian enzyme resembles the rat isozyme type I. According to the Eadie-Hofstee plots, the mean V_{max} value in females was 9- or 10-fold above that in males (Fig. 3) indicating that the female gland contains more 5 α -reductase activity than do those of male hamsters.

Interestingly, there are also reported sex-related differences in the activity and/or expression of other important glandular enzymes, such as the 5-aminolevulinic synthase (Thompson *et al.*, 1984; Menendez-Pelaez *et al.*, 1991), *N*-acetyltransferase, and HIOMT (Menendez-Pelaez *et al.*, 1988), as well as in the number of binding sites for 3,5,3'-triiodothyronine (Vilchis *et al.*, 1992), melatonin (Menendez-Pelaez *et al.*, 1993), nitrendipine (Kumar *et al.*, 1992), and iodopindolol (Pangerl *et al.*,

1989). Even if other nonsteroidal hormones affect the glandular activity, most of these differences appear to be determined by the circulating levels of androgens.

The present study shows androgens to regulate to a large extent the activity of the Harderian enzyme. Currently, 5 α -reductase activity in intact males was about one-fifth that of intact females (116.0 vs 506.0 pmol/mgP/hr). This condition could be reversed by modifying the hormonal status of the animals (Figs. 4 and 5). Thus, 5 α -reductase activity increases following androgen withdrawal in such a way that castration for 4 weeks produced female values of the enzyme (544.4 pmol/mgP/hr). An activation of the 5 α -reductase of the sebaceous glands after orchidectomy has also been observed in Syrian hamsters. In this regard, castration of male rats induces a similar change in hypophysis and liver (Dorman and Ungar, 1965; Martini, 1982), but not in accessory sex organs (George *et al.*, 1991), suggesting tissue-specific regulation of the 5 α -reductase. The proposal that the 5 α -reductase activity of the Harderian gland depends on circulating androgens was further substantiated by the observation that in spayed hamsters exogenous T

or 5 α -DHT brings about male levels of the enzyme in the gland (Fig. 3).

On the other hand, the fact that ovariectomy alone modestly decreases the enzymatic activity suggests the participation of other factors in the regulation of the 5 α -reductase of the female. The observation that δ -aminoolevulinic acid synthetase activity is significantly reduced in glands from long-term ovariectomized hamsters suggested that ovarian steroids are involved in the metabolic regulation of the Harderian gland (Spike *et al.*, 1984).

Recent studies have demonstrated that the expression of 5 α -reductase in rat reproductive tissues is positively regulated by androgens (Normington and Russell, 1992). In turn, the presence of 5 α -DHT, but not T, increases the quantity of 5 α -reductase mRNA levels (George *et al.*, 1991). On the contrary, the present results suggest that in the hamster Harderian gland, androgens exert a negative control: since the activity and the levels of mRNA of the enzyme increase with castration, this may partially explain the gender-associated differences in 5 α -reductase activity. The finding in this study of a functional 5 α -reductase in the Harderian glands of Syrian hamsters suggests that androgen actions upon this intraorbital organ are elicited by 5 α -dihydrotestosterone in the same way as that that occur in androgen-dependent tissues such as the prostate.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by The Rockefeller Foundation (New York), the World Health Organization (Geneva), and CONCYT, Grant M 9303 (Mexico). We thank Mat. M. Chávez and B. Alarcón for their technical help.

REFERENCES

- 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, 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.
- 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.
- Bhattacharyya, G. K., and Johnson, R. A. (1977). "Statistical Concepts and Methods," pp. 453-504. Wiley, Singapore.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bruchovsky, N., and 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.
- Bucans, C. D., and Nadakavukaren, M. J. (1973). Ultrastructural investigation of the postnatal development of the hamster Harderian gland. *Zellforsch.* 142, 1-12.
- Buzzell, G. R., Menendez-Pelaez, A., Porkka-Heiskanen, T., Pangerl, A., Pangerl, B., Vaughan, M. K., and Reiter, R. J. (1989). Bromocriptine prevents the castration-induced rise in porphyrin concentration in the Harderian glands of male Syrian hamster, *Mesocricetus auratus*. *J. Exp. Zool.* 249, 172-176.
- Cathala, G., Savouret, J.-F., Ménez, B., West, B. L., Karin, M., Martial, J. A., and Baxter, J. D. (1983). A method for isolation of intact translationally active ribonucleic acid. *DNA* 2, 329-335.
- Dorfman, R. I., and Ungar, F. (1965). "Metabolism of Steroid Hormones," Chap. VI, pp. 382-424. Academic Press, New York.
- Fredriksen, D. W., and Wilson, J. D. (1971). Partial characterization of the nuclear reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: Δ^4 -3-ketosteroid 5 α -reductase of rat prostate. *J. Biol. Chem.* 246, 2584-2593.
- Furubayashi, Y., Terada, N., Sato, B., and Matsumoto, K. (1982). Localization of Δ^4 -5 β - and 5 α -reductases and 17 β -ol dehydrogenase in immature guinea hamster testes. *Endocrinology* 111, 269-272.
- 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 5 α -reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4044-4047.
- Hoffman, R. A. (1971). Influence of some endocrine glands, hormones and binding on the histology and porphyrins of the Harderian glands of golden hamsters. *Am. J. Anat.* 132, 463-478.
- Hoffman, R. A., Johnson, L. B., and Reiter, R. J.

- (1985). Harderian glands of golden hamsters: Temporal and sexual differences in immunoreactive melatonin. *J. Pineal Res.* 2, 161-168.
- Hoffman, R. A., Wertz, P., and Habeeb, P. (1989). Harderian glands of golden hamsters: Morphological and biochemical responses to thyroid hormones. *J. Comp. Physiol. B* 159, 293-299.
- Kumar, P., Brodie, S. G., Vaughan, M. K., Menendez-Pelaez, A., Reiter, R. J., and Chambers, J. P. (1992). Testosterone sensitive dihydroxyindole binding in the Harderian gland of the male hamster. *Cell Calcium* 13, 565-570.
- Labrie, F., Sugimoto, Y., Liu-The, V., Simard, J., Lachance, Y., Bachvarov, D., Sebiane, G., Durocher, F., and Paquet, N. (1992). Structure of human type II 5 α -reductase gene. *Endocrinology* 131, 1571-1573.
- Liang, T., Casieri, M. A., Cheung, A. H., Reynolds, G. F., and Rasmussen, G. H. (1985). Species differences in prostatic steroid 5 α -reductase of rat, dog and human. *Endocrinology* 117, 571-579.
- López, J. M., Tolivia, J., and Alvarez-Uria, M. (1992). Postnatal development of the Harderian gland in the syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*): A light and electron microscopic study. *Anat. Rec.* 233, 597-616.
- Marrufó, B., Menendez-Pelaez, A., Buzzell, G. R., Gonzalez-Brito, A., and Reiter, R. J. (1989). 5 α -Dihydrotestosterone administration converts indolamine metabolism and porphyrin content of the female syrian hamster Harderian gland to the male type. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 192, 192-195.
- Martini, L. (1982). The 5 α -reduction of testosterone in the neuroendocrine structures. Biochemical and physiological implications. *Endocr. Rev.* 3, 1-25.
- McMasters, K. M., and Hoffman, R. A. (1984). Harderian gland: Regulation of sexual "type" by gonads and pineal gland. *Biol. Reprod.* 31, 579-585.
- Menendez-Pelaez, A., Reiter, R. J., Guerrero, J. M., Puig-Domingo, M., and Howes, K. A. (1988). Sexual dimorphism in N-Acetyltransferase activity, Hydroxyindole-O-methyltransferase activity, and melatonin content in the Harderian gland of Syrian hamsters: Changes following gonadectomy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 187, 287-291.
- Menendez-Pelaez, A., Buzzell, G. R., Gonzalez-Brito, A., and Reiter, R. J. (1990). Androgenic control of N-acetyltransferase activity in the Harderian glands of the syrian hamster is mediated by 5 α -Dihydrotestosterone. *J. Cell. Biochem.* 42, 95-100.
- Menendez-Pelaez, A., Buzzell, G. R., Rodríguez, C., and Reiter, R. J. (1991). Indole and porphyrin content of the syrian hamster Harderian glands during the proestrus and estrus phases of the estrous cycle. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 38, 101-104.
- Menendez-Pelaez, A., Lopez-Gonzalez, M. A., and Guerrero, J. M. (1993). Melatonin binding sites in the Harderian gland of syrian hamsters: sexual differences and effect of castration. *J. Pineal Res.* 14, 34-38.
- Nadakavukaren, M. J. (1992). The mammalian Harderian gland: Ultrastructure, sexual dimorphism, and its regulation by light and steroids. In "Harderian Glands, Porphyrin Metabolism, Behavioral and Endocrine Effects" (S. M. Webb, R. A. Hoffman, M. L. Puig-Domingo, R. J. Reiter, Eds.), p. 69. Springer-Verlag, Berlin.
- 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.
- Olcese, J., and Wesche, A. (1989). The Harderian gland. *Comp. Biochem. Physiol.* A 93, 655-665.
- Pangerl, A., Pangerl, B., Buzzell, G. R., Jones, D. J., and Reiter, R. J. (1989). Characterization of β -adrenergic receptors in the syrian hamster Harderian gland: Sexual differences and effects of either castration or superior cervical ganglionectomy. *J. Neurosci. Res.* 22, 456-460.
- Payne, A. P., McGadey, J., Moore, M. R., and Thompson, G. G. (1977). Androgenic control of the Harderian gland in the male golden hamster. *J. Endocrinol.* 75, 73-82.
- Payne, A. P., McGadey, J., and Johnson, H. S. (1992). The structure of the Harderian gland of the golden hamster. In "Harderian Glands, Porphyrin Metabolism, Behavioral and Endocrine Effects" (S. M. Webb, R. A. Hoffman, M. L. Puig-Domingo, and R. J. Reiter, Eds.), p. 53. Springer-Verlag, Berlin.
- Puig-Domingo, M., Guerrero, J. M., Reiter, R. J., Peinado, M. A., Menendez-Pelaez, A., Santana, C., and Webb, S. M. (1988). Androgenic control of immunoreactive somatostatin in the Harderian gland of the syrian hamster. *J. Reprod. Fert.* 82, 753-759.
- Resko, J. A., Connolly, P. B., and Roselli, C. E. (1988). Testosterone 5 α -reductase activity in neural tissue of fetal rhesus macaques. *J. Steroid Biochem.* 29, 429-434.
- Spike, R. C., Johnson, H. S., McGadey, J., Moore, M. R., Thompson, G. G., and Payne, A. P. (1985). Quantitative studies on the effects of hormones on structure and porphyrin biosynthesis in the Harderian gland of the female golden hamster. 1. The effects of ovariectomy and androgen administration. *J. Anat.* 142, 59-72.
- Takayasu, S., and Adachi, K. (1972). *In vivo* and *in vitro* conversion of testosterone to 17 β -hydroxy-5 α -Androstan-3-one(Dihydrotestosterone).

- one) by sebaceous gland of hamsters. *Endocrinology* 90, 73-80.
- Thompson, G. G., Hordovlati, X., Moore, M. R., McGadey, J., and Payne, A. (1984). Sex differences in haem biosynthesis and prophyrin content in the Harderian gland of the golden hamster. *Int. J. Biochem.* 16, 849-852.
- Viger, R. S., and Robaire, B. (1992). Expression of 4-ene steroid 5 α -reductase messenger ribonucleic acid in the rat epididymis during postnatal development. *Endocrinology* 131, 1534-1540.
- Vilchis, F., Hernández, A., Pérez, A. E., and Pérez-Palacios, G. (1987). Hormone regulation of the rodent Harderian gland: Binding properties of the androgen receptor in the male golden hamster. *J. Endocrinol.* 112, 3-8.
- Vilchis, F., and Pérez-Palacios, G. (1989). Steroid hormone receptors and sexual phenotype of the Harderian gland in hamsters. *J. Endocrinol.* 121, 149-156.
- Vilchis, F., Langley, E., Carbón, M. A., Chávez, B., Soltis, J., and Pérez-Palacios, G. (1992). Nuclear receptors for 3,5,3'-triiodothyronine in the Harderian gland of male and female golden hamsters. *Exp. Clin. Endocrinol. (Life Sci. Adv.)* 11, 133-137.
- Woolley, G. W., and Worley, J. (1954). Sexual dimorphism in the Harderian gland of the hamster (*Cricetus auratus*). *Anat. Rec.* 118, 416-417.
- Zivin, J. A., and Waud, D. R. (1982). How to analyse binding, enzyme and uptake data: The simplest case, a single phase. *Life Sci.* 30, 1407-1422.

Distribución del receptor de andrógenos

A fin de investigar la distribución celular del receptor de andrógenos (RA) en la GH, se llevaron a cabo estudios inmunohistoquímicos utilizando anticuerpos específicos anti-RA y el método de avidina-biotina-peroxidasa descrito por Sar (1985).

Se analizaron cortes de tejidos congelados (8-10 μ), obtenidos de animales adultos intactos y de animales gonadectomizados por 72 horas.

Para la detección del RA se usaron anticuerpos policlonales (AR-52 y PA1-110) generados contra secuencias de la región amino-terminal de la proteína (Sar *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 1989). En el ANEXO de la tesis se describe el método en detalle (IX).

El análisis inmunocitoquímico mostró reactividad específica para RA en el tejido Harderiano de hámster y rata. Los resultados indicaron que en los animales intactos (Figs. 6A y 7A), el RA se localiza preferentemente en los núcleos de las células alveolares. La intensidad del marcaje mostró un patrón de tinción uniforme en la región nuclear y perinuclear de las células acinares tipo I y tipo II.

En preparaciones glandulares de animales gonadectomizados se obtuvieron resultados similares, indicando que la castración no modifica el contenido ni la distribución del RA (Figs. 6B y 7C) de la glándula.

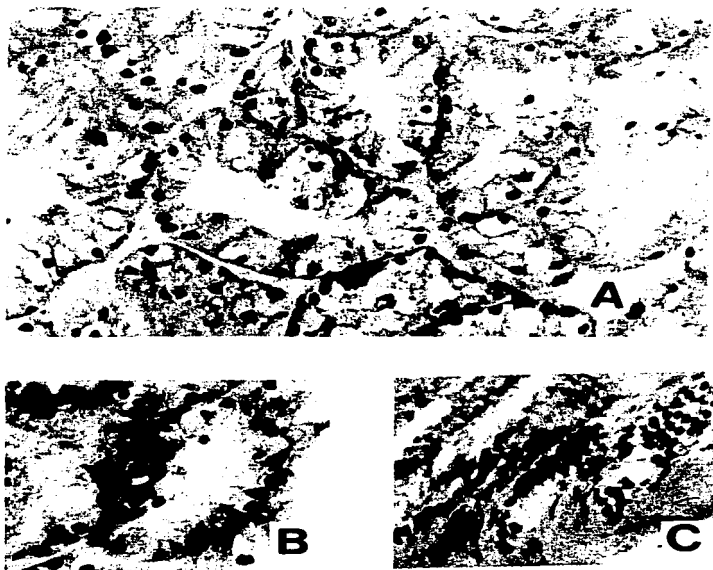


Figura 6. Detección inmunohistoquímica del receptor de andrógenos (RA), en glándula Harderiana de hámster. Cortes de tejido congelado (8μ) fueron teñidos por la técnica de la Avidina-Biotina-Peroxidasa (Sar, 1985), usando anticuerpos policlonales anti-RA (AR-32). Tejido de macho intacto (A), macho castrado (B). Sección de tejido prostático (C) procesado en paralelo (control). Notese el intenso marcaje nuclear en las preparaciones, X250.

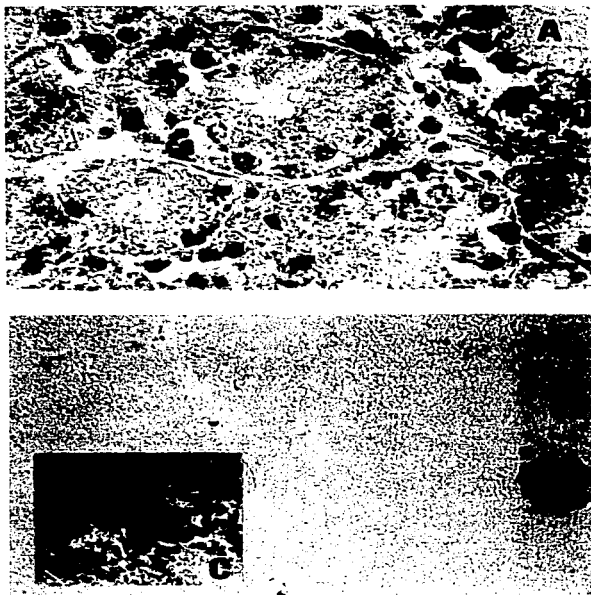


Figura 7. Detección inmunohistoquímica del receptor de andrógenos (RA) en glándula Harderiana (GH) de rata. Secciones de tejido congelado (10μ) de macho intacto (A) y macho castrado (C) fueron inmunoteñidas por la técnica de Avidina-Biotina-Peroxidasa (Sar, 1985), usando anticuerpos policlonales anti-RA (PA1-110). Corte de GH (macho intacto), procesado en ausencia de anticuerpo anti-RA (B). Notese la intensa tinción nuclear en A y C. Acumulo de porfirinas (*). X250.

VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

No obstante su amplia distribución filogenética y del número de funciones en las que parece estar involucrada la glándula Harderiana (GH), se sabe relativamente poco acerca de los factores que intervienen en su regulación. A decir de algunos autores, el estudio de la GH se encuentra en una situación muy parecida a la que se encontraba la pineal hace tres décadas (Weeb *et al.*, 1992). Varias líneas de investigación han señalado que la GH esta bajo influencia hormonal (Olcese y Wesche, 1989). La información acumulada ha sugerido que las hormonas esteroides (HE) desempeñan un papel relevante en el control endócrino de este órgano (Payne, 1994).

Los resultados del presente trabajo apoyan la idea de que las HE tienen efectos directos sobre la glándula de Harder. La identificación de sitios de unión de alta afinidad para andrógenos, estrógenos, progestágenos y glucocorticoides en un número de especies, sugiere que gran parte de los efectos hormonales son ejercidos a nivel genómico y por lo tanto están mediados por receptores intracelulares específicos. Los datos mostraron marcadas variaciones en cuanto a la presencia, concentración y expresión de cada receptor, lo cual concuerda con la diferente sensibilidad hormonal, que exhibe la glándula Harderiana de los vertebrados.

Está bien establecido que las hormonas esteroides regulan una gran variedad de actividades biológicas por medio de la modulación de la expresión génica. La habilidad para responder a estos compuestos ha sido atribuida exclusivamente a la presencia de sus correspondientes receptores hormonales (Yamamoto, 1985).

Los receptores intracelulares de esteroides pertenecen a una familia de proteínas solubles encontradas en las células de vertebrados e invertebrados que unen esteroides gonadales y adrenales, así como un número indeterminado de ligandos aun no identificados (Carson-Jurica *et al.*, 1990; Mangelsdorf *et al.*, 1995). En el modelo clásico de acción de las hormonas esteroides, se establece que los esteroides difunden a través de la membrana plasmática y se unen a receptores citosólicos y/o nucleares en la célula blanco. La unión del esteroide al receptor induce cambios conformacionales que facilitan la dimerización, el importe nuclear y la interacción con elementos de respuesta hormonal del ADN que culmina con la regulación de la expresión génica. De esta forma los

receptores de esteroides actúan como factores de transcripción ligando-específicos, dirigiendo la síntesis de proteínas (Yamamoto, 1985; Evans, 1988). Si bien se conoce poco acerca de los procesos moleculares que operan a nivel glandular, la expresión de receptores funcionales en varias especies, sugiere que estas proteínas intracelulares desempeñan un importante papel fisiológico en la regulación de la glándula Harderiana. Los reportes de Christensen y Dam (1953) y Woolley y Worley (1954) en los que se describe que la GH del hámster exhibe un marcado dimorfismo sexual y que la gonadectomía en el macho es acompañada por cambios morfológicos en esta estructura orbital representan posiblemente los primeros indicios de su control androgénico. Estudios posteriores mostraron que tanto la apariencia histológica (Hoffman, 1971; Clabough y Norvell, 1973; Payne *et al.*, 1979; Lin y Nadakavukaren, 1979; Sun y Nadakavukaren, 1980), como la actividad metabólica de la glándula de roedores (Boas y Bates, 1954; Hoffman, 1971; Payne *et al.*, 1977; Lin y Nadakavukaren, 1979, 1981; Hoh *et al.*, 1984) podían ser mantenidas con andrógenos, indicando así su participación en estos procesos.

En el presente trabajo se demostró la presencia de sitios de unión específicos para andrógenos, usando DMNT[³H] como ligando. El RA citosólico exhibe una constante de disociación (Kd) aparente de 3.0-8.0 nmol/l, con una capacidad máxima de unión de 80-125 fmol/mg proteína. Este receptor es altamente específico para andrógenos, ya que solo los esteroides que poseen actividad androgénica intrínseca (DHT, DMNT, 19-Nortestosterona y R1881) compiten por los sitios de unión de andrógenos, mientras que otros compuestos como progesterona, dexametasona, DHA y tamoxifen fueron inactivos. Se observó también que la feromona 5 α -16-androsten-3-ona no interacciona con el RA, no obstante su captación ha sido reportada en la GH de la rata (Brooksbank *et al.*, 1973). Las propiedades de sedimentación de este receptor en gradientes lineales de sacarosa muestran un coeficiente de sedimentación de 8-9S en la glándula de animales gonadectomizados de ambos sexos (Vilchis y Pérez-Palacios, 1989). Cuando el RA es marcado con 5 α -DHT[³H], el complejo hormona-receptor exhibe características de unión idénticas a las descritas para DMNT[³H]. Las concentraciones citosólicas del receptor no fueron afectadas por la castración, así las glándulas obtenidas 3, 30 y 60 días después de la gonadectomía muestran niveles similares de RA.

De estos datos se puede concluir que el RA de la glándula Harderiana del hámster juega un papel determinante en la expresión de los efectos fisiológicos que requieren de la interacción con el genoma. Este papel mediador podría ser similar al descrito previamente en otros órganos andrógeno-dependientes.

Aun cuando varios reportes sugieren que el RA, y en general los receptores de esteroides son proteínas nucleares (Evans, 1988; Carsson-Jurica *et al.*, 1990; Beato *et al.*, 1995; Mangelsdorf *et al.*, 1995), la localización subcelular de estas proteínas se ha cuestionado ampliamente (Guiochon-Mantel *et al.*, 1989; Jacobson *et al.*, 1995).

Con la utilización de anticuerpos monoclonales y/o policlonales, en estudios inmunohistoquímicos y de cotransfección se ha establecido que los RA tienen una localización predominantemente nuclear en presencia de hormona y citoplasmática cuando el ligando esta ausente (Simental *et al.*, 1991), lo cual conlleva a aceptar que se pueden encontrar también el citoplasma celular.

Si se considera que los RHEs son sintetizados a partir de un ARN mensajero simple (Carsson-Jurica *et al.*, 1990), que el esteroide es esencial para la activación del receptor y su subsecuente internalización al núcleo (Truss y Beato, 1993) y que se han identificado secuencias de aminoácidos básicos (o signos de localización nuclear) que mediante el importe nuclear de los diferentes receptores (Simental *et al.*, 1991) es permisible validar la caracterización de estos, en la fracción soluble celular.

Sin embargo, en base al hecho de que la castración modifica la distribución del RA solo en tejidos andrógeno dependientes (Sar *et al.*, 1990), se consideró de interés estudiar lo que ocurre en animales cuya glándula exhibe una diferente sensibilidad a los esteroides gonadales.

Los datos histoquímicos aquí presentados (Figs. 6 y 7, RESULTADOS), confirman la presencia de un RA inmunoreactivo en la GH de rata y hámster. Se observó que este se localiza principalmente en la región nuclear y perinuclear de los acinos glandulares. En las preparaciones obtenidas de animales intactos y castrados, las células alveolares mostraron un patrón de inmunotinción muy parecido, lo cual sugiere que las concentraciones de andrógenos no modifican la distribución ni el contenido del RA en la glándula Harderiana.

Aunque en la mayoría de las especies, la testosterona (T) representa el principal

andrógeno circulante, está bien documentado que sus efectos a nivel órgano blanco son mediados por la 5α -dihidrotestosterona (5α -DHT). Ya que la conversión enzimática de T a 5α -DHT es un prerrequisito para la inducción de respuestas hormonales (Wilson *et al.*, 1993), en éste trabajo se examinó la expresión de la 5α -esteroide reductasa en la GH del hámster, usando $T[3H]$ como sustrato (Vilchis *et al.*, 1994). Los resultados mostraron un patrón dimórfico en la actividad de la enzima Harderiana. De acuerdo a los valores de su velocidad máxima relativa, la actividad enzimática fue diez veces mayor en hembras ($V_{max}=2.8$ nmol/mg proteína) que los machos ($V_{max}=0.289$ nmol/mg proteína). Se observó que la administración crónica de T o DHT a hembras ovariectomizada induce una disminución significativa en la reductasa Harderiana. En los machos, por el contrario, la castración incrementa en forma gradual la actividad de la 5α -esteroide reductasa, así como los niveles de su ARNm (Vilchis *et al.*, 1994). Conociendo que en tejidos reproductivos la expresión de esta enzima es un proceso mediado por el RA, los resultados aquí mencionados permiten sugerir que los andrógenos modulan la transcripción de la 5α -reductasa Harderiana, ejerciendo un efecto represor sobre la expresión de su ARN mensajero.

En conjunto estos datos pueden considerarse como evidencia del efecto genómico ejercido por los andrógenos en la GH. Mediante procesos similares se podría también explicar la marcada influencia de los andrógenos gonadales sobre la actividad de la ALA-sintetasa (Menéndez-Pelaez *et al.*, 1991; Rodríguez *et al.*, 1993) y otras enzimas relacionadas con la biosíntesis de porfirinas (Thompson *et al.*, 1984), de la N-acetiltransferasa (Buzell *et al.*, 1990), hidroxindol-O-metiltransferasa (Menéndez-Pelaez *et al.*, 1988), isovaleril-acil-CoA deshidrogenasa y 2-metil-CoA deshidrogenasa (Buzell *et al.*, 1997), así como las diferencias encontradas en el número de sitios de unión para melatonina (Menéndez-Pelaez *et al.*, 1993), triiodotironina (Vilchis *et al.*, 1992), dihidropiridina (Kumar *et al.*, 1992) y receptores β -adrenérgicos (Pangerl *et al.*, 1989) y en el contenido intraglandular de melatonina (Hoffman *et al.*, 1985), somatostatina (Puig-Domingo *et al.*, 1988) y hemoproteínas (Vilchis *et al.*, 1996).

El receptor de andrógenos ha sido también identificado en la GH del conejo y otros roedores donde se ha documentado influencia endocrina, como en la rata, cobayo y ratón (datos no publicados) y presenta propiedades de unión muy parecidas a las encontradas

en el hámster.

Los efectos androgénicos sobre la GH de aves, reptiles y anfibios han sido estudiadas solo en forma esporádica. En las aves por ejemplo Baba y cols. (1988) reportaron que la T reduce las concentraciones intraglandulares de inmunoglobulinas. En el presente estudio se muestra la presencia de receptores específicos de alta afinidad en la GH de pato (*Anas platyrhynchos*) y el pollo (*Gallus domesticus*). Las concentraciones del RA en la glándula aviar son similares a aquellas encontradas en la GH de roedores. El RA citosólico parece ser mas abundante en glándulas de pollo (144.0 ± 7.0 fmol/mg proteína) que en pato (44.0 ± 4.8 fmol/mg proteína) aunque su constante de disociación aparente ($K_d = 1.0 \pm 0.16$ vs 1.0 ± 0.19 nM) fue idéntica en ambas especies (Vilchis *et al.*, 1991). Resultados preliminares sugieren la existencia de RA en la glándula de reptiles del género *Lepidochelys* y *Phrynosoma*, sin embargo en un estudio experimental en el que se utilizó testosterona [3 H] como ligando, no se pudo detectar unión específica en *Podarcis s. sicula* (Chieffi *et al.*, 1992). d'Istria y cols. (1989) han demostrado en anfibios la presencia de RA en glándulas de *Rana esculenta*, se vio que la concentración del receptor es mas alta en hembras que en machos. En esta misma especie la testosterona parece regular a la alta el ARNm del RA glandular (Minucci *et al.*, 1994). En conjunto, los datos disponibles, indican que las hormonas esteroides con actividad androgénica inducen un número de efectos regulatorios sobre la morfología y fisiología de la glándula Harderiana de los vertebrados y subrayan la importancia de los receptores intracelulares en la mediación de estos efectos.

Los estudios experimentales encaminados a establecer la participación de los esteroides ováricos en el control de la glándula Harderiana han producido resultados contradictorios. Así, mientras en algunas especies la administración de progesterona y/o progestinas relacionadas, inducen marcados efectos sobre la estructura glandular (aves), en otras especies (roedores) estos compuestos parecen estar desprovistos de actividad biológica significativa. Por ejemplo, en las ratas hembras, la administración de progesterona no afecta ni el peso (Lorincz y Lancaster, 1957) ni la concentración del pigmento glandular (Ulrich *et al.*, 1974). Aun mas, la administración crónica de noretisterona (una progestina sintética muy potente), parece no inducir efectos significativos sobre la glándula de la rata (Maiti y Sahu, 1981). Aunque varios autores han subrayado la

importancia de los esteroides ováricos en la regulación de la glándula del hámster (Moore *et al.*, 1977; Payne *et al.*, 1979; McMaster y Hoffman, 1984; Spike *et al.*, 1985, 1986) y otros roedores (Shirama y Hokano, 1992), no hay evidencias sólidas que sustenten la función de la progesterona (*per se*), en estas especies, por lo que al parecer los efectos observados, después del tratamiento con hormonas ováricas, son el resultado de la actividad combinada del estrógeno más la progesterona. Sin embargo Shirama y cols. (1981) han sugerido que la síntesis de porfirinas en la glándula del ratón está regulada por progesterona. Ellos demostraron un incremento importante en el contenido de pigmentos después de la administración de progesterona a animales adrenalectomizados y ovariectomizados y mostraron que este efecto podía ser revertido por la administración simultánea de testosterona. En las aves, por el contrario, la progesterona tiene una actividad bien definida, Gupta y Maiti (1983) presentaron evidencia que sugiere que esta hormona inhibe la actividad secretora glandular en el pato hembra. Las diferencias encontradas entre las GH de aves y roedores en cuanto a su sensibilidad a las progestinas parecen estar relacionadas a la expresión de sus receptores específicos.

Una de las características distintivas del receptor de progesterona (RP) es su regulación hormonal. Se han descrito dos poblaciones de receptores intracelulares, una de las cuales está bajo estricta regulación estrogénica y la otra que es refractaria a los estrógenos. El RP estrógeno-inducible se encuentra principalmente en los tejidos periféricos mientras que el RP estrógeno-insensible parece estar confinado a ciertas áreas del encéfalo (MacLusky y McEwen, 1978; Carsson-Jurica *et al.*, 1990).

En estudios en la glándula del hámster adulto, usando ORG2058^[3H] como ligando, se demostró la ausencia de sitios de unión para progestinas tanto en machos como en hembras (Vilchis y Pérez Palacios, 1989). Así mismo, en animales gonadectomizados, el tratamiento con benzoato de estradiol fue inefectivo en la inducción del receptor de progesterona.

Este hallazgo podría explicar en gran medida las observaciones recientes de Menéndez-Pelaez y cols (1992), en el sentido de que la administración de progesterona no modifica las concentraciones de porfirinas, ni los niveles de ARNm de la ALA sintetasa en la glándula Harderiana del hámster sirio. En estudios de unión al equilibrio, utilizando varios radioligandos específicos para RP (incluyendo ORG2058^[3H], R5020^[3H] y

progesterona [^3H]) no se ha podido detectar una interacción específica en preparaciones glandulares obtenidas de gerbos, cobayos, ratas o ratones, aun después de ser sometidos a un tratamiento prolongado con benzoato de estradiol (Vilchis y cols. en preparación). Estos datos sugieren que la GH de roedores está desprovista de un RP funcional.

En contraparte, los datos experimentales obtenidos en aves, indicaron la presencia de un componente de unión único para $\text{ORG2058}[\text{^3H}]$ (con una K_d aparente de 1-2 nmol/l) en la GH del pollo (*Gallus sp.*) y del pato (*Anas sp.*). En ambas especies la concentración del receptor fue similar (30-60 fmol/mg proteína) y mostró un coeficiente de sedimentación de 7-8S (Vilchis *et al.*, 1991). Cuando el RP fue estudiado en animales pre-tratados con benzoato de estradiol, se observó, que a diferencia del oviducto, los niveles del RP harderiano no se incrementaron, indicando que en estas especies, los sitios de unión específicos de la GH son estrógeno-insensibles (Vilchis *et al.*, 1991). Aunque se ha sugerido la participación de los esteroides gonadales en el control de la GH de anfibios y reptiles (Chieffi *et al.*, 1992), actualmente existe muy poca información al respecto. Estudios preliminares de nuestro laboratorio indican que la GH de lacertidos y tortugas contiene un RP con características similares al encontrado en GH de cerdo y conejo (datos no publicados).

Por otro lado varios reportes han sugerido que los estrógenos ováricos están involucrados en el mantenimiento de la glándula Harderiana (Woolley y Worley, 1954; Hoffman, 1971; McMasters y Hoffman, 1984). Spike y cols. (1985, 1986) informaron que la ovariectomía provoca cambios en la estructura glandular y en la producción de porfirinas en el hámster. Además se han detectado cambios en su actividad durante el ciclo estral (Shirama *et al.*, 1981), la preñez y la lactancia (Payne *et al.*, 1979).

Los estudios de Gupta y Maiti (1981, 1983) revelaron que el estradiol 17β induce mitosis y también altera las secreciones y composición celular de la glándula de los patos. Minucci y cols. (1989) reportaron que la ovariectomía causa la desdiferenciación de las células glandulares en el sapo *Bufo viridis*. Otros reportes indican que la administración de estradiol a animales ovariectomizados induce solo cambios moderados en la estructura glandular (Boas y Bates, 1954; Ulrich *et al.*, 1974).

Ya que la acción estrogénica en los tejidos blanco se ejerce principalmente a través de

sus efectos genómicos debería esperarse que la GH contuviera receptores intracelulares para estrógenos. Los datos de Weaker y cols. (1983), quienes usando una técnica autoradiográfica demostraron la captación nuclear de estradiol [^3H] en las células Harderianas del armadillo (*Dasypos sp.*) apoyan en cierta forma este concepto. Los estudios aquí presentados confirman la presencia de sitios de unión específicos para estrógenos en la GH de varias especies.

Así, el receptor de estrógenos (RE) del hámster une 17β -Estradiol en forma específica y presenta un coeficiente de sedimentación (7-8S), similar al reportado en otros tejidos estrógeno-regulados (Vilchis y Pérez-Palacios, 1989). Receptores con propiedades similares también se han identificado en las glándulas de rata, ratón, cobayo, armadillo, conejo y en reptiles como *L. olivacea* y *Phrynosoma* (datos no publicados). En base al hecho de que la administración de estrógenos no incrementó el contenido del RP en la glándula aviar, se consideró de interés explorar las características del RP en estas especies (Vilchis *et al.*, 1991). Los datos mostraron un componente único de alta afinidad para estradiol- [^3H] ($K_D = 1.6-2.4$ nmol/l), cuya capacidad máxima de unión no difiere significativamente entre la GH del pollo (75 ± 10 fmol/mg proteína) y del pato (60 ± 10 fmol/mg proteína) y que presenta una alta especificidad (Vilchis *et al.*, 1991).

Los resultados del análisis de unión sugieren que el RE harderiano posee las características adscritas a los receptores encontradas en tejidos estrógeno-sensibles como útero y/o la hipófisis (Vilchis y Pérez-Palacios, 1989; Vilchis *et al.*, 1991).

En estudios recientes se ha descrito sin embargo la identificación de un segundo subtipo de RE denominado RE β (Kuiper *et al.*, 1996; Byers *et al.*, 1997; Tremblay *et al.*, 1997). Se sabe que el gen del RE β tiene una localización cromosómica diferente, se expresa principalmente en ovario y próstata y que es capaz de activar la transcripción de un gen reportero en presencia de estradiol (Kuiper *et al.*, 1996). No obstante, a diferencia de la forma alfa, el RE β no estimula la síntesis del receptor de progesterona (Byers *et al.*, 1997; Tremblay *et al.*, 1997). Estos hallazgos permiten especular que el RE de la GH podría tener una función semejante a los receptores β . La presencia de RE en diferentes especies sugiere que estas macromoléculas están involucradas en la mediación de algunos efectos metabólicos de la glándula. Así por ejemplo se podrían explicar los efectos

estimuladores del estradiol sobre la expresión del ARNm de la proteína Harderiana FGH22 descritos recientemente (Varriale *et al.*, 1996). Aunque existe poca información del papel fisiológico de los estrógenos en la GH de anfibios y reptiles (Minucci *et al.*, 1989; 1994), los datos obtenidos en *Rana esculenta* y *Bufo viridis* demostraron la ausencia de RE en ambas especies, así como en la glándula del lacertido *Podarcis s. sicula* (d'Istria, 1991; Chieffi *et al.*, 1992).

Además de las hormonas gonadales, la GH parece ser sensible a la acción de los esteroides producidos en la suprarrenal. De hecho, se ha reconocido a los esteroides adrenales con actividad glucocorticoide como moduladores de la función glandular en varias especies. De datos reportados se conoce que la adrenalectomía y/o la administración de cortisol inducen cambios en la composición y el peso de GH (Boas y Bates, 1954). Así, el tratamiento con cortisol retarda el inicio de síntesis de porfirinas en el lumen alveolar de la rata recién nacida (Wetterberg *et al.*, 1970c), mientras que la adrenalectomía en el ratón hembra induce un incremento significativo en el contenido glandular de porfirinas (Shirama *et al.*, 1981).

Que los glucocorticoides ejercen sus efectos en la GH a través de mecanismos intracelulares fue sugerido por el trabajo de Butler y cols. (1978); ellos demostraron la captación *in vitro* de corticosterona [³H] por la glándula del pato doméstico, así como su biotransformación a 11-dehidrocorticosterona. Usando el glucocorticoide sintético dexametasona como radioligando, se demostró la presencia de un receptor específico en la GH del hámster adrenalectomizado (Vilchis y Pérez-Palacios, 1989). Sitios de unión para glucocorticoides con características similares también presentes en cobayos, ratones y en ambos lóbulos de la glándula del conejo (datos no publicados). Estas observaciones favorecen la opinión de que los efectos de los esteroides adrenales sobre la GH son ejercidos vía sus receptores intracelulares, y podría explicar, al menos parcialmente, los efectos del cortisol sobre el mantenimiento de las células secretoras de sal en las glándulas de la tortuga *Pseudemys scripta* (Chieffi Baccari *et al.*, 1996).

En base a los datos aquí presentados, se puede establecer que los esteroides de origen gonadal y suprarrenal actúan directamente sobre la glándula Harderiana a través de

mecanismos genómicos mediados por receptores. La presencia, concentración y propiedades de unión de los receptores de andrógenos, estrógenos, progestinas y glucocorticoides en la glándula de los diferentes grupos de vertebrados (Tabla 3), presentan marcadas variaciones, sugiriendo un control endócrino complejo y especie-específico.

Debido a su importante papel en la mediación de los efectos hormonales sobre la glándula Harderiana, los receptores de esteroides deben ser considerados como proteínas reguladoras clave dentro de los mecanismos fisiológicos involucrados en el control endócrino de este órgano.

Tabla 3. Distribución filogenética de los receptores de esteroides en la glándula Harderiana de vertebrados terrestres.

CLASE	RA	RE	RP	RG
<i>Amphibia</i>	+	**	N.D.	N.D.
<i>Reptilia</i>	+	+	N.D.	N.D.
<i>Aves</i>	+	+	+	+
<i>Mammalia</i>	+	+	*	+

+ = Presente

N.D. = No descritos a la fecha

* = Ausente en roedores

** = Ausente en *Rana sp.* ; *Bufo sp.*

VIII. BIBLIOGRAFIA

Aitken I.D. and Survashe B.D. (1976). A procedure for location and removal of the lachrymal and Harderian glands of avian species. **Comp. Biochem. Physiol.** **53:193-195.**

Arriza J.L., Weinberger C., Corelli G., Glaser T.M., Handelin B.L. et al. (1987). Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA. **Science** **237:268-275.**

Ballantyne B. and Fourman J. (1967). The histology and histochemistry of the Harderian gland of the domestic duck. **J. Anat.** **101:194-199.**

Bang B.G. and Bang F.B. (1968). Localised lymphoid tissue and plasma cells in paracocular and para-nasal organ system in chickens. **Am. J. Pathol.** **53:735-751.**

Beato M., Herrlich P. and Schutz G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. **Cell** **83:851-857.**

Bellaïrs A.A. and Boyd M.A. (1947). The lachrymal apparatus in lizards and snakes. **Proc. Zool. Soc. London** **118:81-108.**

Boas N.F. and Bates R.W. (1954). Role of the thyroid and anterior pituitary glands in the maintenance of the Harderian glands of the rat. **Endocrinology** **55:601-612.**

Bodyak N.D. and Stepanova L.V. (1994). Harderian gland ultrastructure of the black sea bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus ponticus*). **J. Morphol.** **220:207-221.**

Brooksbank B.W.L., Wilson D.A.A. and Clough G. (1973). The in-vivo uptake of [³H]androsta-4,16-dien-3-one in tissues of the adult male rat. **J. Endocrinol.** **57ii.**

Brownschield C.M., Niewenhuis R.J. (1978). Ultrastructure of the Harderian gland in male albino rats. **Anat. Rec.** **190:735-754.**

Bruchovsky N. and 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.**

Bubenik G.A., Purtil R.A., Brown G.M. and Grota L.J. (1978). Melatonin in the retina and the Harderian gland. Ontogeny, diurnal variations and melatonin treatment. **Exp. Eye Res.** **27:323-333.**

- Bucana C.D. and Nadakavukaren M.J. (1972). Fine structure of the hamster Harderian gland. **Z. Zellforsch.** **129:178-187.**
- Bucana C.D. and Nadakavukaren M.J. (1973). Ultrastructural investigation on the postnatal development of the hamster Harderian gland II. Male and female. **Z. Zellforsch.** **142:1-12.**
- Burns R.B. (1975). Plasma cells in the avian Harderian gland and the morphology of the gland in the rook. **Can. J. Zool.** **53:1258-1269.**
- Burns R.B. (1978). Immunological studies on the avian Harderian gland with particular reference to the domestic fowl. **Ph.D. Thesis, University of London.**
- Butler D.G., Wilson J.X. and Youson J.H. (1978). Transformation of corticosterone to 11-dehydrocorticosterone by nasal, Harderian and lacrimal glands of the domestic duck (*Anas platyrhynchos*) *in vitro*. **Gen. Comp. Endocr.** **35:475-479.**
- Buzzell G.R., Menendez-Pelaez A., Hoffman R.A., Vaughan M.K. and reiter R.J. (1990). 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. **J. Endocrinol.** **127:59-67.**
- Buzzell G.R., Hida A., Fu S. and Seyama Y. (1997). Effect of the photoperiod in modulating the androgenic control of 1-alkyl-2,3-diacylglycerol composition in the Harderian gland of golden hamster, *Mesocricetus auratus*. **J. Exp. Zool.** **277:99-105.**
- Byers M., Kuiper G.J.M., Gustaffson J-A. and Park-Sarge O. (1997). Estrogen receptor-mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. **Mol. Endocr.** **11:172-182.**
- Carson-Jurica M.A., Schrader W.T., and O'Malley B.W. (1990). Steroid receptor superfamily: structure and functions. **Endocrine Rev.** **11:201-220.**
- Clabough J.W. and Norvell J.E. (1973). Effects of castration, blinding and the pineal gland on the Harderian glands of the male golden hamster. **Neuroendocrinology** **12:344-353.**
- Coonnely O.M., Kettelberger D.M., Tsai M-J., Schrader W.T. and O'Malley B.W. (1989). The chicken progesterone receptor a and b isoforms are products of an alternate translation initiation event. **J. Biol. Chem.** **264:14062-14067.**
- Cowan F.B.M. (1971). The ultrastructure of the lachrymal salt gland and the Harderian gland in the euryaline *Malaclemys* and some closely related stenohaline emydines. **Can. J. Zool.** **49:691-678.**

- Chang C., Whelan C.T., Popovich T.C. and Kokontis J. (1989). Fusion proteins containing androgen receptor sequences and their use in the production of poly- and monoclonal anti-androgen receptor antibodies. **Endocrinology** **123:1097-1099**.
- Chieffi B.G., Minucci S., DiMateo L. and Chieffi G. (1990). Harderian gland and the lacrimal gland of the lizard *Podarcis s. sicula*. **Anat. Rec.** **226:269-278**.
- Chieffi G., Chieffi-Baccari G., DiMateo L., D'Istria M., et al. (1992). The Harderian gland of amphibians and reptilia. In: **Harderian Glands** (Webb S.M. et al., Eds.). Springer-Verlag, Berlin pp. 91-108.
- Chieffi Baccari G., DiMateo L. and Minucci S. (1996). Effects of prolactin and cortisol on the Harderian gland of the terrapin *Pseudemys scripta*, adapted to different salinities. **Anat. Rec.** **244:225-234**.
- Christensen F. and Dam H. (1953). A sexual dimorphism of the Harderian gland in hamsters. **Acta Physiol. Scand.** **27:333-336**.
- Davelar F.G., Noordzji A. and Van der Donk J.A. (1982). A study on the synthesis and secretion of immunoglobulins by the Harderian gland of the fowl. **Avian Pathol.** **11:63-72**.
- Davidheiser R.H. and Figge F.H.J. (1958). Comparison of porphyrins producing enzymes activities in Harderian glands of mice and other rodents. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **97:775-777**.
- DiMateo L., Minucci S., Chieffi-Baccari G., Pellicciari C., D'Istria M., Chieffi G. (1989). The Harderian gland of the frog *Rana esculenta*, during the annual cycle: histology, histochemistry and ultrastructure. **Bas. Appl. Histochem.** **33:93-112**.
- D'Istria M., Chieffi Baccari G., DiMateo L., Varriale B. and Chieffi G. (1991). Androgen receptors in the Harderian gland of *Rana esculenta*. **J. Endocr.** **129:227-232**.
- Ebling F.J., Ebling E., Randall V. and Skinner J. (1975a). The effects of hypophysectomy and of bovine growth hormone on the response to testosterone of prostate, preputial, Harderian and lacrymal glands in the rat. **J. Endocr.** **66:401-406**.
- Ebling F.J., Ebling E., Randall V. and Skinner J. (1975b). The synergistic action of α -melanocyte stimulating hormone and testosterone on the sebaceous, prostate, preputial, Harderian and lachrymal glands in the hypophysectomized castrated rat. **J. Endocrinol.** **66:407-412**.
- Evans R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science** **240:889-895**.

- Feria-Velasco A., Melendez C. and Jaramillo J. (1983). Sex differences in secretion pattern of neonatal rat Harderian gland under various environmental lighting conditions. **Comp. Biochem. Physiol.** **74B:709-714.**
- Figge F.H. and Davidheiser R.H. (1960). Influence of hypophysectomy on porphyrin synthesizing enzyme activity of rat Harderian glands and livers. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **103:64-66.**
- Fourman J. and Ballantyne B. (1967). Cholinesterase activity in the Harderian gland of *Anas domestica*. **Anat. Rec.** **159:17-27.**
- French F.S., Lubahn D.B., Brown T., Simental J.A., Quigley C.A. et al. (1990). Molecular basis of androgen insensitivity. **Rec. Prog. Horm. Res.** **46:1-42.**
- Grafflin A.L. (1942). Histological observations upon the porphyrin-excreting Harderian gland of the albino rat. **Am. J. Anat.** **71:43-64.**
- Green S. and Chambon P. (1988). Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. **Trends. Genet.** **4:309-314.**
- Guiochon M.A., Loosfelt H., Lescop P., Sar S., Atger M. et al. (1989). Mechanism of nuclear localization of the progesterone receptor. **Cell** **57:1147-1154.**
- Gupta S.K. and Maiti B.R. (1981). Effect of estradiol on the Harderian gland in male domestic duckling. **Mikroskopie** **38:200-203.**
- Gupta S.K. and Maiti B.R. (1983). Influence of sex-hormones on the Harderian gland activity in female domestic duckling. **Mikroskopie** **40:132-137.**
- Harder J.J. (1694). *Glandula nova lachrymalis una cum ductu excretorio in cervis et danis.* **Acta Erudit. Publ. Lipsiae** **49-52.**
- Hoffman R.A. (1971). Influence of some endocrine glands, hormones and blinding on the histology and porphyrins of the Harderian glands of golden hamsters. **Am. J. Anat.** **132:463-478.**
- Hoffman R.A. and Jones J.W. (1981). Concentrations of metals in the Harderian glands of male and female hamsters. **Comp. Biochem. Physiol.** **69A:153-156.**
- Hoffman R.A., Johnson L.B. and Reiter R.J. (1985). Harderian glands of golden hamsters: temporal and sexual differences in immunoreactive melatonin. **J. Pineal Res.** **2:161-168.**
- Hoffman R.A., Johnson L.B., Vaughan M.K. and Reiter R.J. (1989a). Interaction of Harderian glands, illumination and temperature on thyroid hormones in golden hamsters. **J. Comp. Physiol.** **158(A):697-702.**

Hoffman R.A., Wertz P. and Habeeb P. (1989b). Harderian glands of golden hamsters: morphological and biochemical responses to thyroid hormones. **J. Comp. Physiol.** **159(B):293-299.**

Hoh J.H., Lin W.L. and Nadakavukaren M.J. (1984). sexual dimorphism in the Harderian gland proteins of the golden hamster. **Comp. Biochem. Physiol.** **77B:729-731.**

Huhtala A., Huikuri K.T., Palkama A. and Tervo T. (1977). Innervation of the rat Harderian gland by adrenergic and cholinergic nerve fibers. **Anat. Rec.** **188:263-272.**

Jacobson W., Routledge J., Davies H., Saich T., Hughes I., Brinkmann A., Brown B. and Clarkson P. (1995). Localization of androgen receptors in dermal fibroblasts grown *in vitro*, from normal subjects and from patients with androgen insensitivity syndrome. **Hormone Res.** **44:75-84.**

Johnston H.S., McGadey J., Thompson G.G., Moore M.R. and Payne A.P. (1983). The Harderian gland, its secretory duct and porphyrin content in the mongolian gerbil *Meriones unguiculatus*. **J. Anat.** **137:615-630.**

Johnston H.S., McGadey J., Thompson G.G., Moore M.R., Breed W.G. and Payne A.P. (1985). The Harderian gland, its secretory duct and porphyrin content in the Plains mouse *Pseudomys australis*. **J. Anat.** **140:337-350.**

Kennedy G.Y. (1970). Harderoporphyrin: a new porphyrin from the Harderian glands of the rat. **Comp. Biochem. Physiol.** **36:21-36.**

Kuhnel V.W. (1974). Zur funktionellen morphologie der haderschen druse des schweins (Sus scropha). **Berl. Munch. Tierarztl. Wschr.** **87:3-31.**

Kuiper G.J.M., Enmark E., Pelto-Huikko M., Nilsson S. and Gustaffson J-A. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **93:5925-5930.**

Kumar P., Brodie S.G., Vaughan M.K., Menendez-Pelaez A., Reiter R.J. and Chambers J.P. (1992). Testosterone sensitive dihydropyridine binding in the Harderian gland of the male hamster. **Cell Calcium** **13:565-570.**

Lin W-L. and Nadakavukaren M.J. (1979). The androgenic effect on the fine structure of the Harderian gland in the male hamster. **Cell Tissue Res.** **198:119-127.**

Lin W-L. and Nadakavukaren M.J. (1981). Harderian gland lipids of male and female golden hamsters. **Comp. Biochem. Physiol.(B)** **70:627-630.**

Lorincz A.L. and Lancaster G. (1957). Anterior pituitary preparation with tropic activity for sebaceous, preputial and Harderian glands. **Science** **126:124-125.**

Lowental N. (1910). Nouvelles recherches sur les glandes sousorbitaire, orbitaire, orbitaire externe et lacrymale. **Bibliogr. Anat.** 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.

Lubahn D.B., Brown T.R., Simental J.A., Higgs H.N., Migeon C.J. Wilson E.M. and French F.S. (1989). Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in the family with complete androgen insensitivity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86:9534-9538.

MacLusky N.J. and McEwen B.S. (1978). Oestrogen modulates progesterin receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. **Nature** 274:276-278.

Maiti B.R. and Sahu A. (1981). Effects of a long-term treatment with norethisterone (a progesterone-only contraceptive) on the epidermis, the sebaceous glands, the meibomian gland and the Harderian gland in the cycling female rat. **Mikroskopie (Wien)** 38:309-313.

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

Marschke K.B., Tan J., Kupfer S.R., Wilson E.M. and French F.S. (1995). Specificity of simple hormone response elements in androgen regulated genes. **Endocrine** 3:819-825.

McMasters K.M. and Hoffman R.A. (1984). Harderian gland: regulation of sexual type by gonads and pineal gland. **Biol. Reprod.** 31:579-585.

Menendez-Pelaez A., Reiter R.J., Guerrero J.M., Puig-Domingo M. and Howes K.A. (1988). Sexual dimorphism in N-acetyltransferase activity, hydroxyindole-o-methyltransferase activity, and melatonin content in the Harderian gland of Syrian hamsters: Changes following gonadectomy. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 187:287-291.

Menendez-Pelaez A., Rodriguez C. and Dominguez P. (1991). 5-Aminolevulinatase synthase mRNA levels in the Harderian gland of Syrian hamsters: correlation with porphyrin concentrations and regulation by androgens and melatonin. **Mol. Cell. Endocrinol.** 80:177-182.

Menendez-Pelaez A. and Buzzell G.R. (1992). Harderian gland indoles. In: **Harderian glands.**(Webb S.M. et al.,Eds.) Springer-Verlag, Berlin pp. 219-234.

Menendez-Pelaez A., Mayo J.C., Sainz R.M., Perez M., Antolin I. and Tolivia D. (1992). Development and hormonal regulation of mast cells in the Harderian gland of Syrian hamster. **Anat. Embryol.** 186:91-97.

- Menendez-Pelaez A., Rodríguez-Colunga -M.J., Rodríguez C., Tolivia D. and Domínguez P. (1992). Effects of human chorionic gonadotropin and progesterone administration on porphyrin biosynthesis and histology of the Harderian glands in male and female Syrian hamsters. **Biol. Reprod.** **47:307-315**.
- Menendez-Pelaez A., Lopez.Gonzales M.A. and Guerrero J.M. (1993). Melatonin binding sites in the Harderian gland of Syrian hamsters: sexual differences and effect of castration. **J. Pineal Res.** **14:34-38**.
- Meusy-Dessolle N. and Tiller Y. (1992). Immunohistochemical demonstration of melatonin in the female mink Harderian gland. **Anat. Rec.** **234:549-554**.
- Miessner H. (1900). Die drüsen des dritten augenlides einiger saugethiere. **Arch. Wiss. Prakt. Trerhelk.** **26:122-154 (Berlin)**
- Minucci S., Chieffi B.G., DiMateo L. and Chieffi G. (1989). A sexual dimorphism of the Harderian gland of the toad *Bufo viridis*. **Bas. Appl. Histochem.** **33:299-310**.
- Minucci S., Chieffi Baccari G. and DiMateo L. (1994). The effect of sex hormones on lipid content and mast cell number in the Harderian gland of the female toad, *Bufo viridis*. **Tissue Cell** **26:797-805**.
- Misrahi M., Atger M., d'Auriol L., Loosfelt H., Meriel C., Fridlansky F., Guiochon-Mantel A., Galibert F., Milgrom E. (1987). Complete amino acid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **143: 740-748**.
- Misrahi M., Loosfelt H., Atger M., Meriel C., et al. (1988). Organization of the entire rabbit progesterone receptor mRNA and of the promoter and 5'flanking region of the gene. **Nucleic Acid Res.** **16:5459-5463**.
- Nigg E.A., Baeuerle P.A. and Luhrmann R. (1991). Nuclear import-export: in search of signals and mechanisms. **Cell** **66:15-22**.
- Olcese J. and Wesche A. (1989). The Harderian gland. **Comp. Biochem. Physiol.** **93A:655-665**.
- Pangerl A., Pangerl B., Buzzell G.R., Jones D.J. and reiter R.J. (1989). Characterization of β -adrenoreceptors in the Syrian hamster Harderian gland. **Neurosci. Res.** **22:456-460**.
- Panke E.S., Reiter R.J. and Rollag M.D. (1979). Effect of removal of the Harderian gland on pineal melatonin concentrations in the Syrian hamster. **Experientia** **35:1405-1406**.

- Paule W.J. (1957). The comparative histochemistry of the Harderian gland. **Ph.D. Thesis, The Ohio State University.**
- Payne A.P., McGadey J., Moore M.R. and Thompson G. (1977). Androgenic control of the Harderian gland in the male golden hamster. **J. Endocr.** **75:73-82.**
- Payne A.P., McGadey J., Moore M.R. and Thompson G.G. (1979). Changes in Harderian gland activity in the female golden hamster during the oestrus cycle, pregnancy and lactation. **Biochem. J.** **178:597-604.**
- Payne A.P., McGadey J., Johnston H.S., Moore M.R. and Thompson G.G. (1982). Mast cells in the hamster Harderian gland: sex differences, hormonal control and relationship to porphyrins. **J. Anat.** **135:451-461.**
- Payne A.P., Spike R.C. and Moore M.R. (1992). Gonadal hormones, structure and porphyrin synthesis in the rodent Harderian gland. In: **Harderian Glands** (Webb S.M. et al., Eds.). Springer-Verlag, Berlin pp. 141-152.
- Payne A.P. (1994). The Harderian gland: a tercentennial review. **J. Anat.** **185:1-49.**
- Picard D., Yamamoto K.R. (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. **EMBO J.** **6:3333-3340.**
- Puig-Domingo M., Guerrero J.M., Reiter R.J., Peinado M.A., Menendez-pelaez A., Santana C. and Webb S.M. (1988). Androgenic control of immunoreactive somatostatin in the Harderian gland of the Syrian hamster. **J. Reprod. Fert.** **82:753-759.**
- Quigley C.A., DeBellis A., Marschke K.B., El-Awady M.K., Wilson E.M. and French F.S. (1995). Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. **Endocrine Rev.** **16:271-321.**
- Reiter R.J. and Klein D.C. (1971). Observations on the pineal gland, the Harderian glands, the retina and the reproductive organs of the adult female rat exposed to continuous light. **J. Endocr.** **51:117-125.**
- Reiter R.J., Richardson B.A., Matthews S.A., Lane S.J. and Ferguson B.N. (1983). Rhythms in immunoreactive melatonin in the retina and Harderian gland of rats: persistence after pinealectomy. **Life Sci.** **32:1129-1136.**
- Rodríguez C., Menendez-Pelaez A., Vaughan M.K. and Reiter R.J. (1993). Gender-associated differences in the development of 5-aminolevulinate synthase gene expression in the Harderian gland of Syrian hamster. **Mol. Cell. Endocrinol.** **93:167-173.**
- Sakai T. (1981). The mammalian Harderian gland: morphology, biochemistry, function and phylogeny. **Arch. Histol. Jpn.** **44:299-333.**

Sakai T. (1992). Comparative anatomy of mammalian Harderian glands. In: **Harderian Glands** (Webb S.M. et al., Eds.). Springer-Verlag, Berlin pp. 7-23.

Sar M. (1985). Application of avidin-biotin complex technique for the localization of estradiol receptor in target tissues using monoclonal antibodies. **Tec. Immunocytochem.** **3:43-54.**

Sar M., Lubahn D.B., French F.S. and Wilson E.M. (1990). Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. **Endocrinology** **127:3180-3186.**

Seyama Y., Kasama T., Yasugi E., Park S-H. and Kano K. (1992). Lipids in Harderian glands and their significance. In: **Harderian Glands**. (Webb S.M. et al., Eds.). Springer-Verlag, Berlin pp. 195-217.

Shanas U. and Terkel J. (1995). Grooming expresses Harderian gland materials in the blind mole rat. **Aggressive Behav.** **21:137-146.**

Shirama K., Furuya T., Takeo Y., Shimizu K., and Maekawa K. (1981). Influences of some endocrine glands and of hormone replacement on the porphyrins of the Harderian glands of mice. **J. Endocr.** **91:305-311.**

Shirama K., Kikuyama S., Takeo Y., Shimizu K. and Maekawa K. (1982). Development of Harderian gland during metamorphosis in anurans. **Anat. Rec.** **202:371-378.**

Shirama K., Kohda M., Kohda M. and Hokano M. (1987). Effects of lighting conditions and of hormone replacement on the levels of porphyrins in the rat Harderian gland. **J. Endocrinol. Invest.** **10:79-82.**

Shirama K. and Hokano M. (1992). Harderian glands and their development in laboratory rats and mice. In: **Harderian Glands** (Webb S.M. et al., Eds.). Springer-Verlag, Berlin pp.141-152.

Silver P.A. (1991). How proteins enter the nucleus. **Cell** **64:489-497.**

Simental J.A., Sar M., Lane., M.V., French F.S. and Wilson E.M. (1991). Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. **J. Biol. Chem.** **266:510-518.**

Spike R.C., Johnston H.S., McGadey J., Moore M.r., Thompson G.G. and Payne A.P. (1985). Quantitative studies on the effects of hormones on structure and porphyrin biosynthesis in the Harderian gland of female golden hamster. I. The effects of ovariectomy and androgen administration. **J. Anat.** **142:59-72.**

- Spike R.C., Johnston H.S., McGadey J., Moore M.R., Thompson G.G. and Payne A.P. (1986). Quantitative studies on the effects of hormones on structure and porphyrin biosynthesis in the Harderian gland of the female golden hamster. II. The time course of changes after ovariectomy. *J. Anat.* **145:67-77.**
- Spike R.C., Payne A.P. and Moore M.R. (1992). Porphyrins and their possible significance in Harderian glands. In: **Harderian glands** (Webb S.M. et al., Eds.). Springer-Verlag, Berlin pp 165-193.
- Tan J-A., Joseph D.R., Quarmby V.E., Lubahn D.B., Sar M. et al. (1988). The rat androgen receptor. *Mol. Endocr.* **2:1276-1285.**
- Thiessen D.D. and Kittrell E.M.W. (1980). The Harderian gland and thermoregulation in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Physiol. Behav.* **24:417-424.**
- Thiessen D.D. (1992). The function of the Harderian gland in the mongolian gerbil *Meriones unguiculatus*. In: **Harderian Glands** (Webb S.M. et al., Eds.). Springer-Verlag, Berlin pp. 127-140.
- Thompson G.G., Hordovatz X., Moore M.R., McGadey J. and Payne A.P. (1984). Sex differences in haem biosynthesis and porphyrin content in the Harderian gland of the golden hamster. *Int. J. Biochem.* **16:849-852.**
- Tomio J.M. and Grinstein M. (1968). Porphyrin biosynthesis 5. Biosynthesis of protoporphyrin IX in Harderian glands. *Eur. J. Biochem.* **6:80-83.**
- Tremblay G.B., Tremblay A., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Labrie F. and Giguere V. (1997). Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor. *Mol. Endocr.* **11:353-365.**
- Truss M. and Beato M. (1993). Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocrine Rev.* **14:459-479.**
- Tsukahara S. and Jacobowitz D.M. (1987). Peptidergic innervation of the rat Harderian gland. *Histochemistry* **87:233-236.**
- Ulrich R., Yuwiler A., Geller E. and Wetterberg L. (1974). Effects of sex hormones and environmental lighting on rat Harderian gland porphyrin. *J. Endocrinol.* **63:99-102.**
- Varriale B. and Serino I. (1994). The androgen receptor mRNA is up-regulated by testosterone in both the Harderian gland and Thumb pad of the frog, *Rana esculenta*. *J. steroid Biochem. Mol. Biol.* **51:259-265.**
- Varriale B., Alvarez J., Prieto F. and Domínguez P. (1996). Hormonal regulation of FHG22 mRNA in Syrian hamster Harderian glands: role of estradiol. *Mol. Cell. Endocrinol.* **124:87-96.**

- Venable J.H. and Grafflin A.L. (1940). Gross anatomy of the orbital glands in the albino rat. **J. Mammal.** **21:66-70.**
- Vilchis F., Hernández A., Pérez A.E. and Pérez-Palacios G. (1987). Hormone regulation of the Harderian gland: binding properties of the androgen receptor in the male golden hamster. **J. Endocr.** **112:3-8.**
- Vilchis F. and Pérez-Palacios G. (1989). Steroid hormone receptors and the sexual phenotype of the Harderian gland in hamsters. **J. Endocr.** **121:149-156.**
- Vilchis F., Chávez B. and Pérez-Palacios G. (1991). Steroid hormone binding in the Harderian gland of birds: Characteristics of the androgen, estrogen and progesterin receptors of *Anas platyrhynchos* and *Gallus domesticus*. **Gen. Comp. Endocrinol.** **82:425-433.**
- Vilchis F., Chávez B., Cerbón M.A. and Pérez-Palacios G. (1992). The Harderian gland as a target for steroid hormone action. In: **Harderian Glands** (Webb S.M. et al., Eds.). Springer-Verlag, Berlin 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.**
- Vivien-Roels B., Pévet P., Dubois M.P., Arendt J. and Brown G.M. (1981). Immunohistochemical evidence for the presence of melatonin in the pineal gland the retina and the Harderian gland. **Cell Tissue Res.** **217:105-115.**
- Vlahakes G.J. and Wurtman R.J. (1972). A Mg²⁺ dependent hydroxyindole-o-methyl transferase in rat Harderian gland. **Biochim. Biophys. Acta** **261:194-197.**
- Walter P., Green S., Greene G., Krust A., Bornert J-M. et al. (1985). Cloning of the human estrogen receptor cDNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **82:7889-7893.**
- Weaker F.J. (1981). Light microscopic and ultrastructural features of the Harderian gland of the nine-banded armadillo. **J. Anat.** **133:49-65.**
- Weaker F.J., Villareal C. and Sheridan P.J. (1983). Cellular localization of estradiol in the Harderian gland of the female armadillo. **J. Exp. Zool.** **225:5-7.**
- Webb S.M., Hoffman R.A., Puig-Domingo M.L. and Reiter R.J. (1992). Foreword. In: **Harderian glands** (Webb S.M. et al. Eds.) Springer-Verlag, Berlin.
- Wetterberg L., Geller E. and Yuwiler A. (1970a). Harderian gland: An extraretinal photoreceptor influencing the pineal gland in neonatal rats?. **Science** **167:884-885.**

Wetterberg L., Yuwiler A., Ulrich R., Geller E. and Wallace R. (1970b). Harderian gland: Influence on pineal hydroxy-indole-o-methyltransferase activity in neonatal rats. **Science** **170:194-196**.

Wetterberg L. and Geller Y.A. (1970c). Harderian gland: Development and influence of early hormone treatment on porphyrin content. **Science** **168:996-998**.

Wetterberg L. (1972). Increase of the Harderian gland porphyrin content in castrate male hamsters dependent on light and visual function. **Life Sci.** **11:541-546**.

Winand R.J. and Kohn L.D. (1972). The binding of [³H]thyrotropin and an ³H-labelled exophthalmogenic factor by plasma membranes of retro-orbital tissue. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** **69:1711-1715**.

Woolley G. and Worley J. (1954). Sexual dimorphism in the Harderian gland of the hamster (*Cricetus auratus*). **Anat. Rec.** **118:416-417**.

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

Yokoyama Y., Kano K., Kaji K. and Seyama K. (1989). Purification and characterization of a growth factor from guinea pig Harderian gland. **J. Biol. Chem.** **264:17058-17063**.

Yoshie S. and Ogawa T. (1983). Occurrence of myoid cells in the Harderian gland of the Japanese colubrid *Rhabdophis tigrinus*. **Arch. Histol. Jpn.** **46:131-135**.

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

IX. ANEXO

ACTA ERUDITORUM

publicata Lipsiæ

Calendæ Februarii, Anno M DC XCIV.

GLANDULA NOVA LACHRYMALIS unquam duXerunt in cervicæ & d. Tab. Jacobo Hardero P. B. hinc unquam proximo in collo detecta & a hinc hinc unquam duXerunt.

Et cum communicatis volis, que cum saliva feruntur, etiam lachrymam in conversatione ad aliquos adhibent, etiam in lachryma multo secretum. Acta Verborum, ut videtur. De lachryma cervicæ quædam sunt, quædam sunt, quædam sunt. Ab his, quædam sunt, quædam sunt, quædam sunt. De lachryma cervicæ quædam sunt, quædam sunt, quædam sunt. De lachryma cervicæ quædam sunt, quædam sunt, quædam sunt.

NIENSIS FEBRUARII A.M DC XCIV.

Et cum communicatis volis, que cum saliva feruntur, etiam lachrymam in conversatione ad aliquos adhibent, etiam in lachryma multo secretum. Acta Verborum, ut videtur. De lachryma cervicæ quædam sunt, quædam sunt, quædam sunt. Ab his, quædam sunt, quædam sunt, quædam sunt. De lachryma cervicæ quædam sunt, quædam sunt, quædam sunt. De lachryma cervicæ quædam sunt, quædam sunt, quædam sunt.

Obiter notandum, quod de glandula lachrymalis nota in cervicæ d. hinc unquam, hinc unquam, hinc unquam. De lachryma cervicæ quædam sunt, quædam sunt, quædam sunt. De lachryma cervicæ quædam sunt, quædam sunt, quædam sunt.

Figura I

Manuscripto de J.J. Harder de 1694 (British Library).

ACTA ERUDITORUM

50. sicut acrisque oculorum glandula) substat. frustula ac mollis, que dicitur quædam partem ac tenuem que sita est in interiori orbitæ oculi, in partem ac tenuem oculi ad exteriori occidit, tunc quædam est, tunc partem ac tenuem. hinc dicitur oculi progreßus, cum a tum demum hinc partem ac tenuem, tunc in dicitur hinc partem ac tenuem, tunc in dicitur hinc partem ac tenuem, tunc in dicitur hinc partem ac tenuem.

Inter quibus dicitur dicitur dicitur dicitur. De lachryma cervicæ quædam sunt, quædam sunt, quædam sunt. De lachryma cervicæ quædam sunt, quædam sunt, quædam sunt. De lachryma cervicæ quædam sunt, quædam sunt, quædam sunt.

ACTA ERUDITORUM

51. sicut frons videtur, tunc quædam mollis, tunc quædam mollis, tunc quædam mollis, tunc quædam mollis, tunc quædam mollis, tunc quædam mollis, tunc quædam mollis, tunc quædam mollis.

Tab. II.

Fig. I.

A. A glandula nova lachrymalis in cervicæ. b. b. ductus novus cum saliva feruntur & glandula emergens. c. c. lachryma dicitur hinc partem ac tenuem, tunc in dicitur hinc partem ac tenuem, tunc in dicitur hinc partem ac tenuem.

Fig. II.

A. A bulbos oculi. b. b. ductus novus hinc partem ac tenuem, tunc in dicitur hinc partem ac tenuem, tunc in dicitur hinc partem ac tenuem, tunc in dicitur hinc partem ac tenuem.

Tabla 1.- Clasificación de especies en las que se ha documentado la presencia de glándula Harderiana (G.H.).

Grupo	Nombre común	G.H.	Referencia	Grupo	Nombre común	G.H.	Referencia
Clase AMPHIBIA				Orden Squamata			
Orden Anura				<i>Crotaphytus collaris</i>	•	+	(Bellairs, 1947)
<i>Rana catesbeiana</i>	Rana	Presente*	(Sakai, 1981)	<i>Phrynosoma carolinum</i>	•	+	(Sakai, 1981)
<i>Rana pipiens</i>	•	+	•	<i>Sphenomus punctatum</i>	Tuatara	+	(Bellairs, 1947)
<i>Rana esculenta</i>	•	+	(Chieffi, 1992)	<i>Typhlops diardi</i>	Serpente	+	•
<i>Rana japonica</i>	•	+	(Shirama, 1982)	<i>Cylindrophis rufus</i>	•	+	•
<i>Bufo bufo</i>	Sapo	+	•	<i>Xenopeltis unicolor</i>	•	+	•
<i>Bufo viridis</i>	•	+	•	<i>Constrictor constrictor</i>	Boa	+	•
<i>Xenopus laevis</i>	Rana Africana	+	•	<i>Trachyboa boulengeri</i>	•	+	•
Orden Urodela				<i>Natrix natrix</i>	Culebra	+	•
No estudiada				<i>Elaphe quatuorlineata</i>	•	+	•
				<i>Tamiasophis airtalis</i>	•	+	(Sakai, 1981)
				<i>Natrix fasciata</i>	•	+	•
				<i>Rhabdophis tigrinus</i>	•	+	(Yoshie, 1983)
				Orden Crocodylia			
				<i>Alligator mississippiensis</i>	Caiman	+	(Sakai, 1981)
				Clase AVES			
				Super orden Palangnathae			
				<i>Struthio camelus</i>	Avestruz	+	(Aitken, 1976)
				Super orden Neognathae			
				<i>Tringopus occidentalis</i>	Buitre	+	(Burns, 1975)
				<i>Gallus domesticus</i>	Gallo	+	•
				<i>Coturnix japonica</i>	Codorniz	+	•
				<i>Symaticus reevesi</i>	Faisan	+	•
				<i>Phasianus colchicus</i>	•	+	•
Orden Reptilia							
Orden Chelonia							
<i>Malaclemys terrapin</i>	Tortuga	+	(Cowan, 1971)				
<i>Graptemys geographica</i>	•	+	•				
<i>Graptemys barbouri</i>	•	+	•				
<i>Pseudemys scripta</i>	•	+	•				
<i>Crisemys picta</i>	•	+	•				
<i>Erysemys scripta</i>	•	+	(Sakai, 1981)				
<i>Testudo graeca</i>	•	+	(Chieffi, 1992)				
<i>Lepidochelys olivacea</i>	•	+	(Vikhis, 1992)				
Orden Squamata							
<i>Calotes vesicolor</i>	Lacertido	+	(Bellairs, 1947)				
<i>Hemidactylus maculatus</i>	•	+	•				
<i>Anguis fragilis</i>	•	+	•				
<i>Amphisbaena fuliginosa</i>	•	+	•				
<i>Lacerta vivipara</i>	•	+	•				

Tala 1.- Clasificación de especies en las que se ha descrito la presencia de glándula Harderiana (G.H.).

Grupo	Nombre común	G.H.	Referencia
Super orden Neognathae			
<i>Meleagris meleagris</i>	Pavo	+	(Borra, 1975)
<i>Pavo cristatus</i>	Pavoreal	+	"
<i>Columba palumbus</i>	Pichon	+	"
<i>Streptopelia decaisne</i>	Caviota	+	"
<i>Asio capensis</i>	Lerhuza	+	"
<i>Eudiptes cristatus</i>	Pinguin	+	"
<i>Anas platyrhynchos</i>	Pato	+	"
<i>Rhamphastus toco</i>	Tucan	+	"
<i>Corvus frugilegus</i>	Carnicja	+	"
<i>Pelecanus erythrorhynchos</i>	Pelcano	+	"
(ZAW MAMMALIA)			
En este grupo, la glándula Harderiana se ha descrito en la mayoría de las especies. Sin embargo, la glándula es AUSENTE en los siguientes Ordenes:			
Primates, incluyendo al humano; Chiroptera (vampiros y murciélagos); Carnivora (perro y gato); Perissodactyla (caballo y asno) y Artiodactyla (vacca y oveja).			
Orden Monotremata			
<i>Ornithorhynchus sp.</i>	Ornitorinco	+	(Griffiths, 1978)
<i>Thacynoglossus sp.</i>	Equidna	+	"
Orden Marsupialia			
<i>Didelphis marsupialis</i>	Zanigurya	+	(Paulk, 1957)
<i>Caluromys philander</i>	"	+	"
<i>Marmosa mexicana</i>	"	+	"
Orden Edentata			
<i>Dasyppus novemcinctus</i>	Armadillo	+	(Weaker, 1981)
Orden Insectivora			
<i>Erinaceus europaeus</i>	Puercoespín	+	(Sakai, 1981)
<i>Sorex unguiculatus</i>	Musarafa	+	"
<i>Balarionia leucicauda</i>	"	+	"
<i>Suncus murinus</i>	"	+	"
Orden Lagomorpha			
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Conejo	+	"
<i>Sylvilagus floridanus</i>	"	+	"
<i>Ochotona reference</i>	Pika	+	"
Orden Pinipedia			
<i>Odobenus rosmarus</i>	Morsa	+	"
<i>Phoca sp.</i>	Foca	+	"
Orden Cetacea (Mycetozoa)			
<i>Balaenoptera sp.</i>	Balena	+	"
<i>Megaptera sp.</i>	"	+	"
<i>Balaena sp.</i>	"	+	"
Orden Cetacea (Odontoceti)			
<i>Delphinus sp.</i>	Delfin	+	"
<i>Phocaena sp.</i>	"	+	"
<i>Delphinapterus sp.</i>	"	+	"
<i>Hyperoodon sp.</i>	"	+	"
<i>Platanista gangetica</i>	"	+	"
<i>Panopagus sp.</i>	"	+	"
<i>Tursiops truncatus</i>	"	+	(Bodyak, 1994)
Orden Sirenia			
<i>Dugong dugong</i>	Dugongo	+	(Sakai, 1981)

Tabla 1.- Clasificación de especies en las que se ha descrito la presencia de glándula Harderiana (G.H.).

Grupo	Nombre común	G.H.	Referencia
<i>Orden Artidactyla</i>			
<i>Dama sp</i>	Cervo	+	(Harder, 1694)
<i>Sus scrophia</i>	Cerdo	+	(Kühnel, 1974)
<i>Cervus elaphus</i>	Cervo	+	(Sakai, 1981)
<i>Orden Rodentia</i>			
<i>Meriones sanguiculatus</i>	Cerbo	+	(Johnson, 1983)
<i>Mus musculus</i>	Ratón	+	(Sakai, 1981)
<i>Rattus rattus</i>	Rata	+	*
<i>Mesocricetus auratus</i>	Hamster Sirio	+	*
<i>Apodemus sibiricus</i>	Ratón	+	(Sakai, 1992)
<i>Pseudomys australis</i>	*	+	*
<i>Cavia apereva</i>	Cobayo	+	*
<i>Sciurus niger</i>	Ardilla	+	*
<i>Sciurus carolinensis</i>	*	+	*

* También consultar Pavir, 1957; Kennedy, 1970; Payne, 1994.

ANALISIS INMUNOHISTOQUIMICO

PROTOCOLO

1. Los tejidos se disecan rápidamente sobre una caja de Petri mantenida en hielo.
2. Bloques de tejido de 3mm³ se congelan en Isopentano preenfriado en Nitrógeno líquido y se colocan en portaespecímenes, conteniendo Tissue Tek (Miles Inc., ILL, E.U.) como adhesivo.
3. Se obtienen cortes de 8-10µm en Criostato mantenido a -30 °C.
4. Los cortes se transfieren a portaobjetos precubierto con Histostik (Sci. Corp., Westbury N.Y.) y se dejan secar a temperatura ambiente (T.A.) por 30 min.
5. Los cortes son fijados por 10 min a T.A., en una solución amortiguadora de Fosfatos (pH 7.2) que contiene además Sacarosa y Acido Pícrico saturado*
6. Después de la fijación, las preparaciones se lavan 3 veces con una solución de Fosfatos-Salina (PBS) pH 7.4, por 5 min cada vez.
7. Las preparaciones se tratan por 20 min. con una solución de Tritón X-100 al 2% en PBS.
8. Lavar 2X con PBS a T.A. por 5 min cada vez.
9. Las preparaciones así tratadas se bloquean con Suero normal de cabra al 2%, preparado en PBS, durante 30 min a T.A..
10. Se retira el exceso de suero, y se aplica el 1º Anticuerpo a diferentes diluciones (1:100, 1:200), preparado en PBS-suero de cabra 1%, incubar 14h a 4°C en cámara húmeda.
11. Al finalizar la incubación, se deja estabilizar las muestras a T.A. -Se descarta el 1º anticuerpo y se lavan por 30 min en PBS.
12. Se incuba con el 2º anticuerpo (1:400) por 60 min. a T.A..
13. Lavar con PBS por 10 min.
14. Las muestras se ponen a reaccionar con el complejo Avidina-Biotina (ABC-Elite kit, Vector Labs. CA, E.U.) por 60 min.
15. Lavar 2 veces con PBS por 5 min cada vez.
16. Las muestras se incuban con el reactivo DAB (Diaminobencidina + peróxido de hidrógeno)** por 10 min.
17. Las muestras se lavan con una solución 100mM de Tris-HCl pH 7.6, dos veces por 5 min.
18. Las preparaciones se dejan secar a T.A., se agrega una gota de Glicerol y se coloca un cubreobjetos - se observan al microscopio.

REACTIVOS

Fijador*	Solución amortiguadora de Fosfatos 100mM, pH 7.2 /10% Sacarosa (p/v)/ 15% Acido Pícrico saturado (v/v).
Anticuerpos	1º Anticuerpo anti-RA (PA1-110; Affinity BioReagents NJ, E.U.) 1º Anticuerpo anti-RP (MA1-410; Affinity BioReagents NJ, E.U.) 1º Anticuerpo anti-RA (AR-52; cortesía Dr.FS French, Univ. Carolina del Norte). 2º Anticuerpo, IgGs (H + L) Biotiniladas anti-conejo, generadas en cabra (Vector Labs., Burlingame CA).
DAB**	Disolver 75mg de 3,3'Diaminobenzidina (Sigma Chemical Co., St. Louis MO) en 100 ml de Tris-HCl 100mM, pH 7.4 [filtrar en papel Whatman N°1] y agregar 7-8 µl de H ₂ O ₂ al 30%.