



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

11281

FACULTAD DE MEDICINA

**“CARACTERIZACION DE LAS CELULAS DEL TEJIDO
PANCREÁTICO QUE EXPRESAN RECEPTORES PARA
HORMONAS ESTEROIDES”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

Presenta :

ANGELICA MORALES MIRANDA

Facultad de Medicina



DIRECTOR DE TESIS: DR. VICENTE DÍAZ SÁNCHEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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




Doctorado
Ciencias
Biomédicas
FACULTAD DE MEDICINA

ING. LEOPOLDO SILVA
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION
ESCOLAR DE LA UNAM.
PRESENTE.


Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del Comité Académico de Doctorado en Ciencias Biomédicas que se llevó a cabo el día 28 de abril del presente año, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la MED. CIR. MORALES MIRANDA ANGELICA, con número de expediente 12916012 y número de cuenta 7808056-4 con la tesis titulada: "**CARACTERIZACION DE LAS CELULAS DEL TEJIDO PANCREÁTICO QUE EXPRESAN RECEPTORES PARA HORMONAS ESTEROIDALES**", dirigida por el Dr. José Vicente Díaz Sánchez.

PRESIDENTE: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
SECRETARIO: DRA. MARCIA IRIART URDANIVIA
VOCAL: DR. JOSE VICENTE DIAZ SANCHEZ
VOCAL: DR. DAVID KERSHENOBICH STALNIKOWITZ
VOCAL: DRA. MARIA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJIA
SUPLENTE: DR. ENRIQUE ANTONIO PEDERNERA ASTEGIANO
SUPLENTE: DR. ANDRES CASTELL RODRIGUEZ

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D. F., a 30 de abril del 2004.



Dr. Gabriel Roldán Roldán
Responsable
Facultad de Medicina



Dr. J. Javier Espinosa Aguirre
Coordinador
Doctorado en Ciencias Biomédicas.

C.c.p. Biol. Francisco Javier Incera, Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado.
Tutor(a) Dr. José Vicente Díaz Sánchez.

Teléfono 56-23-01-71 y fax: 56-23-01-70 <http://www.pdcb.unam.mx>. E-mail: pdcb@servidor.unam.mx



Doctorado Ciencias Biomédicas

BIOL. FRANCISCO J. INCERA UGALDE
JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACION DEL POSGRADO
PRESENTE

La presente es para informar a usted que el Comité Académico del Doctorado en Ciencias Biomédicas en su sesión del día 28 de junio del año en curso, después de revisar el expediente del (a) alumno (a) **MIRANDA MORALES ANGELICA**, quién ingresó el semestre 94-2, con número de expediente 12916012, al Doctorado en Ciencias Biomédicas, (plan 582), emitió una opinión favorable otorgando una prórroga de SEIS MESES para presentar el examen de grado de Doctor (a) en Ciencias Biomédicas, de acuerdo a lo que marca el Plan de Estudios correspondiente.

Agradezco su atención y le envío un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 10 de agosto 2004.
EL COORDINADOR

DR. J. JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

DEDICATORIA

**A Dios y a Maria
Por tener la fortuna de sentir su presencia**

**A mi padre Ignacio
Porque aunque no esta presente
Tengo sus bendiciones desde donde se encuentre**

**A mi madre Ma. Dolores
Por su dedicación, su fuerza y su amor
Gracias por ser el mejor ejemplo de mi vida**

**A mis hermanos Aurora Martha e Ignacio
Por haber disfrutado la vida aun con sus altas y sus bajas
Pero siempre juntos**

**A mis sobrinas (o) Paty, MariLu, Bárbara y Aurelio.....por tener la fortuna
de verlos crecer y haber compartido momentos juntos**

**A Vicente
Por ser mi petite Larousse
Por compartir conmigo durante tantos años infinidad de conocimientos
Gracias patitas..... Por hacer mi vida feliz**

A mis compañeros y amigos del laboratorio.

**A muchos seres queridos que se marcharon antes en esta vida
Con los (as) cuales hubiera disfrutado este momento**

**Y en especial a la Dra. Adela Cuellar
A quien siempre admire**

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ) por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto de tesis.

Al departamento de biología de la reproducción en el cual realice mis estudios de investigación de la presente tesis.

Al Dr. Vicente Díaz-Sánchez por sus invaluable conocimientos compartidos durante tantos años.

A mi comité tutorial, Dr. Vicente Díaz Sánchez, Dr. Jorge Larriva Sahd, y Dr. Andrés Castell por sus consejos, su tiempo y dedicación durante todos estos años.

Un agradecimiento especial al Dr. Miguel Herrera cirujano del INCMNSZ por su ayuda en la obtención de tejidos para los estudios moleculares.

A muchos otros médicos e investigadores por su apoyo y conocimientos compartidos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología *CONACyT* por su apoyo económico durante mi periodo de maestría y doctorado. Beca No. 21751

INDICE

I. RESUMEN.....	8
II. ABSTRACT	11
III. INTRODUCCIÓN.	13
Ontogenia del páncreas.....	15
Origen embrionario.....	17
Aspecto macroscópico.....	19
Irrigación e Inervación.....	20
IV. PANCREAS EXOCRINO	
Morfología celular.....	21
Fisiología.....	22
V. PÁNCREAS ENDOCRINO	
Morfología celular.....	24
Fisiología.....	28
VI. HORMONAS ESTEROIDES.....	32
VII. RECEPTORES.....	35
VIII. CITOCROMO P450 _{scc}	37
Estructura química.....	39
Expresión del P450 _{scc} y esteroidogénesis.....	40
IX. HORMONAS Y CANCER.....	42
Cáncer de páncreas.....	43
X. OBJETIVOS.....	44
XI. HIPÓTESIS.....	44

XII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
XIII. EXPRESION DEL GENE RECEPTOR DE ANDROGENOS	
Diseño experimental.....	46
Extracción del RNA total.....	47
Diseño de oligonucleótidos.....	50
XIV. EXPRESION DEL GENE CYP11A	
Extracción del RNA total.....	51
Diseño de Oligonucleótidos.....	54
XVI. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD DEL CYP11A	
Extracción de mitocondrias.....	55
Incubación mitocondria.....	56
Cuantificación de pregnenolona.....	57
XVII. TECNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA	
Técnica y soluciones.....	58
XVIII. RESULTADOS.....	63
XIX. DISCUSIÓN.....	76
XX. CONCLUSIONES.....	83
XXI. BIBLIOGRAFÍA.....	84
XXII. ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	94

I. RESUMEN

En el páncreas se ha reportado la actividad de varios complejos enzimáticos que transforman hormonas estereroideas. Se han empleado diversos modelos experimentales como la perfusión in vivo, los homogenados tisulares y el aislamiento de organelos subcelulares. Los datos obtenidos en esos modelos, mas la evidencia de la presencia de receptores para hormonas esteroideas en el tejido pancreático y el comportamiento sexualmente dimórfico de algunos tumores, son una clara evidencia de que los esteroides juegan un papel relevante en el función pancreática.

En modelos animales y en estudios epidemiológicos en humanos se ha demostrado que los andrógenos influyen en la incidencia y en la prevalencia del cáncer del páncreas. En la literatura no se había reportado en el páncreas la presencia del receptor para andrógenos ni la presencia de transcritos del gene que codifica para la expresión de la proteína. Utilizando técnicas de biología molecular como la trascrición reversa (RT) acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y el análisis por Southern Blot nos propusimos identificar en el tejido pancreático total la presencia del acido ribonucleico mensajero específico para el receptor de andrógenos (ARmRNA).

Para ese propósito se eligió como modelo experimental a la rata. Se prepararon lotes de animales en las siguientes condiciones: adultas macho, adultas hembra, neonatales, y adultos machos orquiectomizados y sustituidos con ciclopentilato de testosterona. Se obtuvo de cada lote de individuos el RNA total de los siguientes tejidos; páncreas, próstata, vesículas seminales, y testículos. A cada muestra se le analizó mediante la técnica de Northern blot para identificar la hibridación al DNA que codifica para el receptor de andrógenos. Los resultados de la hibridación fueron positivos en el páncreas para todos los grupos de estudio en el siguiente orden de magnitud: hembras adultas y animales neonatales > machos adultos castrados > machos adultos > machos adultos castrados y tratados con testosterona.

Estos resultados nos indicaron que el tejido pancreático posee actividad de transcripción del gene del receptor de andrógenos, aunque la intensidad de la señal obtenida fue mucho menor que la observada en las muestras de RNA obtenidas de los órganos que se consideran dependientes de andrógenos como la próstata y las vesículas seminales.

Otro aspecto que no había sido explorado y que nos propusimos investigar fue la capacidad de síntesis de esteroides en el páncreas a partir del precursor común que es el colesterol. Se utilizaron dos enfoques experimentales, el primero consistió en la identificación en homogenados de tejido el producto de transcripción específico (mRNA) del gene del Citocromo P450_{scc} (CYP 11A1) y el segundo y complementario fue el estudio cinético en mitocondrias aisladas de la transformación de colesterol en pregnenolona en condiciones basales y en presencia de la aminoglutetimida como inhibidor enzimático específico. Los resultados obtenidos demostraron que (a) el tejido pancreático posee la actividad de transcripción del gene CYP11A1, aunque en menor proporción que los tejidos típicamente esteroideogénicos como la suprarrenal y el testículo, y (b) las mitocondrias aisladas del páncreas fueron capaces de transformar colesterol en pregnenolona y que la adición de aminoglutetimida al medio de reacción bloquea la transformación.

En suma los resultados de ambos enfoques experimentales demuestran que en el páncreas existe el gene y la actividad enzimática necesaria para convertir colesterol en pregnenolona, la cual se reconoce como el metabolito precursor de todas las hormonas esteroideas. En el aspecto médico, existen muchas evidencias tanto epidemiológicas como clínicas de la relación entre la exposición natural o farmacológica a hormonas esteroideas y la aparición o desarrollo de diversos tipos de cáncer, los más notables son los de mama, endometrio y próstata. Sin embargo ha sido difícil el demostrar que la progresión de un tumor va en relación con las concentraciones circulantes de esteroides.

En el caso del páncreas, el tumor Quístico Papilar (PCN) es una neoplasia extremadamente rara de baja malignidad que afecta principalmente a mujeres jóvenes. Este tumor es interesante por que se ha relacionado su desarrollo y crecimiento a factores hormonales, principalmente a los esteroides sexuales. Existen en la literatura datos contradictorios sobre la expresión de receptores para hormonas esteroideas sexuales en ese tipo de tumores.

Con el objetivo de establecer alguna relación entre las características clínicas de ese tipo de tumores pancreáticos, analizamos la presencia de receptores específicos para progesterona (PR), y para las isoformas alfa y beta de estrógenos (ER alfa) y (ER beta) mediante técnicas de inmunohistoquímica, en una serie de 7 tumores quísticos papilares de páncreas. El PR fue positivo en 6 de 7 casos, el ER beta en 6 de 7 casos y el ER alfa en 2 de 7 casos. Estos datos demuestran que el PCN expresa receptores para esteroides sexuales, que los datos en la literatura que no daban como positivo al receptor de estrógenos era probablemente por que sólo se había buscado la isoforma alfa, ya que la isoforma beta se encuentra presente en la gran mayoría de los tumores analizados.

Tomada en su conjunto, la información obtenida en los modelos experimentales y en los estudios de muestras de tumores humanos, nos llevan a concluir, que el páncreas es un órgano que expresa receptores para hormonas esteroideas sexuales masculinas y femeninas, que tiene además de la capacidad de biotransformar esteroides de sintetizarlos a partir de colesterol y que algunos tumores probablemente su aparición y/o desarrollo dependan de hormonas esteroideas.

II. ABSTRACT

In pancreas the activity of several sex steroid transforming enzymes have been reported. That has been obtained in perfused organs, total tissue homogenates and subcellular organelles. These data concurrent with the description of the presence of ligand regulated steroid receptors, as well as the sexually dimorphic behavior of some pancreatic tumors, are clear evidence in support of the participation of steroid hormones in the pancreatic function.

Androgens influence the incidence and prevalence of pancreatic cancer in humans and animal models. To our knowledge there has been demonstration of the presence of neither the androgen receptor nor transcripts of the androgen receptor gene. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) Southern blotting was employed for molecular detection and measurement of the androgen receptor messenger ribonucleic acid (ARmRNA) in pancreas.

Total RNA obtained from pancreas, prostate, seminal vesicles, and testis of neonatal and adult male and female rats as well as castrated males substituted with testosterone cyclopentilate, analyzed by Northern blot technique. The levels of the AR transcripts obtained by RT-PCR in various pancreatic samples were as follows: adult females and neonatal animals > castrated adult males > adult males > castrated adult males substituted with testosterone. These results indicated that the pancreatic tissue possessed transcriptional activity of the AR gene, although to a lesser extent than the typical androgen responsive tissue (prostate and seminal vesicles).

The steroidogenic ability of the pancreas was demonstrated by two different methods: a) in tissue homogenates, the identification of Cytochrome P450 gene (CYP11A1) transcripts after RT-PCR and b) in isolated mitochondria by the Aminoglutethimide (AMG) dependent inhibition of cholesterol-pregnenolone biotransformation.

The results obtained in a series of independent experiments showed that (a) the pancreatic tissue possessed transcriptional activity of the CYP11A1 gene, although to a lesser extent than the typical steroidogenic tissues, and (b) isolated mitochondria obtained from the pancreas were able consistently to synthesize pregnenolone, furthermore, the addition of the specific inhibitor AMG blocked its synthesis. On the whole, these findings are interpreted as clear evidence of the activity of the Cytochrome P450_{scc} enzymatic complex.

Epidemiological and clinical evidence suggest that steroid hormones are intimately involved in the natural history of many cancers, including those of the breast, endometrium and prostate.

However, it has been difficult to demonstrate the progressive changes in tumor development are related to circulation levels of steroids.

Papillary Cystic Neoplasm of the pancreas (PCN) is a low malignancy tumor affecting predominantly young females. Sex steroid hormones have been involved in its development and / or growth. Estrogen receptor (ER) has been scarcely found in this tumor. Expression of ER alpha and beta isoforms and Progesterone receptor (PR) was analyzed immunohistochemistry using isoform-specific ER and PR antibodies in paraffin embedded tissue blocks from seven cases of PCN of the pancreas. ER alpha and ER beta were present in two and six tumors, respectively and PR was identified in six tumors. ER beta expression predominated over the alpha isoform in PCN. The presence of sex hormone receptors in pancreatic tumors that are predominant of young females suggests the participation of gonadal steroids in the development and control of pancreatic cancer.

III. INTRODUCCION

Durante muchos años la investigación científica ha contribuido a la comprensión de la participación de las *hormonas esteroideas* en los mecanismos de regulación, crecimiento y diferenciación de tejidos, así como a su función en órganos sexualmente dimórficos. Las hormonas esteroideas también están involucradas en la historia natural de enfermedades y neoplasias, entre los que se encuentra el cáncer de próstata, de glándula mamaria y endometrio, así como en tejidos que clásicamente no se relacionaban los efectos de dichas hormonas tal es el caso de algunos tumores del cerebro y páncreas.

En los mamíferos existen principalmente tres órganos endocrinos que se especializan en la producción de hormonas esteroides: la corteza adrenal, el ovario y el testículo. Durante el embarazo la placenta es una fuente adicional para la producción de hormonas esteroideas.

La capacidad de las células esteroidogénicas para la biosíntesis de esteroides específicos es determinada por la presencia y actividad de complejos enzimáticos codificados en genes de expresión tejido específicos. El nivel de expresión de cada enzima varía dependiendo de tres características: (1) la expresión celular y/o tisular que es determinada durante la etapa embriogénica de diferenciación celular; (2) la expresión basal en ausencia de cualquier tipo de estimulación hormonal; y (3) la expresión regulada por señales hormonales. Cada uno de estas características representa la funcionalidad de elementos que regulan distintos genes.

En el tejido pancreático de diversas especies, incluido el humano se ha descrito la actividad de las enzimas 5- α -reductasa, la 3- β -hidroxiesteroideshidrogenasa, y 17- β -hidroxiesteroideshidrogenasa, cada una de ellas involucradas en la biotransformación de hormonas esteroideas. La actividad de las enzimas antes mencionadas fue demostrada en un modelo experimental de páncreas canino, el cual se aisló, y se perfundió con testosterona radiactiva [3 HT]. Los resultados mostraron la conversión de testosterona en androstendiona y estradiol (1).

Un complejo enzimático de suma importancia en tejidos esteroideogénicos (corteza suprarrenal, ovarios, testículos y placenta), es el citocromo P450_{scc}. Este complejo se localiza en la membrana interna de las mitocondrias y tiene como función romper la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona. Esta primera reacción es considerada el paso limitante en la biosíntesis de todas las hormonas esteroideas *in vivo*.

Parte de los objetivos de esta tesis fue demostrar en extractos subcelulares de páncreas la expresión del gene CYP11A1 (citocromo P450_{scc}), y su funcionalidad. Investigaciones recientes han demostrado la presencia de este complejo en las células de la glía del cerebro en la rata, el cual no es considerado un tejido esteroideogénico clásico (2).

Las hormonas esteroideas están involucradas en el desarrollo y crecimiento de algunas neoplasias, y recientemente se ha empezado a incluir el páncreas como un órgano que puede ser también ser afectado. El cáncer de páncreas en México ocupa el 4º lugar de los tumores malignos más frecuentes del aparato digestivo. Se conoce que el adenocarcinoma pancreático afecta más a individuos del sexo masculino, y estudios clínicos han demostrado que los pacientes presentan alteraciones en el perfil de andrógenos circulantes, encontrándose una disminución de testosterona y un aumento de la dihidrotestosterona y androstendiona. Estos cambios en el perfil androgénico han sido propuestos como un marcador tumoral para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad (3).

Dentro de la gama de tumores de páncreas, el tumor quístico papilar (PCN), un tumor extremadamente raro que se ha relacionado con los efectos de las hormonas esteroideas sexuales. Los primeros reportes en la literatura datan de 1911, actualmente se conoce que tiene una incidencia casi exclusiva en mujeres (9:1), y la mayoría de los casos ocurren durante la vida reproductiva. Comprender la fisiología de las hormonas esteroideas en el páncreas, y la dependencia hormonal en los tumores pancreáticos, ayudaría a mejorar las estrategias terapéuticas y podrían surgir otras alternativas terapéuticas.

HISTORIA DEL PANCREAS

La primera descripción del páncreas data del año 300 A.C. por **Herophilus de Caledonia**, y así es nombrado durante los siguientes cuatro siglos como lo señala **Rufus de Ephesus** 100 años D.C.

El nombre páncreas se derivada del griego pan-(todo) y kreas-(carne)

Páncreas: todo carne o carne fresca

El páncreas fue descrito en sólo 14 palabras griegas las cuales se enuncian en las líneas 175 y 176 del primer diccionario griego: *ΠΕΡΙ ΟΝΟΜΑΣΙ ΑΣΤΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΜΟΡΙΑΣ*.

En la línea 175 se refiere a un tejido acostado a lo largo de la primera porción del intestino, y en la línea 176 como un tejido fresco y adiposo.

En los tratados de Aristóteles sobre historia animal la palabra **páncreas** es considerada un término popular en los estudios de zoología (4-6).

ONTOGENIA DEL PANCREAS

La ontogénesis del páncreas ha sido sujeta de controversia durante muchos años, particularmente en los últimos 50 años el tema de discusión ha sido la organogenia y la histogénesis de los islotes de Langerhans. Su origen endodérmico fue establecido, se conoce que las células endocrinas de los islotes se desarrollan de células epiteliales de los conductos pancreáticos (7).

Sin embargo el desarrollo de estudios citoquímicos y ultraestructurales así como los mensajeros químicos producidos en estas células evidenció que pudieran formar parte del concepto de células endocrinas APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation), este concepto se basa en la capacidad de las células para captar aminoácidos y descarboxilarlos (8-9). Datos en la literatura demuestran que las células APUD se derivan de la cresta neural, y se encuentran localizadas en la mucosa del tracto esófago gastrointestinal (GEP) así como en los islotes pancreáticos por lo que se determinó que pertenecen al sistema enteroendócrino (GEP).

Más tarde las células del sistema enteroendócrino (GEP), fueron agrupadas en un sistema de células endocrinas diversas, que incluyen: células del aparato respiratorio, células del hipotálamo (productoras de oxitocina), células principales de las glándulas paratiroides, células C de la glándula tiroides, células cromafines de la médula suprarrenal, por lo que en la actualidad reciben el nombre de *sistema neuroendocrino difuso* (10). Esta denominación se debe a que varias de las sustancias hormonales también se encuentran en las células nerviosas, donde intervienen como cotransmisores en sinapsis y muchas de ellas con función paracrina (11-14). En el páncreas fetal humano las primeras células que se observan son las células alfa y delta las cuales contienen glucagon y somatostatina sugiriendo que estas células tienen un papel de suma importancia para la diferenciación de las células beta, sin embargo esta relación cronológica y funcional de las células no aplica en todas las especies animales.

La estructura insular de las células pancreáticas endocrinas depende de una matriz tridimensional de colágena (15), y de varios factores como glucocorticoides, hormona de crecimiento, prolactina, lactógeno placentario y neurotrofinas los cuales influyen en el desarrollo pancreático.

Durante la vida fetal el páncreas sintetiza y almacena proteínas, como la gastrina (G), y la colecistoquinina (CCK), ambos neuropéptidos gastrointestinales están involucrados en la función endócrina y exocrina del páncreas (16). Se han descrito dos receptores para la CCK, denominados CCK-1 y CCK-2. Ambos receptores se expresan en las primeras etapas de gestación, mientras que en la vida adulta únicamente se expresa el receptor tipo 2 (CCK-2) (17).

En el humano el páncreas se desarrolla a partir de las *yemas pancreáticas dorsal y ventral* de células endodérmicas que surgen de la porción caudal del intestino anterior.

La *yema pancreática dorsal* forma la mayor parte del páncreas, aparece en primer lugar y se desarrolla en sentido craneal a una ligera distancia de la yema ventral.

La *yema pancreática ventral* se forma posteriormente, cerca de la entrada del conducto colédoco en el duodeno y crece entre las capas del mesenterio ventral. A medida que el duodeno rota hacia la derecha y adquiere forma de C, la yema pancreática ventral es arrastrada en sentido dorsal junto con el colédoco. Aproximadamente en la 7^a y 8^a semana de gestación ambos esbozos pancreáticos se fusionan formando un solo órgano. El desarrollo de la glándula pancreática se completa durante el periodo posnatal. Cada etapa de desarrollo es regulada por varios mecanismo endógenos, los procesos moleculares que regulan el crecimiento del páncreas permanecen aun desconocidos

El conducto pancreático principal se abre con el conducto biliar, por medio de la ampula de Váter y desemboca en el duodeno. La parte proximal del conducto dorsal puede persistir como un conducto accesorio denominado conducto de Santorini y desemboca en el duodeno a nivel más craneal.

Entre la 10^a y 11^a semana de gestación se desarrollan las células endocrinas de los islotes de Langerhans, a expensas de pequeños grupos de células oscuras que aparecen entre las células epiteliales de los conductos. Este proceso de brotación continúa durante la etapa fetal, de manera que pueden hallarse islotes en diversas etapas de diferenciación **(18-19)**.

Estudios moleculares y bioquímicos durante el desarrollo gestacional en el páncreas humano han demostrado que la síntesis y almacenamiento de enzimas pancreáticas, y de insulina ocurren al menos en 3 etapas:

1era. Estado de prediferenciación (día 11 de gestación /20-25 somitas) cuando el páncreas aparece como un divertículo del tubo digestivo embrionario, no existe actividad enzimática detectable.

2da. La protodiferenciación (día 12-14 de gestación /35 somitas) la actividad enzimática esta presente y sus niveles son relativamente bajos en los rudimentos pancreáticos

3era. El estado de diferenciación embriológica (del día 15 de gestación hasta el término de esta) la actividad específica de proteínas exocrinas pancreáticas se incrementa en diferentes tiempos.

Existen ramificaciones secundarias a expensas de brotes endodérmicos, sus extremos forman pequeños brotes epiteliales que se unen para formar los conductos colectores, de los extremos de estos conductos se forman los acinos pancreáticos

Las fibras aferentes viscerales transportan sensaciones dolorosas relacionadas con la distensión y opresión del tejido. Estudios inmunohistoquímicos han demostrado la presencia de terminaciones nerviosas (simpática y parasimpática) en la membrana basal de las células endocrinas, también los capilares reciben terminaciones nerviosas las cuales controlan el rango de perfusión sanguínea (20-21).

ASPECTO MACROSCOPICO

El páncreas es una glándula rosada localizada en la zona retroperitoneal, sobre la pared posterior del abdomen a nivel de las vértebras lumbares segunda y tercera.

El páncreas se divide anatómicamente en 4 porciones: *cabeza, cuello, cuerpo y cola*.

La cabeza se encuentra rodeada por la arcada duodenal, en su parte anterior se localiza la vena cava inferior, y en la parte posterior se localiza la vena mesentérica superior. La cabeza se une con el cuerpo a través del *cuello*. El cuerpo ocupa la mayor parte de la glándula y se localiza anterior a la arteria aorta abdominal. *La cola* del páncreas se extiende a lo largo de la pared posterior del abdomen, localizándose anterior a la glándula suprarrenal y el riñón izquierdo, llegando hasta el hilio del bazo.

La parte posterior del páncreas se halla desprovista de peritoneo, a excepción de la cola, de esta manera, la cabeza y el cuerpo son retroperitoneales y la cola intraperitoneal, recubierta por el ligamento esplenorrenal. La relación del páncreas con las estructuras vasculares casi siempre es constante: la vena esplénica desde el hilio esplénico a través de la porción postero superior de la cola y del cuerpo, discretamente postero inferior a la arteria esplénica, la cual se observa anterior a la cola del páncreas. La arteria gastroduodenal corre inferior a través de la superficie anterior del páncreas entre la unión del cuello con el cuerpo.

El páncreas adulto mide de 20-25 cm de longitud por 4 cm de grosor, su peso varia entre 65-100 gramos. El volumen de la glándula esta ocupada por las células acinares 84%, los conductos 4%, las células endocrinas 3% (islotes de Langerhans), los vasos sanguíneos 5%, y el estroma 4 %

(22-23).

IRRIGACIÓN E INERVACIÓN

El aporte de sangre arterial que recibe el páncreas deriva de las arterias pancreaticoduodenales superior e inferior y ramas pancreáticas de la arteria esplénica. Ramificaciones de estas arterias conforman a las arterias interlobulares e intralobulares, estas arterias contribuyen con una o más arteriolas (vasos aferentes), en cada islote, formando cientos de capilares los cuales se caracterizan por la presencia de zonas endoteliales muy aplanadas, de 0.1 μm o menos de espesor, en las que hay fenestraciones de un diámetro promedio de 50 nm, que facilitan el intercambio de materiales entre las células endocrinas y la sangre.

Las venas siguen a las arterias y se vacían en la vena porta o la vena esplénica. Los ganglios linfáticos relacionados con el páncreas son los pancreatoduodenales, pilóricos y mesentéricos superiores.

Los nervios del páncreas aparecen en gran número, partiendo del plexo celíaco y del plexo mesentérico superior, las fibras son parasimpáticos desde el nervio vago, simpáticas de los nervios esplácnicos y fibras aferentes viscerales, que principalmente transportan sensaciones dolorosas relacionadas con la distensión. Las ramificaciones nerviosas acompañan a las arterias dentro de la glándula e inervan el tejido exocrino y los islotes. (22-23).

PÁNCREAS EXÓCRINO
Acinos pancreáticos
Estructura y morfología celular

Tanto las glándulas salivales como la parte exócrina del páncreas se derivan de evaginaciones del endodermo, a partir del intestino embrionario durante la semana 14 de gestación. El conocimiento de la morfología del acino se ha hecho por microscopía, demostrando acúmulos celulares de forma redonda u ovoide constituidos por una única capa de células epiteliales.

Cada acino pancreático está formado de grupos de 15 a 100 células epiteliales (acinares) que descansan sobre una lámina basal y una red de tejido conectivo. En preparaciones histológicas teñidas con hematoxilina eosina (HE), las células acinares tienen características de células epiteliales polarizadas de forma piramidal. En su porción apical se localizan una gran cantidad de gránulos de zimógeno empaquetados que representan el estado interno de secreción enzimática, mientras que en la porción basal se localiza el núcleo y los organelos celulares.

Las células acinares sintetizan cerca de 20 diferentes tipos de proteínas digestivas que son secretados hacia la luz de los conductos pancreáticos, tienen además la capacidad de secretar un líquido isotónico encargado del transporte de las proteínas de exportación.

En los acinos se encuentra un segundo tipo celular perteneciente a las *células ductales*. Estas células tienen características epiteliales, su membrana contiene grados variables de invaginaciones, y es importante comentar que estas células ductales manifiestan un grado considerable de heterogeneidad morfológica según su localización a lo largo de los conductos (24).

Finalmente, los acinos contienen células caliciformes esparcidas entre las células epiteliales que revisten a los conductos ínterlobulares. Su función es sintetizar y secretar glucoproteínas de alto peso molecular denominadas mucinas, las cuales al hidratarse forman moco que lubrica, hidrata y protege a las células de la superficie epitelial.

PÁNCREAS EXÓCRINO

Acinos fisiología

La secreción exócrina del páncreas recibe el nombre de jugo pancreático. Es elaborado por las células acinares, centroacinares y epiteliales, contiene proteínas, iones como el potasio, sodio y calcio, así como bicarbonato. Este último compuesto es altamente alcalino y es capaz de degradar los componentes principales del alimento y neutralizar el pH ácido gástrico, sin embargo la composición final probablemente refleja modificaciones a consecuencia del sistema ductual de la glándula. Las proteínas del jugo pancreático consisten en un grupo de 15 o más enzimas y proenzimas (zimógenos), las cuales pesan entre 13,000 a 55,000 daltons y tienen un punto isoelectrico en el rango de 4.5 a 9.0

La función de las enzimas *tripsina*, *quimiotripsina* y *carboxipeptidasas* es degradar aminoácidos, mientras que la *ribonucleasa* y *desoxirribonucleasa* actúan sobre las nucleoproteínas. La *amilasa pancreática* hidroliza a disacáridos el almidón, el glucógeno y la mayor parte de los demás hidratos de carbono (no la celulosa). La *lipasa* hidroliza a los ácidos grasos y al glicerol mientras que la *colecilasa* hidroliza a los ésteres de colesterol.

A excepción de la lipasa, amilasa, ribonucleasa y desoxirribonucleasa muchas de las enzimas proteolíticas son sintetizadas y secretadas como proenzimas inactivas en el jugo pancreático y luego son activadas en la luz intestinal por acción de la *enzima enterocinasa*. La enterocinasa es secretada por el epitelio del intestino delgado en contacto con el quimo, actúa sobre el tripsinógeno y lo transforma en tripsina activa.

La regulación de la secreción exocrina es, en principio hormonal, pero también nerviosa. Las hormonas que participan en dicha regulación son: la *secretina*, la cual es secretada al torrente sanguíneo por las células enteroendocrinas (S) localizadas en el intestino delgado. Esta enzima estimula la síntesis de bicarbonato y agua principalmente (25-26).

La *colecistoquinina CCK*, sintetizada por las células enteroendocrinas (I), localizadas en el epitelio del intestino delgado. Esta hormona estimula la secreción de gran cantidad de enzimas digestivas, pero no aumenta la cantidad de jugo pancreático.

La CCK es un péptido gastrointestinal al cual se le atribuye un papel importante sobre el crecimiento del páncreas (16, 17, 27). La interferencia con análogos que neutralizan la función de la proteína (CCK), o el bloqueo del receptor, da como resultado la formación incompleta del órgano.

PÁNCREAS ENDÓCRINO
Islotes pancreáticos
Estructura y morfología celular

Los islotes fueron descubiertos en 1869 por Paúl Langerhans, y 20 años después se conoce la relación funcional del metabolismo de los hidratos de carbono y la diabetes. En 1922 Banting y Best aislaron el primer extracto de la insulina y su síntesis se realizó algunos años después (28).

El páncreas endócrino está constituido por acúmulos de células ovoides denominados *islotes pancreáticos* que se encuentran dispersos en el tejido exócrino. Aunque la distribución de los islotes es al azar, los lóbulos de la cola (en la porción esplénica) contienen un número mayor de éstos. En el páncreas humano como en la mayoría de los mamíferos, los islotes representan entre 2-3% del volumen total del tejido, equivalentes a 1 gramo. Existen evidencias que indican que el tejido pancreático contiene de 500 000 a 1 millón de islotes y cada uno con un diámetro que oscila entre 100-200 μm y están compuestos de varios cientos de células productoras de hormonas.

La mayoría de los tipos celulares de los islotes fueron descritos originalmente sobre la base de los componentes de tinción. Cuatro tipos diferentes de células endocrinas conforman el islote pancreático, en base a su nomenclatura actual, se designan por letras mayúsculas células *A=alfa*, las células *B=beta*, las células *D=delta* y las células *F=gama*. (la denominación anterior utilizaba letras griegas) (24).

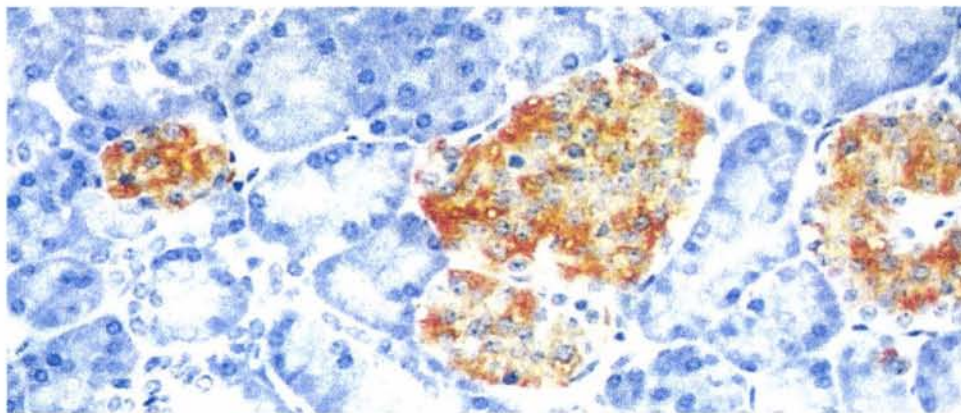
Estudios recientes basados en el contenido hormonal han demostrado la presencia de otros tipos celulares como las células **enterocromafines**. Estas células secretan concentraciones bajas de serotonina, su funcionalidad es poco conocida en páncreas y se cree que estas células pudieran constituir el origen de tumores carcinoides (29).

Las **células A:** representan aproximadamente el 20% de las células acinares en páncreas humano, se localizan en la periferia del islote y a lo largo de los capilares, su función es la síntesis de glucagon (30).

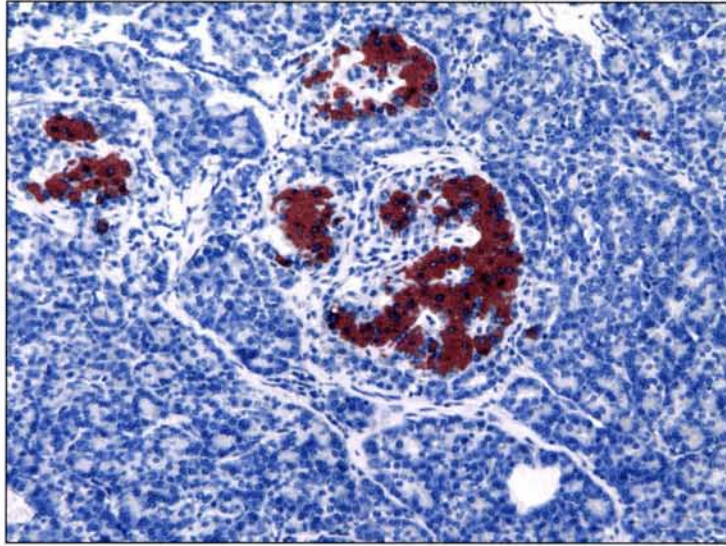
Las **células B:** constituyen el 70% del total del tejido endocrino y se localizan principalmente en la periferia y centro del islote. Histológicamente son identificadas por su afinidad con tinciones selectivas como la seudoisocianina (la cual se une de manera específica a la insulina localizada en las vesículas secretoras). Estas células son las encargadas de la producción de insulina, amilina (31), ácido γ -aminobutírico (GABA) (32-34) y factor de crecimiento neural (NGF), hasta ahora descritos. (35-37). Ultraestructuralmente las células beta contienen numerosas vesículas secretoras de aproximadamente 300 nm de diámetro, tienen características electrodensas y cristales poligonales o romboides que representan a las moléculas de insulina insoluble.

Las **células D:** se distribuyen de manera similar a las células alfa, conforman del 5-10% de la población celular en los islotes, en los roedores se localizan en la periferia del islote, tienen la capacidad de sintetizar y secretar una isoforma de somatostatina (38-39).

Las **células F:** representan alrededor del 2-5% del islote, tienen como función la síntesis del polipéptido pancreático (40).

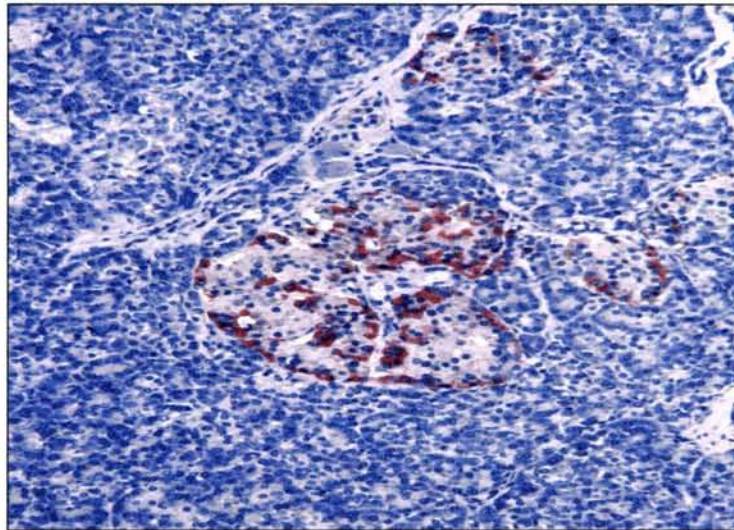


Fotomicrografía de un corte de páncreas normal humano
Se observa la distribución de acinos entre los cuales se localizan tres islotes pancreáticos
(fotografía adquirida de Novoscastra Laboratorios Ltd)



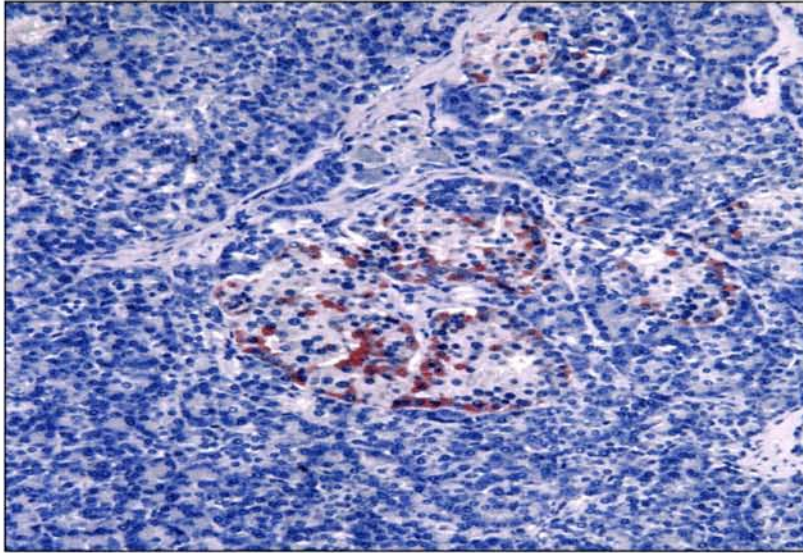
Fotomicrografía de corte de páncreas normal humano.

Técnica de inmunohistoquímica: se muestra las células B secretoras de insulina, (donde se aplico anticuerpo anti insulina), las células B se tiñeron de rojo parduzco y se usó azul de metileno como coloración de contraste (24).



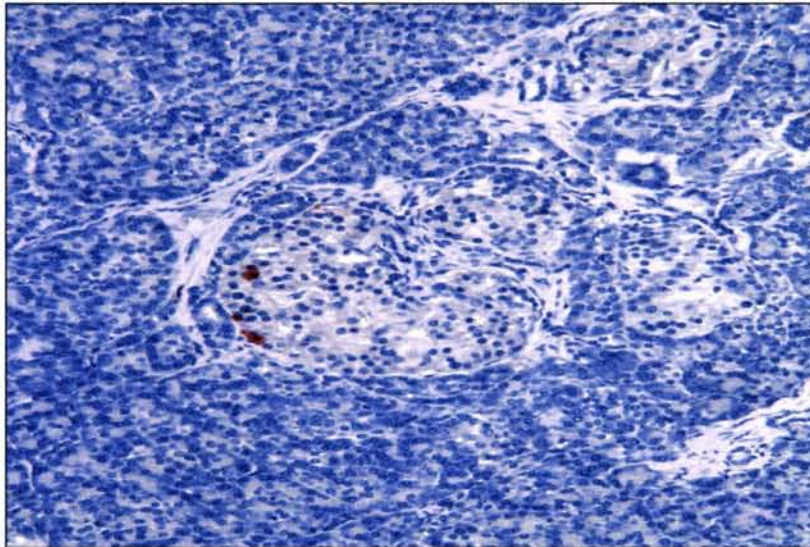
Fotomicrografía de corte de páncreas normal humano.

Técnica de inmunohistoquímica: se muestra las células A secretoras de glucagon, (mediante la aplicación de anticuerpo anti glucagon), las células A se tiñeron de rojo parduzco y se usó azul de metileno como coloración de contraste (24).



Fotomicrografía de corte de páncreas normal humano.

Técnica de inmunohistoquímica: se muestra las células D secretoras de somatostatina, (mediante la aplicación de anticuerpo anti somatostatina), las células D se tiñeron de rojo parduzco y se usó azul de metileno como coloración de contraste (24).



Fotografía de corte de páncreas normal humano.

Técnica de inmunohistoquímica: se muestra las células F secretoras de polipéptido pancreático, (mediante la aplicación de anticuerpo anti polipéptido pancreático), las células F se tiñeron de rojo parduzco y se usó azul de metileno como coloración de contraste (24).

PÁNCREAS ENDÓCRINO

Islotes pancreáticos fisiología

Como se mencionó anteriormente las células del páncreas forman parte del concepto de “sistema neuroendocrino difuso” debido a que la mayoría de las células tienen similitudes estructurales y funcionales, parecidas a las células del sistema endocrino gastrointestinal (10-14, -42).

Se ha demostrado que todas las células de los islotes están representadas en la mucosa gástrica con excepción de las *células B (beta)* que se localizan exclusivamente en los islotes pancreáticos.

La interacción entre las células es de suma importancia para el intercambio de moléculas como iones, y glucosa entre otros. Esto se lleva a cabo a través de uniones comunicantes, por lo tanto un estímulo puede inducir la liberación de insulina, o la sincronización de la actividad eléctrica entre las células beta, o al mismo tiempo tener un efecto sobre las células A y D inhibiendo o estimulando la secreción en cada una de ellas (43).

La función principal de las *células B (beta)* es la síntesis de insulina (44). El gen que codifica esta proteína se localiza en la región p-13 del brazo corto del cromosoma 11, bioquímicamente constituida por dos cadenas polipeptídicas, denominadas A y B, unidas por dos puentes disulfuro, un tercer puente intracatenario enlaza las posiciones 6 y 11 de la cadena A.

La insulina se sintetiza como preproinsulina, su RNA mensajero se traduce como un péptido de 109 aminoácidos, el cual es transformado por enzimas microsomales a proinsulina que contiene 86 aminoácidos que se repliegan sobre sí a la altura del aminoácido 35 formando los puentes disulfuros, esta molécula es transportada al aparato de Golgi y mediante dos endoproteasas, que actúan sobre los aminoácidos 3-arginina y 1-lisina, forman una molécula de 31 aminoácido conocida como péptido C, el cual no tiene actividad biológica conocida. Se libera de las células beta en cantidades equimolares a la insulina.

La insulina tiene efectos sobre varios procesos metabólicos en el músculo, hígado y el tejido adiposo. El efecto directo más importante de la insulina es su capacidad para estimular el transporte del glucógeno a través de casi todas las membranas celulares.

La secreción de insulina se produce en respuesta a estímulos exógenos, y depende sobre todo de la concentración de glucosa en la sangre. La glucemia elevada favorece la liberación de insulina, mientras que las glucemias normal o disminuida bajan la secreción de insulina. Se ha demostrado que la liberación de insulina requiere calcio. Se ha propuesto que los gránulos maduros que contienen insulina en las células beta, se unen y alinean en los microtúbulos que se contraen después de la exposición a concentraciones altas calcio intracelular, estimulando su secreción. Otro modulador importante en la secreción de insulina es el cAMP, la glucosa induce directamente su síntesis, sin embargo elevaciones de cAMP no estimulan la liberación de insulina en ausencia de glucosa por lo que se ha propuesto que existen otros estímulos para su secreción.

La adrenalina y noradrenalina ejercen regulación hormonal, inhibe la secreción de insulina por unión con receptores *alfa 2* adrenérgicos en las células B (beta), y la estimula por unión con receptores *beta* adrenérgicos. En condiciones normales el efecto general de esta regulación es inhibitorio.

La secreción de insulina es estimulada por el *péptido inhibidor gástrico (GIP)* liberado por las células K de la mucosa del intestino delgado, se cree que es el factor intestinal fisiológico que normalmente estimula la secreción de insulina después de la ingesta de glucosa, y que actualmente se denomina polipéptido insulínotropo dependiente de glucosa.

La *inervación autónoma* de los islotes también influye sobre la secreción hormonal, la estimulación de las fibras parasimpáticas aumenta la secreción de insulina (mediada por acetilcolina como transmisor), mientras que la estimulación de las fibras simpáticas inhibe la liberación de insulina por unión de la noradrenalina liberada por las terminales nerviosas a los receptores alfa 2 de las células beta.

Las *células A (alfa)* tienen como función la síntesis y secreción de *glucagon*. La síntesis de esta hormona es codificada por un gen que se localiza en el cromosoma 2, consta de 29 aminoácidos, se deriva de una molécula de 160 aminoácidos. El proglucagon da origen a varios péptidos: (péptido relacionado con glicentina, glucagon, péptido semejante a glucagon 1 (GLP-1, del inglés glucagon-like peptide 1) y péptido semejante a glucagon 2 (GLP-2 del inglés glucagon-like peptide 2). En las células alfa se sintetiza únicamente el glucagon. La concentración de glucagon en suero durante el ayuno, es en promedio, de 75pg/ml y su vida media varía de 3-6 minutos. Su función principal es la liberación del glucógeno almacenado (glucogenólisis), el mantenimiento de la gluconeogénesis y la promoción de la cetogénesis mediante la activación del cAMP en el hepatocito (45).

Las *células D (delta)* sintetizan un polipéptido denominado *somatostatina* constituido por 14 aminoácidos. Se conoce otro subtipo, secretado en el cerebro y en el aparato gastrointestinal constituido por 28 aminoácidos, ambas isoformas se secretan en forma inactiva como presomatostatina. Tiene como función regular la secreción de otras hormonas sintetizadas en los islotes (31,38,46). Para ejercer su acción cuenta con cinco receptores (SSTR) (47), los cuales están acoplados a la proteína G y son activados por fosfatasa. Su acción principal es la prolongación del tiempo de vaciamiento gástrico, la disminución de la producción de ácido gástrico y gastrina, la disminución de la secreción exógena del páncreas.

Las *células F (gama)* se localizan en su mayor parte (80 a 85%) en la porción posterior de la cabeza del páncreas. Estudios moleculares y bioquímicos han demostrado que sintetizan el *polipéptido pancreático (PP)*, hormona de 36 aminoácidos involucrada en la regulación y secreción del páncreas exocrino. Dicho péptido es vertido a la circulación mediante oscilaciones del tono colinérgico que a su vez es regulado por la ingesta de alimentos y las concentraciones de glucosa en la sangre. Los efectos fisiológicos del polipéptido pancreático (*PP*) es la inhibición de la secreción de bicarbonato y la relajación de la vesícula biliar. La utilidad clínica del *PP* fue marcador de neoplasias insulares, sin embargo puede elevarse en ausencia de tumores, en enfermedades inflamatorias y en insuficiencia renal (48).

HORMONAS ESTEROIDEAS

Los **esteroides** son una subclase de lípidos que contienen una estructura básica de 4 anillos unidos referidos como ciclopentanoperhidrofenantreno. Los esteroides comprenden una subcategoría de compuestos químicos que forman parte de una larga familia de sustancias que incluyen entre otras a las vitaminas A, E, K y al colesterol.

El colesterol (Chole=bilis stereos=solido) contiene 27 átomos de carbono y todas las hormonas esteroides se sintetizan a partir de éste. Las células específicas en los tejidos esteroidogénicos pueden sintetizar colesterol *de novo* a partir de acetato, ó pueden movilizar ésteres el colesterol intracelular o importar lipoproteínas del plasma. Cerca del 80% del colesterol celular proviene de lipoproteínas circulantes. Existen dos tipos principales de lipoproteínas, las de *baja densidad (LDL)* y las de *alta densidad (HDL)*. Cada una se une a receptores específicos localizados en la superficie celular que éstos se expresan en pequeñas vesículas que unen a las LDL en circulación y se internalizan a la célula por endocitosis.

En condiciones fisiológicas el 20% de la capacidad esteroidogénica depende de la biosíntesis de colesterol intracelular. El colesterol intracelular libre es regulado por las lipoproteínas de *baja densidad LDL*, estas lipoproteínas inhiben la síntesis de colesterol reduciendo la actividad de la enzima hidroximetilglutaril Co-A reductasa (HMG-CoA), responsable de la biosíntesis del colesterol. La esterificación de colesterol importado así como el número de receptores para LDL, en la superficie celular se regula a la baja. Se conoce que las lipoproteínas de *alta densidad (HDL)* no son usadas para la biosíntesis de esteroides (49).

Un gran número de factores intervienen en la regulación del acceso del colesterol a la membrana interna en la mitocondria. Participan una proteína acarreadora de ésteres, de 13.5 kd, un péptido activador de esteroidogénesis de 3.2 kd y una proteína de 8.0 kd. Este conjunto de proteínas son capaces de enlazar al colesterol y transferirlo a la membrana interna en la mitocondria y subsecuentemente iniciar el primer paso de la esteroidogénesis (50-56).

La pregnenolona se forma a partir del colesterol. El proceso se realiza eliminando al carbono 20 a través de una vía de varios pasos intermedios, 20-hidroxicolesterol, 22-hidroxicolesterol y 20-22 hidroxicolesterol. Tres diferentes enzimas están involucradas, sin embargo una sola proteína cataliza la reacción completa. Esta enzima es la misma en todos los tejidos esteroidogénicos, se localiza en la membrana interna de la mitocondria y recibe el nombre de *citocromo P450_{scc}*.

Durante la ruptura del colesterol los electrones son transferidos por esta enzima a través de un sistema que transporta electrones constituido por una proteína que no contiene un grupo heme y que une al hierro el cual existe en forma soluble en la matriz mitocondrial. Esta proteína acepta los electrones de NADPH y los transfiere a la *adrenodoxina reductasa* localizada en la membrana mitocondrial (57). El humano tiene un solo gen que codifica a la adrenodoxina reductasa, aunque existen productos de corte y empalme que producen dos formas de RNA mensajero. La importancia funcional de ambas isoformas se desconoce. Una vez iniciada la síntesis a partir del colesterol, los productos finales dependen de las enzimas en el tejido específico, así se forman las cuatro clases principales: *glucocorticoides, mineralcorticoides, androgenos y estrógenos*.

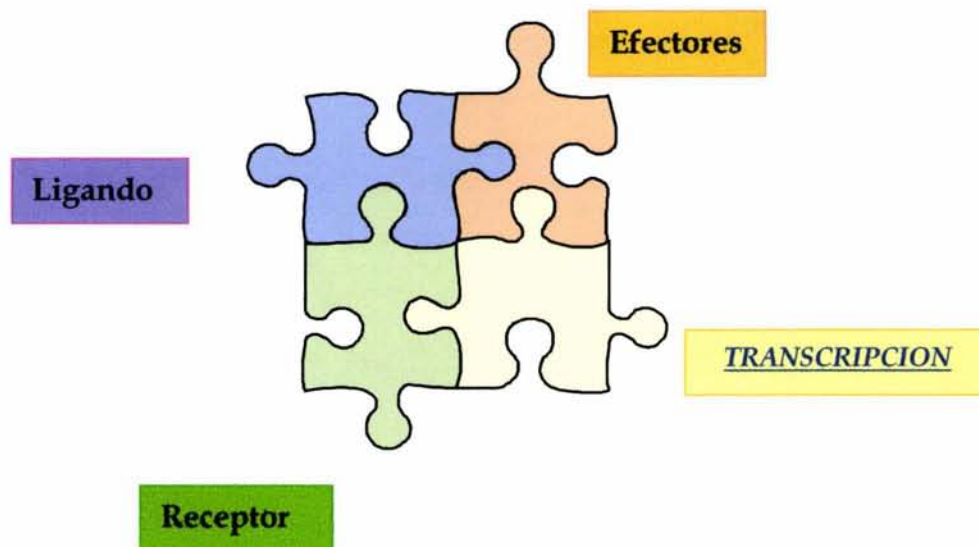
Los esteroides sintetizados son vertidos a la circulación o al sistema linfático donde son transportadas por proteínas como la SHBG (globulina de unión a las hormonas esteroides), también llamada TeBG (proteína transportadora de hormonas esteroides sexuales). La SHBG o TeBG es una glicoproteína de origen hepático que pertenece a la familia de las globulinas, es regulada entre otros factores por glucocorticoides, insulina, y prolactina. Otros tejidos donde se ha demostrado su expresión son la placenta humana y el cerebro (58-59).

La ABP (proteína de unión a andrógenos), es otro miembro de las proteínas transportadoras de esteroides. Es regulada por la hormona estimulante del folículo (FSH) y los andrógenos, mientras que las hormonas tiroideas y los estrógenos aumentan su síntesis. Ambas globulinas (SHBG y ABP), se encuentran codificadas en un mismo gen, pero esta última es de origen testicular (sintetizada por las células de Sertoli), las diferencias entre ambas son debidas a la glucosilación en el sitio de síntesis (60). La SHBG y la ABP interactúan con proteínas localizadas en la membrana plasmática de los tejidos hormono dependientes generando señales de transducción que estimulan la actividad de la adenilato ciclasa y la acumulación de AMPc intracelular.

Existen factores que generan una modificación en la capacidad de unión de la proteína con sus receptores, como los ácidos grasos (45) y los carbohidratos, los cuales se requieren para el reconocimiento del receptor con la membrana (45). Pardridge y col. (61) postulan que el mecanismo de difusión de las hormonas esteroides a un órgano blanco depende de la velocidad del flujo sanguíneo, y de la velocidad de disociación unidireccional del complejo entre la proteína y el receptor, así como la permeabilidad de la membrana a cada uno de los esteroides.

RECEPTORES

Los receptores son proteínas que regulan la función de los genes en las células humanas. Estudios realizados para calcular la cantidad de receptores que contiene cada célula blanco reportan que son aproximadamente 10,000 moléculas, lo que representa el 0.01% del total de la masa celular (62). En el modelo clásico del mecanismo de acción hormonal los esteroides libres ingresan desde el torrente circulatorio por difusión pasiva. Dentro de las células se unen a receptores específicos, localizados en el compartimiento nuclear o citoplasmático. En ausencia del ligando los receptores se mantienen en una forma inactiva, asociados a complejos de proteínas de choque térmico Hsp90 Hsp70 y Hsp60 (63-65). Una vez formado el complejo esteroide receptor, el receptor sufre cambios en su conformación que permite la formación de dímeros del receptor. La forma de dímero interactúa con secuencias específicas del DNA de alta afinidad. Esas secuencias se denominan *elementos cis* y están localizados en el extremo 5'. La unión del receptor al DNA activa ó reprime transcripción de algunos genes.

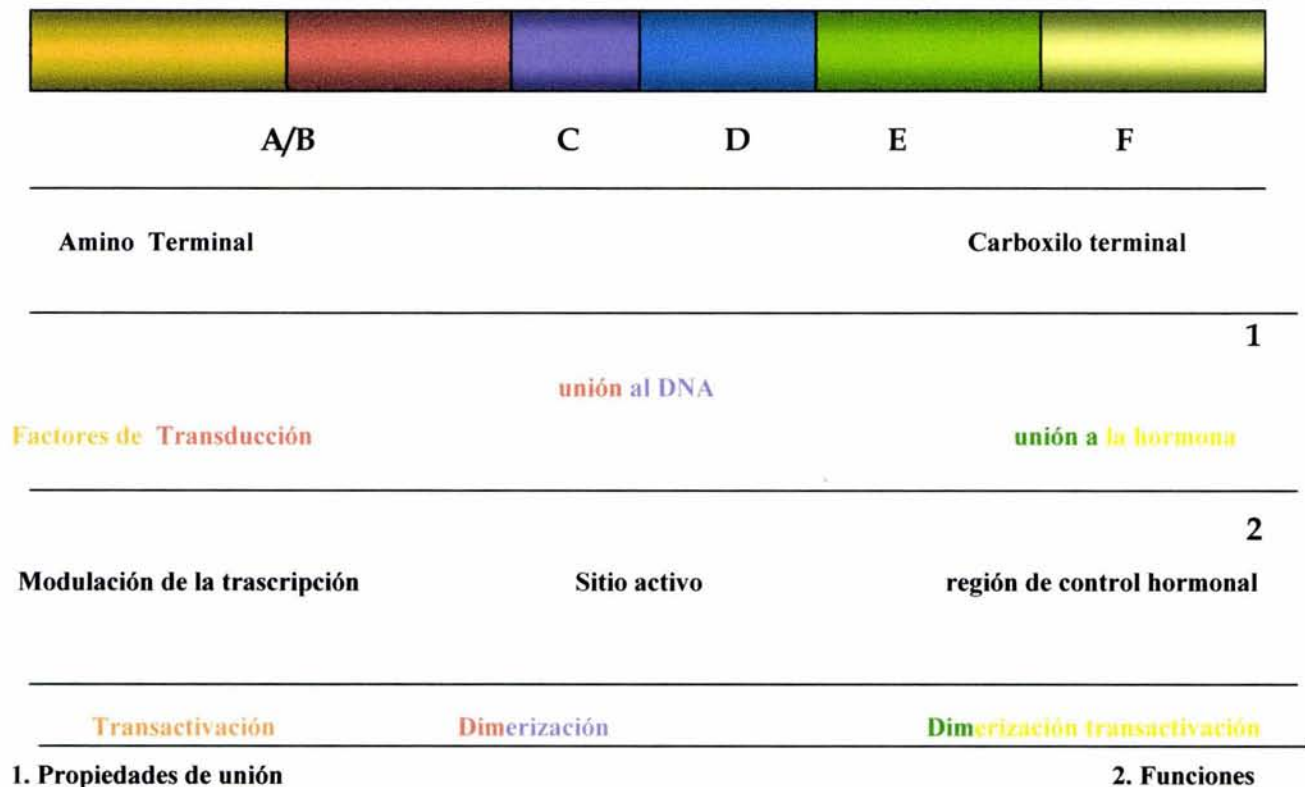


Mecanismo de acción de los receptores para hormonas esteroides

Ligando: natural o artificial. **Receptor:** subtipos, isoformas, y variantes. **Efectores:** elementos de respuesta al DNA. co-reguladores, activadores, represores, así como proteínas integradoras.

Los elementos cis que regulan la expresión de los genes se dividen en 4 grupos principales: *promotores, elementos de respuesta a los esteroides (SER), silenciadores y estimuladores independientes de las hormonas*. Todos los receptores para hormonas esteroides comparten una estructura básica similar constituida por:

- 1) Un dominio de unión al DNA altamente conservado (DBD).
- 2) Un dominio de unión a la hormona (HBD) que es altamente conservado entre la familia de los receptores para esteroides.
- 3) Una región localizada entre el DBD y HBD.
- 4) Un dominio amino terminal (N-terminal) que es la región hipervariable de los receptores (66-68).



Estructura general de los receptores para hormonas esteroides.

CITOCROMOS P450

Antecedentes históricos

El descubrimiento de la función fisiológica de los citocromos P450 se hizo en 1962 y atrajo la atención de muchos bioquímicos quienes fueron los encargados de investigar las propiedades físicas y químicas de estas proteínas. Utilizando técnicas de espectro fotoquímica se demostró por primera vez la participación del citocromo P450 en la hidroxilación de esteroides en el carbono-21 por los microsomas en la corteza adrenal. Al mismo tiempo en diferentes bacterias se demostró la presencia de los citocromos P450s. Su purificación fue relativamente sencilla ya que todos estos citocromos son solubles.

El citocromo P450 fue identificado en tejidos de vertebrados, invertebrados y plantas. En la mayoría de los casos los citocromos se localizaron en la fracción microsomal. El papel fisiológico de esta familia de proteínas fue atribuido a enzimas que utilizaban NADH ó NADPH como fuente de equivalentes reductores para la reacción de oxidación.

En 1965, se demostró que el sistema de 11- β -hidroxilasa contenía el sistema de oxigenación en las mitocondrias en la corteza adrenal. El sistema de reductasa fue fraccionado por cromatografía en una familia de proteínas ferrosas y una flavo proteína la cual era capaz de reducir a la proteína ferrosa por NADPH. Esta proteína mostraba un espectro de absorción similar a las ferredoxinas, lo cual la hizo merecedora de llamarse *adrenodoxina*.

Por otra parte, estudios sobre el citocromo P450 que contenía el sistema de oxigenasa en los microsomas del hígado demostró que proteínas no férricas también estaban involucradas en este sistema. Se consideraron dos componentes proteicos, el citocromo P450 y el citocromo NADPH reductasa c, el cual transfería electrones desde NADPH al citocromo P450 (69-70).

La gran familia de los genes P450 esta subdividida en familias, subfamilias, y P450 individuales.

Las familias están designadas por números romanos, las subfamilias por letras, y los P450 individuales por números arábigos.

Los P450 que contienen más del 59% de aminoácidos similares se designan por una misma subfamilia genética, los P450 que contienen menos del 40% de aminoácidos similares representan miembros de familias genéticas diferentes.

Los genes que codifican la super familia P450 deben tener las siguientes características:

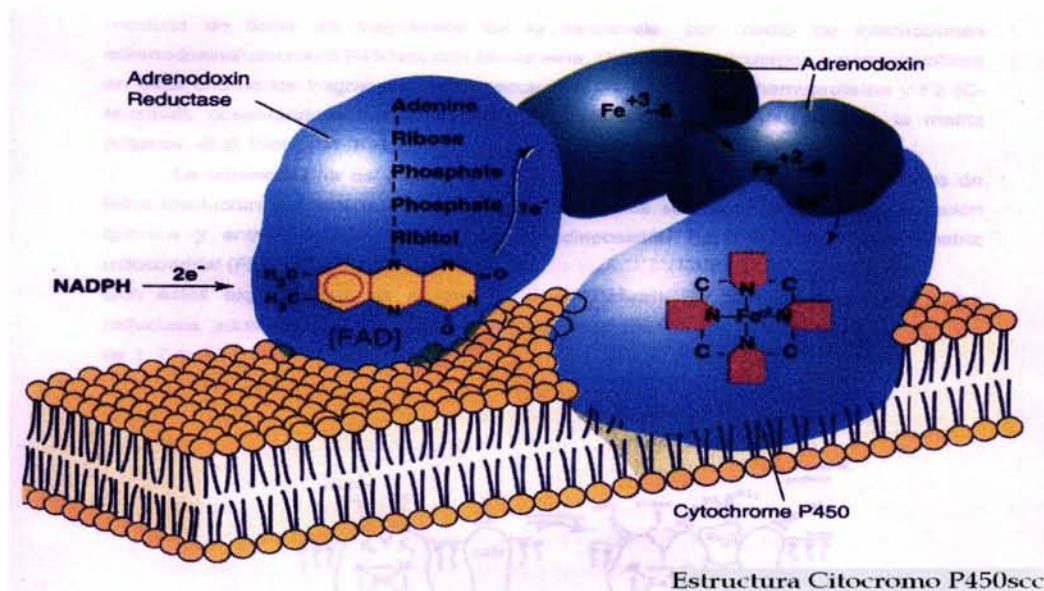
- (1) Contener un grupo HEME no covalente.**
- (3) Usar equivalentes reducidos NADPH (algunas ocasiones NADH), y un átomo de oxígeno, obtenido del oxígeno atmosférico el cual tiene como función oxigenar al sustrato.**

En los mamíferos los P450 se dividen en dos clases dependiendo de su localización intracelular y de la enzima que recibe los electrones. Hay dos enzimas mitocondriales, el citocromo P450_{scc} (por sus siglas en inglés side-chain cleavage), y el citocromo 11-β-hidroxilasa (71). En el humano el DNA sintetiza ambas proteínas mitocondriales. El genoma del citocromo P450_{scc} se localiza en el cromosoma 15 en la región 15q23-q24, constituido por 9 exones, 5 intrones y contiene aproximadamente 20 Kb. Los citocromos P450 son proteínas altamente estables, estudios *in vitro* indican que los RNA mensajeros que codifican al citocromo P450_{scc}, al citocromo P450_{c11}, al citocromo P450_{c17}, y al citocromo P450_{c21} tienen una vida media que fluctúa entre 5 a 30 horas.

ESTRUCTURA QUIMICA Citocromo P450_{sc}

Estudios basados en la actividad enzimática indican que cambios en las concentraciones sanguíneas de esteroides producen cambios en el nivel de enzimas esteroidogénicas específicas.

En el tejido testicular y adrenocortical la actividad enzimática permanece constante durante la vida adulta, aunque el nivel de esteroides secretados por estos dos órganos muestra fluctuaciones temporales. En contraste en los folículos del ovario la actividad de las enzimas en las células de la granulosa cambia durante las etapas del desarrollo folicular. Como consecuencia los esteroides ováricos secretados fluctúan durante el ciclo reproductor femenino. Fluctuaciones rápidas de esteroides no reflejan cambios en el nivel enzimático ya que están determinadas por la regulación del substrato, el balance de la síntesis *de novo* y la degradación metabólica normal.



Estructura química del citocromo P450_{sc} localizada en la membrana interna de la mitocondria.

EXPRESION DEL P450scc *Vía esteroidogénica*

En todos los tejidos esteroidogénicos el precursor a partir del cual se sintetizan las hormonas esteroideas es el colesterol, el citocromo P450scc se encarga del rompimiento de la cadena colateral del colesterol y da lugar a la pregnenolona (P5), evento que se localiza en la membrana interna de las mitocondrias en los tejidos esteroidogénicos.

El poder reductor para la reacción del citocromo P450scc se aporta en forma de NADPH mitocondrial a través de la enzima málica, el citrato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ (NADAP-ICDH) y la transhidrogenasa (TH).

El citocromo P450scc esta acoplado a una cadena respiratoria que consta de una flavo proteína aceptora de electrones denominada *adrenodoxina reductasa* (AR), una proteína transportadora de electrones con centro fierro-azufre, denominada *adrenodoxina* (adx) y el *citocromo P450scc*.

El citocromo P450scc se expresa en las tres zonas de la corteza adrenal, en el testículo en las células de Leydig, y en el ovario en las células de la granulosa de la teca interna, dependiendo del estado de crecimiento del folículo. Otros tejidos donde se ha reportado la expresión citocromo P450scc es en placenta y cerebro.

Falta página

N° 41

HORMONAS ESTEROIDEAS Y CANCER

Durante el pasado siglo muchas contribuciones científicas se han realizado al estudio del cáncer. En 1966 el Premio Nóbel de Medicina se otorgó al Dr. Charles Brenton Huggins quien demostró la regresión de algunos tipos de neoplasias bajo manipulación endocrina (72). A partir de entonces en la literatura científica se ha documentado la regresión en el tamaño de algunas neoplasias como el cáncer de próstata, de mama, de endometrio y ovario, posterior a tratamientos con antagonistas de hormonas esteroides.

Se conoce que el aumento o disminución en la expresión de los receptores a esteroides esta íntimamente relacionada al grado de diferenciación de las células cancerosas, al grado de invasión, y a la respuesta a los diferentes tratamientos hormonales.

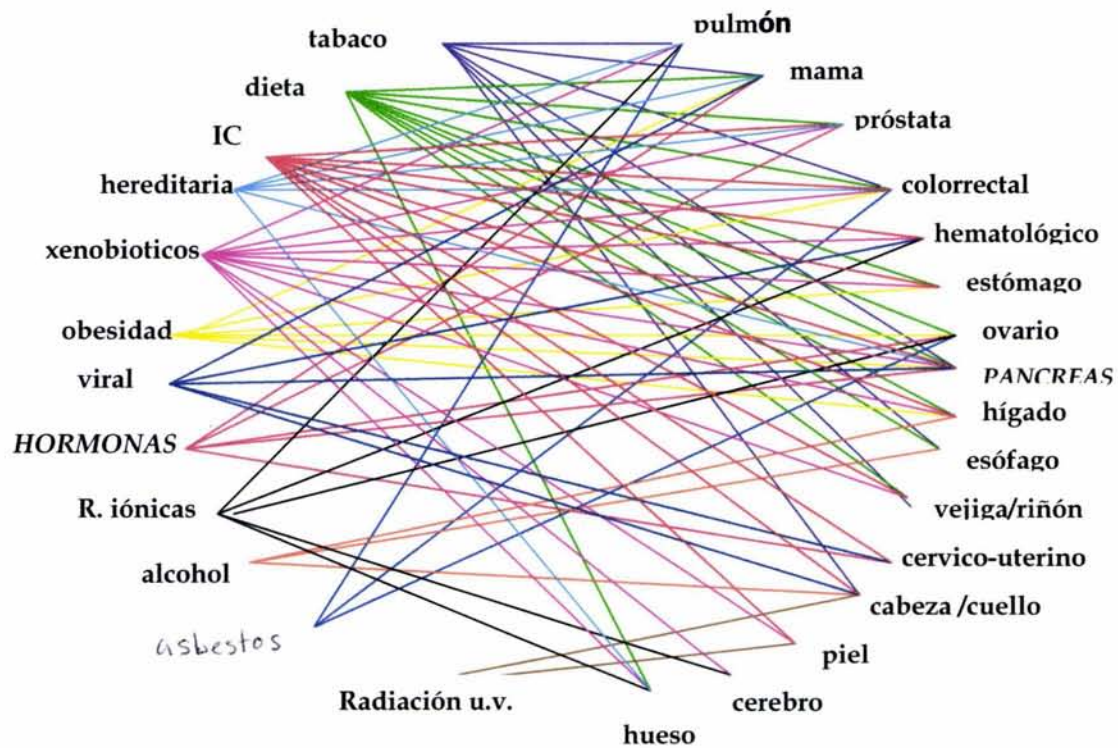


Diagrama donde se muestra los factores más comunes y los órganos blancos en el desarrollo de enfermedades neoplásicas malignas (93).

CÁNCER DE PÁNCREAS

El *cáncer de páncreas* ocupa un 10% de todas las neoplasias del aparato digestivo, su incidencia se ha triplicado en los últimos 40 años, se desconoce la causa de este incremento. Ocupa el 14º lugar de mortalidad entre los cánceres más comunes (incluyendo el cáncer de pulmón, de glándula mamaria y colorrectal) (73-76).

Es más frecuente en el sexo masculino 3:1 sobre el sexo femenino, sin embargo esta relación disminuyó en la última década, lo cual pudiera indicar que actualmente las mujeres son diagnosticadas más oportunamente con esta neoplasia. La edad promedio son adultos mayores de 40 años y su sobrevida a 5 años es extremadamente baja alcanzando un 2%. Los mecanismos moleculares y genéticos del cáncer pancreático permanecen aún desconocidos. Se han propuesto factores etiológicos asociados como el tabaquismo, alcoholismo y ciertos carcinogénicos industriales (nitrosamidas). La dieta parece ser otro factor predisponente debido a los contenidos elevados de proteínas y grasas, las cuales pudieran relacionarse con un incremento prolongado y sostenido de la secreción de enzimas pancreáticas como la colecistoquinina que tiene un efecto trófico sobre las células pancreáticas. Es importante mencionar que enfermedades como la pancreatitis crónica y la obstrucción ductal pudieran ser causas asociadas a la neoplasia.

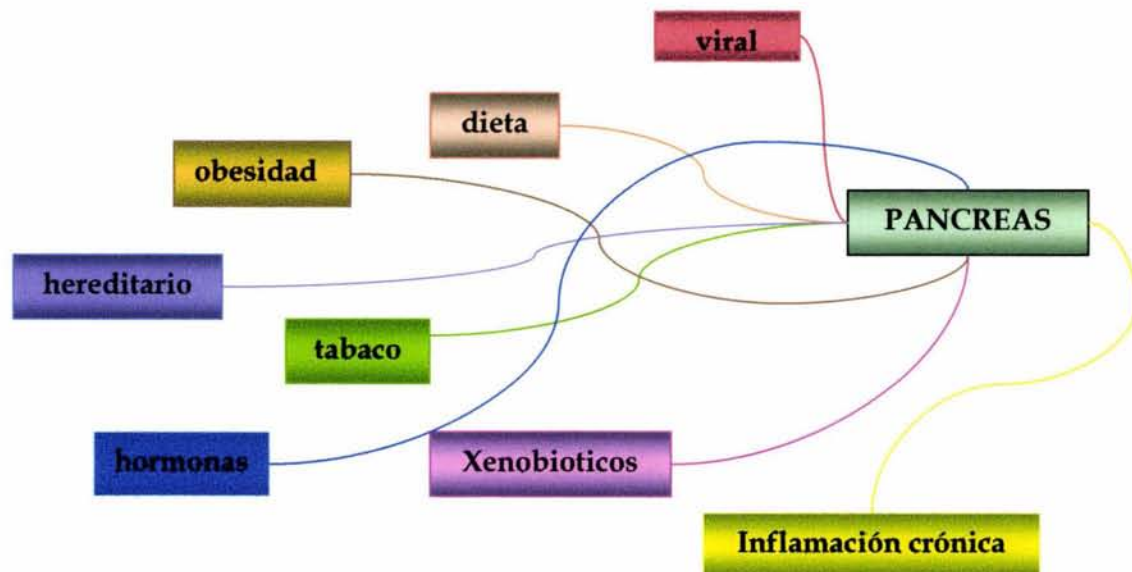


Ilustración que muestra los factores más comunes asociados en el desarrollo del cáncer pancreático

OBJETIVO GENERAL

Identificar la actividad de síntesis de esteroides y la expresión de receptores para hormonas esteroideas en el tejido pancreático.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar la expresión de la transcripción del gene para el receptor de andrógenos en el páncreas utilizando modelos animales en diferentes condiciones endocrinas.
2. Demostrar la presencia de transcritos del gene CYP11A1 (citocromo P450scc), en preparaciones de mitocondrias aisladas, y en homogenados de tejido pancreático demostrar la presencia y funcionalidad del complejo enzimático P450scc.
3. Analizar que tipos de células expresan receptores para el receptor de estrógenos en el páncreas normal y tumoral usando técnicas de inmunohistoquímica.

HIPÓTESIS

El desarrollo ontogénico del páncreas, plantea la posibilidad de que el páncreas tenga funciones de síntesis y transformación de hormonas esteroideas semejantes a las que ocurren en los denominados tejidos esteroideogénicos clásicos. Existen evidencias experimentales que demuestran la actividad de enzimas que transforman esteroides en el páncreas en diversos modelos animales y en el humano. En el campo clínico se han relacionado ciertos tipos de tumores pancreáticos con el sexo y la edad de los individuos afectados. Por todo lo anterior se propone que el páncreas tiene la capacidad de síntesis de hormonas esteroideas a partir de colesterol. Además de sintetizar hormonas esteroideas el páncreas responde a los esteroides sexuales como un tejido blanco, esta característica se la confiere la presencia de receptores para hormonas esteroideas.

MATERIAL y METODOS

Reactivos para biología molecular

- **Animales de laboratorio: ratas adultas machos y hembras de la cepa Wistar.**
- **Reactivos y soluciones** de Sigma-Aldrich.
- **RNA/later** de Ambion.
- **GeneScreen plus membranas** de DuPont.
- **Placas radiográficas** (Kodak X-OMAT).
- **Reactivos para reacción de polimerasa** de Perkin Elmer.
- **Oligonucleótidos sintetizados** por Gibco-BRL.

Reactivos para inmunohistoquímica

- **Poly-L-Lysine solución** de Sigma Diagnostics Inc.
- **Reactivos y soluciones** de Sigma-Aldrich.
- **Anticuerpos primarios** de Santa Cruz (Bioselec S de R.L.).
- **Anticuerpos secundarios** de INC.
- **Solución diluyente de anticuerpos** de Zymed Laboratories Inc.
- **3,3´diaminobenzidine tetrahydrochloride-plus kit** de Zymed Laboratories Inc.

Metodología empleada.

1. **Extracción de RNA.**
2. **Transcriptasa reversa (RT).**
3. **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**
4. **Diseños de oligonucleótidos.**
5. **Southern Blot.**
6. **Técnica de inmunohistoquímica.**

**DISEÑO EXPERIMENTAL
RECEPTOR DE ANDROGENOS**

EXPERIMENTO # 1

Para realizar los estudios de biología molecular del receptor de andrógenos se diseñó un experimento colocando grupos de animales (n=6) con las siguientes características:

Grupo	Características	Tratamiento
I (n=6)	Neonatales	- -
II (n=6)	Ratas adultas hembras	-
III (n=6)	Ratas adultas machos	-
IV (n=6)	Ratas adultas machos gonadectomizados	-
V (n=6)	Ratas adultas machos gonadectomizados	Substituidos con ciclopentilato de testosterona 5 mg/Kg.

TABLA 1. Diseño experimental para la expresión del receptor de andrógenos.

EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Extracción de RNA total

Oligonucleótidos y reacción de RT-PCR

En el experimento diseñado para la expresión del receptor de andrógenos se utilizó como modelo experimental a ratas de la cepa Wistar. Los grupos experimentales se prepararon como se especifica en la *TABLA 1*. Después del sacrificio se obtuvieron por disección el páncreas, próstata, vesículas seminales y un fragmento de músculo diafragmático. Se designaron como tejidos control positivo para la expresión del gene del receptor de andrógenos (RA), próstata y vesículas seminales. Como tejido control negativo músculo diafragmático, y tejido pancreático como experimental. Todos los tejidos se procesaron simultáneamente, se aisló el ácido ribonucleico total (RNAt) y su concentración fue determinada por espectrofotometría UV. Muestras de 20 µg de RNA fueron desnaturalizadas y sometidas a electroforesis en un gel de agarosa al 1 % con formaldehído, para después ser transferidas a una membrana de nitrocelulosa y fijadas (cross-linked), al vacío durante 2 horas a 80°C. La membrana fue prehibridada durante 18 horas a 42°C en una solución de formamida al 50 %, 2X SSC (0.15M cloruro de sodio, 0.15M citrato de sodio), 4X sol. de Denhart, 0.2 % sulfato dodecílico de sodio, (SDS) y 100 µg/ml de ácido desoxiribonucleico (DNA) desnaturalizado de esperma de salmón, para después ser hibridada por 18 horas a 42°C empleando el método de random primer (Primer-it II, Stratagene, La Jolla CA), y usando un fragmento del cDNA del receptor de andrógenos marcado con [³²P]-dCTP, la actividad específica aproximada de la marca fue de 1.3×10^8 pm/µg DNA. Después del proceso la membrana fue colocada sobre una película radiográfica (Kodak X-OMAT) y expuesta durante 24 horas a -70°C.

El RNA total (1 µg) se utilizó como templado para la síntesis de DNAc mediante la reacción combinada de RT-PCR. Transcriptasa reversa (25 U), oligo (dt) (180 pmol), y de cada dNTP's (1.0 mM) del estuche comercial de (Perkin Elmer ThermoStable rTth Reverse Transcriptase RNA-PCR Kit). La amplificación de cada DNAc por PCR se llevo a cabo con la Taq Polimerasa (5.0 U), con 68 pmol de cada oligonucleótido en un volumen final de 100 µl.

Como controles **internos negativos** se utilizo:

Músculo diafragmático (experimento #1).

Como control **internos positivos** se utilizo:

Próstata y vesículas seminales (experimento #1).

Diseño de los Oligos: Con base en la secuencia del DNA del receptor de andrógenos previamente descrita por Lubahn (77), se diseñaron y sintetizaron los oligonucleótidos para generar el fragmento del DNAc del receptor de andrógenos. Los pares de oligos utilizados se muestran en la pagina 46.

También se sintetizaron oligonucleótidos para generar un fragmento del DNAc del gen constitutivo de la ciclofilina.

Ciclofilina CF-1 Sentido 5'- CCC CAC CGT GTT CTT CGA CAT-3'

Ciclofilina CF-2 Antisentido 5'- AGG TCC TTA CCG TTC TGG TCG-3'

Cada una de las reacciones de amplificación del receptor de andrógenos y de ciclofilina, se llevo a cabo en el termociclador automático (Perkin Elmer) y consistió de 1 ciclo de 2 minutos a 95°C, seguido de 32 ciclos (2 minutos a 95°C, 2 minutos a 55°C, 2 minutos a 72°C), finalizando con 1 ciclo de 10 minutos a 72°C.

Southern blot. Los productos de la reacción de RT-PCR (10 μ l) fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % y visualizados empleando una tinción de bromuro de etidio. El tamaño de los productos se determinó por comparación directa con el corrimiento simultáneo de los fragmentos del DNA de ϕ X174RF DNA/Hae III (marcador molecular), posteriormente se transfirieron por capilaridad a membranas de nylon en presencia de SSC 10X (citrato de sodio 0.3M, NaCl 3M). Los ácidos nucleicos se fijaron covalentemente a la membrana mediante la exposición a luz ultravioleta durante 1 minuto. La membrana se prehibridó en SDS 7 % y fosfatos (Na_2HPO_4) 0.30 M durante 1 hora a 65°C. Al término del tiempo se adicionó la sonda interna específica para el receptor de andrógenos (RA), o ciclofilina según el caso, marcadas con [^{32}P]-dCTP. Al término de 18 horas de hibridación, las membranas fueron lavadas en altas condiciones de astringencia (SSC 2X, SDS 0.1 %), a temperatura ambiente y durante 5 minutos a 65°C. Después del proceso de hibridación la membrana fue expuesta en una placa de rayos X (Kodak X-OMAT) durante 10 minutos, y se realizó el análisis densitométrico.

**DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS
ANDROGENOS**

SUBTIPOS

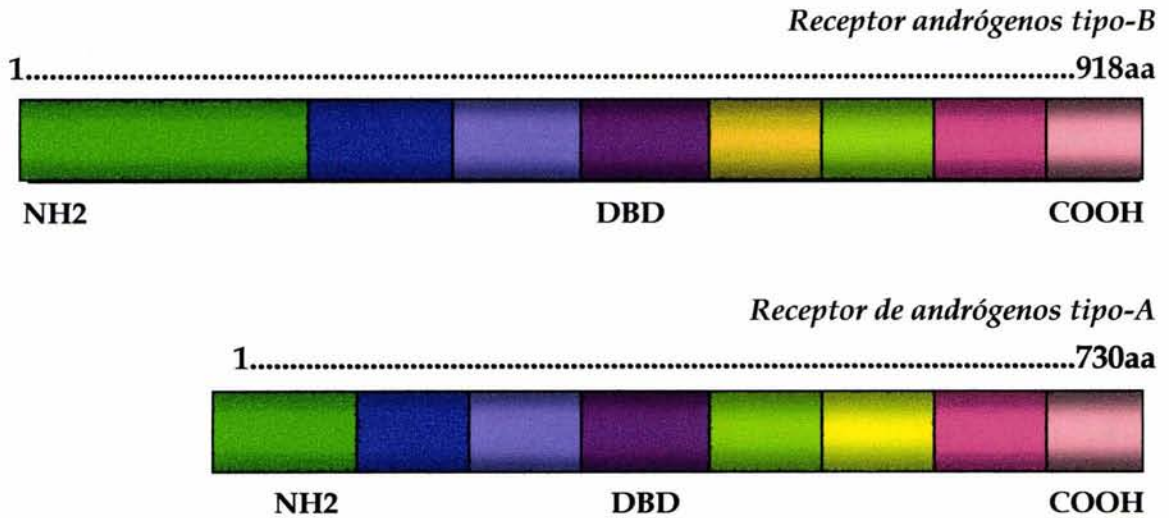


FIGURA 3. Subtipos del receptor de andrógenos tipo A y B

Oligonucleotidos para el receptor de andrógenos isoforma tipo-B

A 3 Sentido: 5' CAC AGG CTA CCT GGT CCT GG 3'



A 6 Antisentido: 5' CGC ATC AAG CTG GAG AAC CCG 3'



Tamaño del fragmento obtenido: 865 pb

Oligonucleotidos para ciclofilina

Sentido: 5' CCC CAC CGT GTT CTT CGA CAT 3'



Antisentido: 5' AGG TCC TTA CCG TTC TGG TCG 3'



Tamaño del fragmento obtenido: 453 pares de bases (pb).

EXPRESION DEL GENE CYP11A
Extracción de RNA total

EXPERIMENTO # 2

El modelo experimental fue diseñado con ratas hembras adultas de la cepa Wistar, de aproximadamente 300 gramos de peso. Se sacrificaron y se obtuvieron por disección el páncreas, las glándulas suprarrenales, los ovarios, y un fragmento de músculo esquelético. Los tejidos designados como tejidos control positivo para la expresión del gene CYP11A1 fueron las glándulas suprarrenales y los ovarios, como tejidos control negativo músculo esquelético y diafragmático, y el tejido pancreático como problema. Todas las muestras de tejido fueron procesadas simultáneamente. Se aisló el ácido ribonucleico total (RNAt) y su concentración fue determinada por espectrofotometría UV. Muestras de 20 µl fueron desnaturalizadas y sometidas a electroforesis en un gel de agarosa al 1 % con formaldehído, para después ser transferidas a una membrana de nitrocelulosa y fijadas (cross-linked), al vacío durante 2 horas a 80°C. La membrana fue prehibridada durante 18 horas a 42°C en una solución de formamida al 50 %, 2X SSC (0.15M cloruro de sodio, 0.15M citrato de sodio), 4X sol. de Denhart, 0.2 % sulfato dodecílico de sodio (SDS), y 100 µg/ml de ácido desoxiribonucleico (DNA) desnaturalizado, de esperma de salmón. La membrana fue hibridada por 18 horas a 42°C empleando un fragmento de 1.2 Kb del cDNA P450scc mitocondrial, (donado por el Dr. Ken I. Morohashi, Kyushu University, Fukuoka Japón) marcado con [³²P], la actividad específica aproximada de la marca fue de ~1-1.5 x 10⁸ cpm/µg DNA, empleando el método de random primer (Primer-it II; Stratagene, La Jolla CA, USA). Después del proceso de hibridación la membrana fue colocada sobre una película radiográfica (Kodak X-OMAT), y expuesta durante 24 horas a -70°C.

Oligonucleótidos y reacción de RT-PCR

El RNA total (150 ng), de páncreas, músculo esquelético, glándulas adrenales y ovarios se utilizaron como templados para la síntesis de DNAC mediante la reacción combinada de RT-PCR. El método utilizado para la técnica combinada de RT-PCR fue el protocolo de Perkin Elmer ThermoStable rTth reverse transcriptas Kit. A cada reacción de RNA, se adicionó, 0.2 mM de cada dNTP's (A,C,G, y T), 0.75 μ M de oligo (dT), 1.0 mM MnCl y 5.0 U de transcriptasa reversa en un volumen final de 20 μ L. La amplificación de cada DNAC por PCR se llevo a cabo adicionando la enzima Taq Polimerasa (5.0 U), y 0.75 de cada oligonucleótido.

Diseño de los Oligos: A partir de la secuencia del citocromo P450scc, se diseñaron y se sintetizaron los oligonucleótidos generando un fragmento del DNAC del citocromo P450scc. (se muestran en la pagina 50).

Controles **internos negativos**: Músculo esquelético y músculo diafragmático (experimento #2).
Agua estéril.

Controles **internos positivos**: Glándulas suprarrenales y ovarios (experimento #2).

Control interno del kit: pAW 109 RNA (308 pb) (experimento #2).

Las reacciones de amplificación se llevaron en el termociclador automático (Perkin Elmer), y consistió en 1 ciclo de 2 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos (1 minutos a 95°C, 1 minutos a 60°C), finalizando con 1 ciclo de 7 minutos a 60°C.

Southern blot. Los productos de la reacción de RT-PCR (20 μ l) fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % y visualizados empleando una tinción de bromuro de etidio. El tamaño de los productos se determinó por comparación directa con el corrimiento simultáneo de los fragmentos del DNA de ϕ X 174RF DNA/Hind III (marcador molecular). Estos productos fueron transferidos por capilaridad a membranas de nylon, y prehibridados e hibridados bajo condiciones similares a las descritas para el receptor de andrógenos.

Secuenciación. Los productos de RT-PCR de los tejidos se analizaron por secuenciación directa. Los productos fueron secuenciados en ambas hebras usando el Amplicycle sequencing kit (Perkin Elmer Roche, Branchburg, NJ, U.S.A). Los productos de secuenciación se analizaron en un gel de poliacrilamida-urea al 8 % , el gel fue expuesto en una película radiográfica Kodak XAR-5 durante 8-16 horas a temperatura ambiente.

DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS
Citocromo P450scc

Se diseñaron y se sintetizaron dos oligonucleótidos a partir de la secuencia del cDNA del *gene CYP11A* reportada por Morohashi y col. (78).

El primero correspondió a la secuencia de los nucleótidos 238-258. Sentido: 5' **GAG AAC TTC CAG AAG TAT GGC.**

```

1  gggcgctgaa  gtggagcagg  tacagtcaca  gctgtgggga  cagcatgctg  sccaagggtc
61  ttcccccaag  ctgagtcctg  gtcaaaggct  accagacctt  tctgagtgcc  cccagggagg
121 ggctggggcg  tctcagggtg  cccactggcg  agggagctgg  catctccacc  cgcagtcttc
181 gccccctcaa  tgagatcccc  tctcctgggt  acaatggctg  gctaaacctg  taccatttct
241 gaggggagac  gggcacacac  aaagtccacc  ttcacatgtt  ccagaatttc  cagaagtatg
301 gcccgattta  cagggagaag  ctcggcaacg  tggagtctgt  ttatgtcatc  gaccctgaag
361 atgtggccct  tctctttaag  tccgagggcc  ccaaccaga  acgattcctc  atccccctt
421 gggctgccta  tcaccagtat  taccagagac  ccataggagt  cctgttgaag  aagtgggcag
481 cctggaagaa  agaccgggtg  gccctgaacc  aggaggtgat  ggctccagag  gccaccaaga
541 actttttgcc  cctgttggat  gcagtgcttc  gggactctgt  cagtgctcctg  cacaggcgca
601 tcaagaaggc  gggctccgga  aattactcgg  gggacatcag  tgatgacctg  ttccgctttg
661 cctttgagtc  catcactaac  gtcatttttg  gggagcgcca  ggggatgctg  gagggaagtag
721 tgaacccccg  ggcccagcga  ttcattgatg  ccatctacca  gatgttccac  accagcgtcc
781 ccatgctcaa  ccttccccca  gacctgttcc  gtctgttcag  gaccaagacc  tggaggacc
841 atgtggctgc  atgggacgtg  attttcagta  aagctgacat  atacaccag  aacttctact
901 gggaaattgag  acagaaagga  agtgttcacc  acgattaccg  tggcatgctc  tacagactcc
961 tgggagacag  caagatgtcc  ttcgaggaca  tcaaggccaa  cgtcacagag  atgctggcag
1021 gagggggtgga  cacgacgtcc  atgaccctgc  agtggcaact  gtatgagatg  gcacgcaacc
1081 tgaaggtgca  ggatatgctg  cgggcagagg  tcttggctgc  gcggcaccag  gccagggag
1141 acatggccac  gatgctacag  ctggtecccc  tectcaaagc  gatattctgt  aaatgacttg  gttcttcgag
1201 gacttcaccc  catctccgtg  accctgcaga  gatattctgt  aaatgacttg  gttcttcgag
1261 attacatgat  tcctgccaag  acactgggtg  aagtggccat  ctatgctctg  ggccgagagc
1321 ccaccttctt  ctctgacccg  gaaaattttg  acccaacccg  atggctgagc  aaagacaaga
1381 acatcaccta  cttccggaac  ttgggctttg  gctggggtgt  gcggcagtg  ctgggacggc
1441 ggatcgctga  gctagagatg  accatcttcc  tcatcaatat  gctggagaa  ttcagagttg
1501 aaatccaaca  cctcagcgat  gtgggcacca  cattcaacct  cattctgatg  cctgaaaagc
1561 ccatctcctt  caccttctgg  cccttcaacc  aggaagcaac  ccagcagtga  tcagagagga
1621 tggcctgacg  ccacatggga  ggaaggccca  ggggtggggc  ccattgggtc  tctgcatctt
1681 cagtcgtctg  tccccagtc  tgctccttcc  tgcccagcct  gctcagcagg  ttgaatgggt
1741 tctcagtggt  caccttctc  agctcagctg  ggccactcct  cttcaccac  cccatggaga
1801 caataaacag  ctgaaccatc  g
  
```

El segundo a la secuencia de los nucleótidos 553-570. Antisentido: 3' **GCC CTG CTG CTT GAT GCG.**

ACTIVIDAD DEL CITOCROMO P45_{scc} *Extracción de mitocondrias.*

Se utilizaron los páncreas de perros mestizos para obtener las mitocondrias mediante centrifugación diferencial. El órgano se extrajo mediante cirugía, y se mantuvo a 4°C en una solución con pH 7.4 que contenía manitol 0.3M, HEPES 10 mM, EDTA 1 mM y 0.2 % de albúmina de suero bovino (BSA) libre de ácidos grasos. El páncreas se limpió de tejido conectivo y grasa, se cortó en pequeños fragmentos fue homogenizado y posteriormente centrifugado.

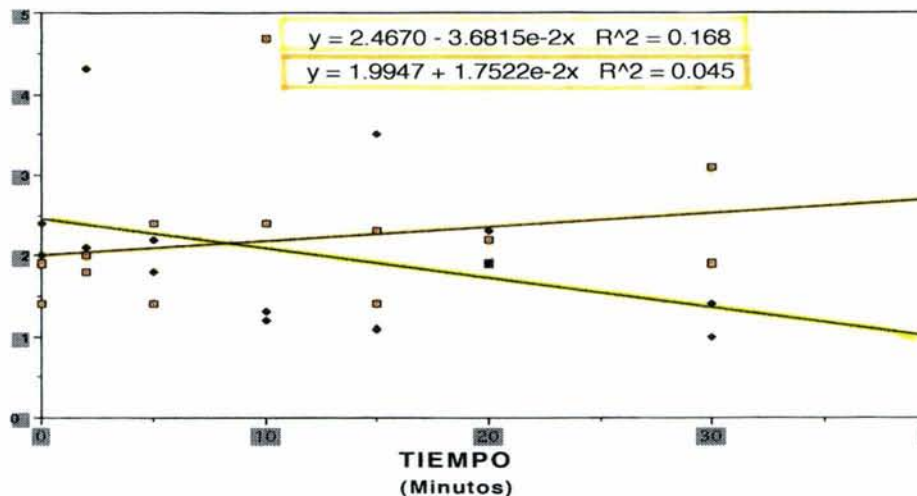
La fracción mitocondrial fue separada y suspendida en 2 ml de la misma solución suplementada con 3 mg/ml de BSA. La preparación se incubó por 10 minutos a 4°C y se centrifugó a 10,800 x g durante 10 minutos, en un volumen final de 40 ml. Se separó el precipitado y se resuspendió a una concentración final de 20 mg de proteína /ml.

La viabilidad de las mitocondrias fue evaluada por el consumo de oxígeno en la cadena respiratoria empleando un electrodo tipo Clark. El valor medio del control respiratorio fue de 6.5 (n=3) y la relación promedio ADP/O de 2.5, usando malato-glutamato como sustrato.

La actividad del P450_{scc} fue evaluada por la velocidad de síntesis de pregnenolona en función del tiempo. La cinética de producción de pregnenolona se hizo en 10 experimentos independientes. En cada uno de ellos se incubaron en forma simultánea dos series, una que se consideró como la condición control y la otra en presencia del inhibidor específico de la reacción, aminoglutetimida (AMG). Los resultados se expresan como promedio y la dispersión del valor de los 10 experimentos para cada serie, y para cada uno de los tiempos de muestreo.

Mitocondrias de páncreas

P5 pmol/mg proteína.



SERIE Sin Aminoglutetimida.

SERIE Con Aminoglutetimida.

INCUBACION MITOCONDRIAL

Las mitocondrias intactas (5mg/ml de proteína) fueron pre incubadas durante 10 minutos a 30°C en una solución preparada con sacarosa (0.25 M), cloruro de potasio (20 mM), amortiguador de fosfatos (10 mM), pH 7.4, trilostano (50 μ M), colesterol (200 μ g), y BSA (10 mg).

Una serie fue incubada en presencia de 1mM de DL-aminoglutetimida (inhibidor específico del complejo citocromo P450_{scc}). La reacción se inició con la adición de malato 10mM.

Del medio de incubación se tomaron alícuotas de 100 μ l a los tiempos 2,5,10,15,20 y 30 minutos, las cuales fueron depositadas en tubos que contenían 1ml de hexano. Las alícuotas fueron guardadas a -4°C hasta el momento del análisis.

Cuantificación de Pregnenolona.

Se cuantificó la concentración total de pregnenolona presente en el medio de incubación mediante radioinmunoanálisis específico en fase líquida. La sensibilidad del método fue de 31.25 pg/ml con un coeficiente de variación a esa dosis de 14 %. El rango dinámico de la curva estándar se marco de 31.25 a 1000 pg/ml.

Los coeficientes de variación intra e inter análisis fueron de 11 y 15 % respectivamente.

Los resultados que se discuten posteriormente, se calcularon empleando un programa de cómputo desarrollado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (79).

ESTUDIOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

EXPERIMENTO # 3

Para los estudios de inmunohistoquímica se obtuvieron datos del archivo de patología del *Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Dr. "Salvador Zubirán"* y del *Instituto Nacional de Cancerología*, de los últimos 10 años, previa autorización. Los expedientes clínicos de 40 pacientes con neoplasia pancreática fueron revisados obteniéndose datos clínicos, estudios de laboratorio y gabinete. La estirpe histológica de cada una de las muestras tumorales fue ratificado mediante la tinción de hematoxilina/eosina (HE).

PROTOCOLO

1. Cada muestra fue sumergida en xilol durante 10 minutos.
2. Posteriormente pasan por una serie de alcoholes en diferentes concentraciones 100 %, 90 %, 80 %, 70 %, durante 5 minutos en cada alcohol.
3. Se bloquea la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3 % diluido en agua, durante 10 minutos.
4. Se realizan lavados con buffer de fosfatos 3 X 2 minutos cada uno.
5. Se cubre el tejido con el 1er anticuerpo durante 24 horas a 4°C.
6. Al término del tiempo de incubación con el 1er anticuerpo, se realizan lavados con una solución amortiguadora de fosfatos 3X 2 minutos.
7. Un lavado de 5 minutos con una solución amortiguadora de fosfatos albúmina al 5 %.
7. Se cubre el tejido con el 2do anticuerpo durante 60 minutos a temperatura ambiente.
8. Se realizan lavados con solución amortiguadora de fosfatos 3 X 2 minutos y 1 lavado de 5 minutos con una solución amortiguadora de fosfatos albúmina al 5 % .
9. Se revela con Diaminobenzidina (DAB), se contratiñe, se deshidrata y finalmente se realiza el montaje con resina sintética (Depex, Eukitt), por último se coloca un cubreobjetos para proteger la preparación.

NOTA * Los tejidos control negativo son procesados sin adicionar el 1er. anticuerpo, este es remplazado por una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4

ANTICUERPOS PRIMARIOS

- *Para el receptor de estrógenos isoforma alfa(α):* se utilizó inmunoglobulina monoclonal de ratón. (F-10): sc-8002. Péptido bloqueador sc-8002P (Santa Cruz Biotechnology).
- *Para el receptor de estrógenos isoforma beta(β):* se utilizó inmunoglobulina policlonal de cabra. (N-19): sc-6820. Péptido bloqueador sc-6820P (Santa Cruz Biotechnology).
- *Para el receptor de progesterona (PR):* se utilizó inmunoglobulina monoclonal de ratón. (C-20): sc-539. Péptido bloqueador sc-539P (Santa Cruz Biotechnology).

ANTICUERPOS SECUNDARIOS

- *Se utilizó anti inmunoglobulina de ratón marcado con biotina peroxidasa (marca ICN cat. 689311).*
- *Se utilizó anti inmunoglobulina de cabra marcado con biotina peroxidasa (marca ICN cat. 689332).*
- *Revelador: DAB-Plus Reagent Set. (Zymed cat. 002020)*

SOLUCIONES UTILIZADAS PARA INMUNOHISTOQUÍMICA

SOLUCIÓN SALINA BALANCEADA

NaCl	6.83 gramos
KCl	0.20 gramos
Na ₂ HPO ₄	1.15 gramos
KH ₂ HPO ₄	0.20 gramos
AGUA DESTILADA	1000 ml

* Ajustar el pH con NaOH 1N ó HCl 1 N

HIDROXIDO de SODIO 1N

NaOH	4.0 gramos
AGUA DESTILADA	100 ml

ÁCIDO CLORHÍDRICO 1 N

HCl	8.28 ml
AGUA DESTILADA	100 ml

SOLUCIÓN SALINA de FOSFATOS pH 7.2

Na ₂ HPO ₄	1.48 gramos
KH ₂ PO ₄	0.43 gramos
NaCl	7.0 gramos
AGUA DESTILADA	1000 ml

SOLUCIÓN SALINA de FOSFATOS

con ALBUMINA SÉRICA BOVINA pH 7.2

Na ₂ HPO ₄	1.48 gramos
KH ₂ PO ₄	0.43 gramos
NaCl	7.0 gramos
ALBÚMINA	1.0 gramos
AGUA DESTILADA	1000 ml

FIJADORES

PARAFORMALDEHÍDO AL 4% en SOLUCIÓN de FOSFATOS 0.1 M pH 7.4

a) Fosfato monobásico	NaH ₂ PO ₄	2.75 gramos
	AGUA DESTILADA	100 ml
b) Fosfato dibásico	Na ₂ HPO ₄	2.83 gramos
	AGUA DESTILADA	100 ml
Mezclar	Solución a	9.5 ml
	Solución b	40.5 ml

PARAFORMALDEHÍDO AL 8%

Paraformaldehído	4.0 gramos
AGUA DESTILADA	50 ml

- Mezclar 4.0 gramos de paraformaldehído en 50 ml de agua destilada a 60°C, aclarar la solución con 2 gotas de NaOH 1 N.
- Los 50 ml de paraformadehído al 8 % se mezclan con 50 ml de amortiguador de fosfatos pH 7.4
- La solución final: paraformaldehído al 4 % solución amortiguadora de fosfatos.

INHIBIDORES *Peroxidasa endógena*

PERÓXIDO de HIDROGENO

Peróxido de Hidrógeno	1 ml
AGUA DESTILADA	9 ml

ÁCIDO PERYÓDICO

Ácido peryódico	0.028 gramos
AGUA DESTILADA	100 ml

METANOL/ PERÓXIDO de HIDROGENO (H₂O₂)

Metanol	97 ml
H ₂ O ₂ (3%)	3 ml

CROMÓGENOS

Substrato revelador para peroxidasa con 3,3'-Diaminobencidinatetrahidrocloruro (DAB)

Solución Tris-malato	a) Tris-malato	2.42 gramos
	AGUA DESTILADA	100 ml
Solución de HCl 37%	b) HCl	0.83 ml
	AGUA DESTILADA	100 ml
MEZCLAR	Solución a	5.0 ml
	Solución b	8.0 ml
	AGUA DESTILADA	7.0 ml

- A 9.9 ml de la mezcla agregar 0.1 ml de peróxido de hidrógeno al 30%.
- A 10 ml restantes agregar 0.005 gramos de DAB.
- La solución que contiene DAB se le agregan 0.1 ml de la que contiene peróxido de hidrogeno, inmediatamente antes de su uso.

Substrato revelador para peroxidasa con 3-Amino-9-Etil carbazol (AEC).

AMORTIGUADOR de ACETATOS 0.2 M, pH 5.0

a) Ácido acético glacial	CH ₃ -COOH	11.55 ml
	AGUA DESTILADA	1000 ml
b) Acetato de Sodio anhidro	CH ₃ -COONa	16.41 gramos
	AGUA DESTILADA	1000 ml
MEZCLAR	Solución a	14.8 ml
	Solución b	35.2 ml

- Disolver 20 mg de (AEC) en 0.5 ml de N-Dimetil-formamida.
- Se agrega 9.5 ml de amortiguador de acetatos pH 5 y 3 gotas de H₂O₂ al 3 %

EXPERIMENTO #1

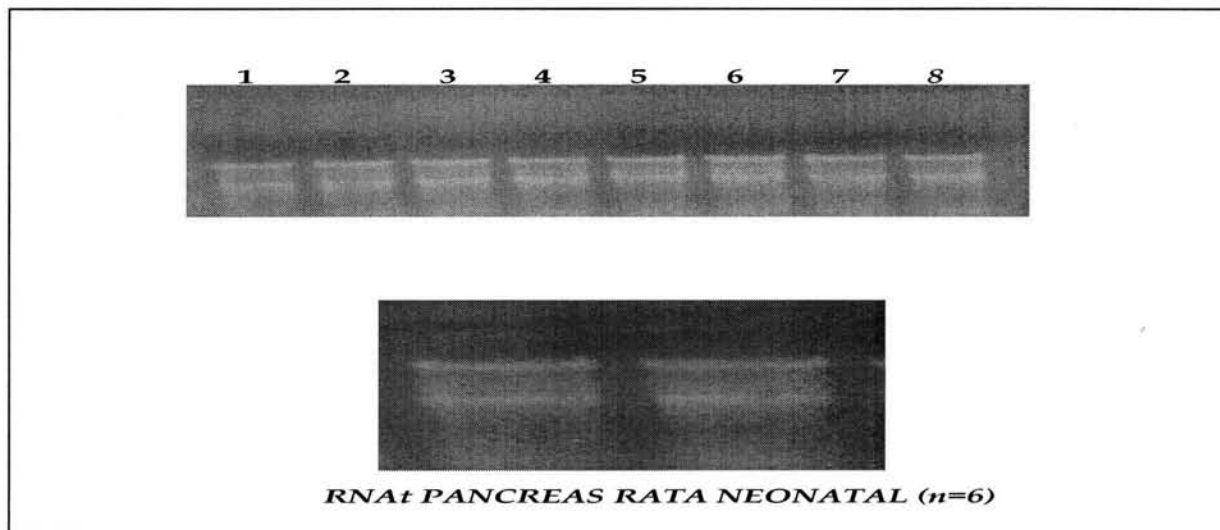


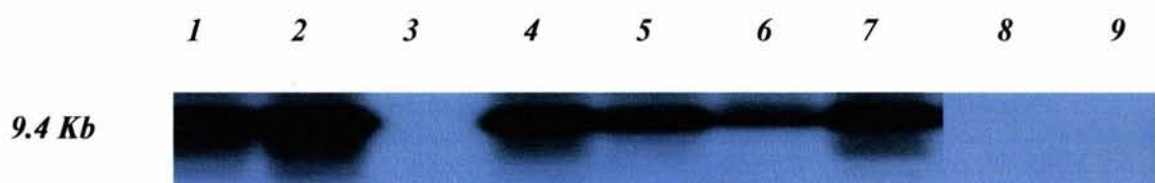
FIGURA I

Extracción de RNA total de páncreas bajo diferentes condiciones experimentales. El numero de experimentos n=6 y en cada grupo de ratas experimentales n= 6

En el *panel superior* se muestra por duplicado RNA total, de 1 experimento donde se aprecia las bandas de RNA de 28s y 18s. El *carril 1 y 2* corresponde a páncreas de animales hembras normales, *carril 3 y 4* páncreas de animales machos normales, *carril 5 y 6* páncreas de animales machos gonadectomizados, *carril 7 y 8* páncreas de animales machos gonadectomizados y substituidos con testosterona.

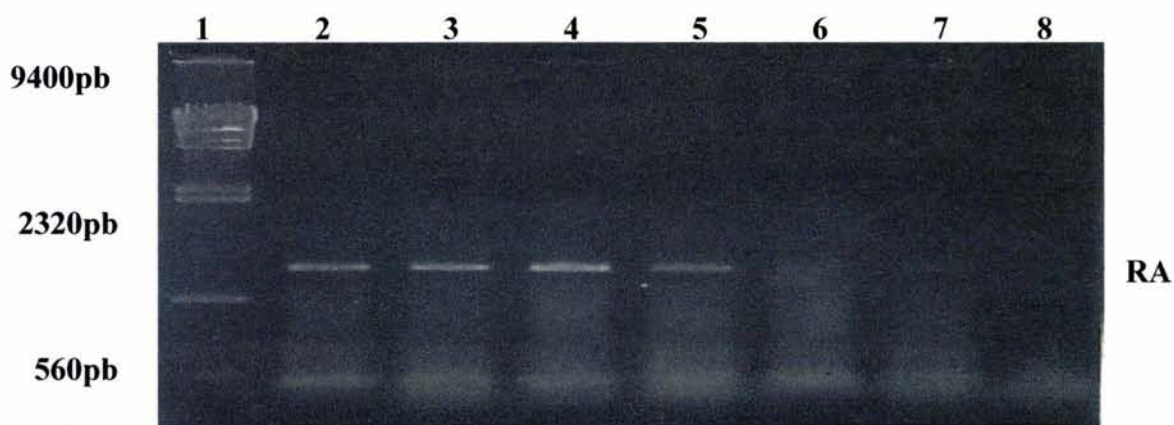
El *panel inferior*, se muestra el RNA total de páncreas de animales machos neonatales.

FIGURA II

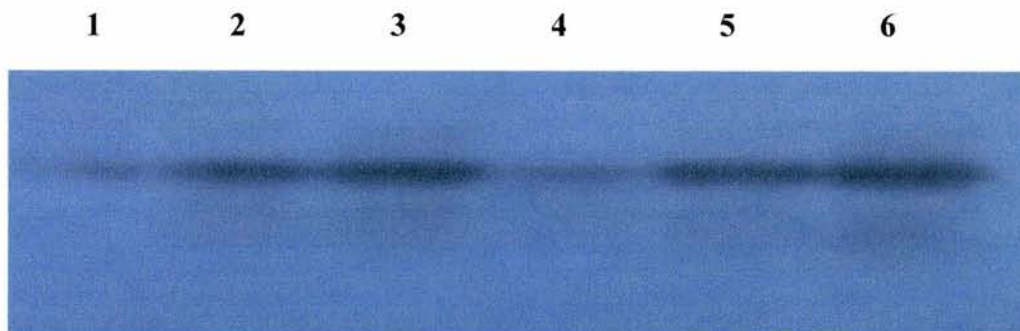


Análisis del RNA por *Northern Blot*. **carril 1:** vesículas seminales de animales machos intactos, **carril 2:** vesículas seminales de animales adultos machos gonadectomizados, **carril 3:** control negativo **carril 4:** próstata de animales adultos machos gonadectomizados, **carril 5:** próstata de animales adultos machos intactos, **carril 6:** vesículas seminales animales machos intactos, **carril 7:** vesículas seminales de animales adultos machos gonadectomizados, **carril 8:** páncreas de animales adultos machos **carril 9:** páncreas de animales adultos machos gonadectomizados.

FIGURA III



RT-PCR. En el **carril 1** se muestra el marcador de peso molecular λ /Hind III, el **carril 2** páncreas de animales neonatales, el **carril 3** páncreas de animales adultos, el **carril 4** el páncreas de animales machos castrados, el **carril 5** corresponde a páncreas de animales machos intactos, el **carril 6** páncreas de animales machos gonadectomizados y substituidos con testosterona, el **carril 7** tejido testicular, y en el **carril 8** control negativo (RNA sin RT-PCR). Los productos de la reacción tienen una longitud de aproximadamente 860 pb, que corresponde a la predicción teórica del segmento amplificado del cDNA del RA.

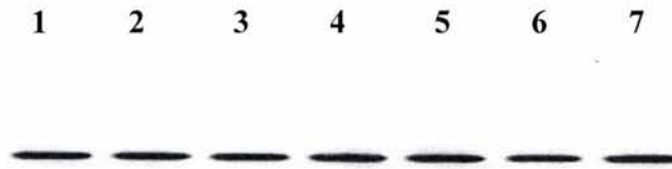


Southern blot de los productos del RT-PCR. El *carril 1* corresponde a páncreas de animales neonatales, el *carril 2* páncreas de animales hembras intactas, el *carril 3* páncreas de animales machos castrados, el *carril 4* páncreas de animales machos intactos, el *carril 5* páncreas de animales machos castrados substituidos con testosterona, el *carril 6* testículos.

Se realizo análisis densitométrico de los productos de RT-PCR del receptor de andrógenos. Los datos se expresan como el área total bajo la curva calculada por el método trapezoide.

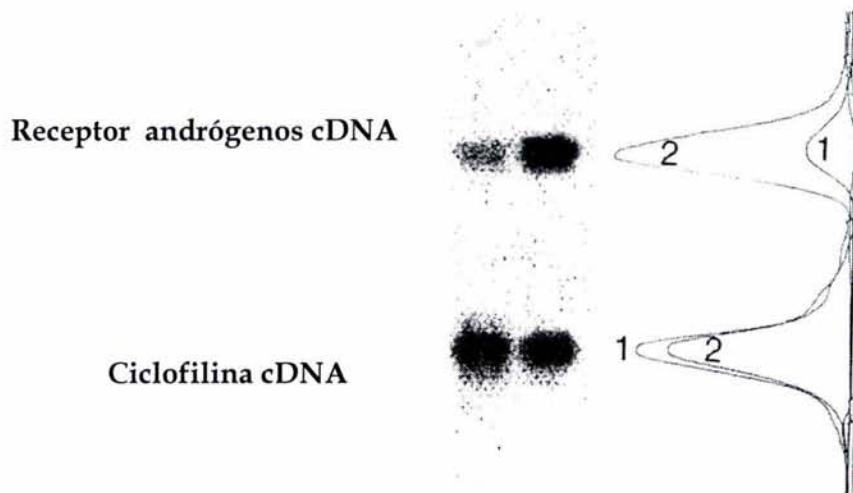
Tejido de origen	mm ²
Páncreas hembras	1,561
Páncreas machos (neonatal)	1,523
Páncreas de machos gonadectomizados	978
Páncreas de machos intactos	584
Páncreas de machos gonadectomizados y tratados con testosterona	144
Testículo	344

FIGURA V



Productos de RT-PCR de **Ciclofilina** utilizando los mismos DNAs. En el *carril 1* páncreas de animales neonatales, el *carril 2* páncreas de animales adultos, el *carril 3* el páncreas de animales machos castrados, el *carril 4* corresponde a páncreas de animales machos intactos, el *carril 5* páncreas de animales machos gonadectomizados y substituidos con testosterona, el *carril 6* tejido testicular, y en el *carril 7* vesículas seminales. Los Oligonucleótidos utilizados CF1/CF2 (453 pb), e hibridados con la sonda para ciclofilina [³²P], descritos en Material y Métodos.

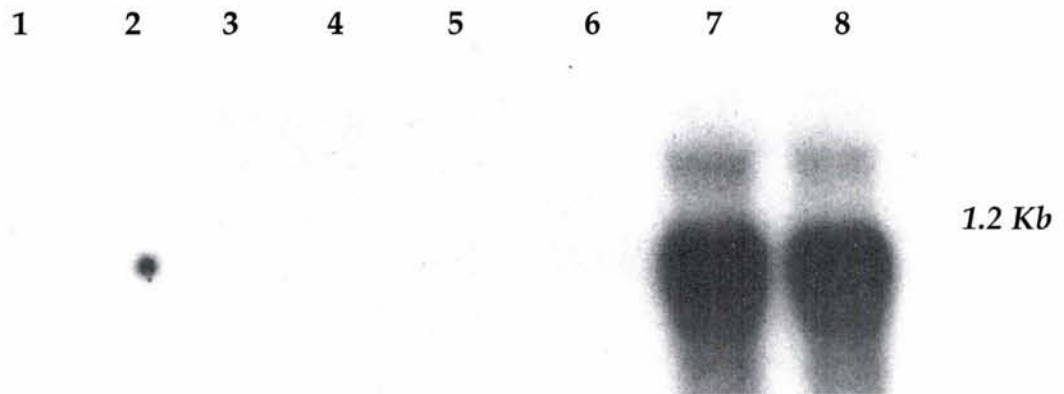
FIGURA VI



El perfil densitométrico del Southern blot de ciclofilina fue similar en el páncreas obtenido del grupo de animales machos intactos y castrados.

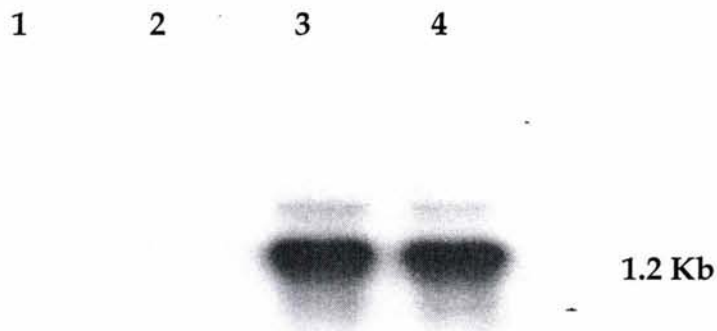
EXPERIMENTO #2

FIGURA I



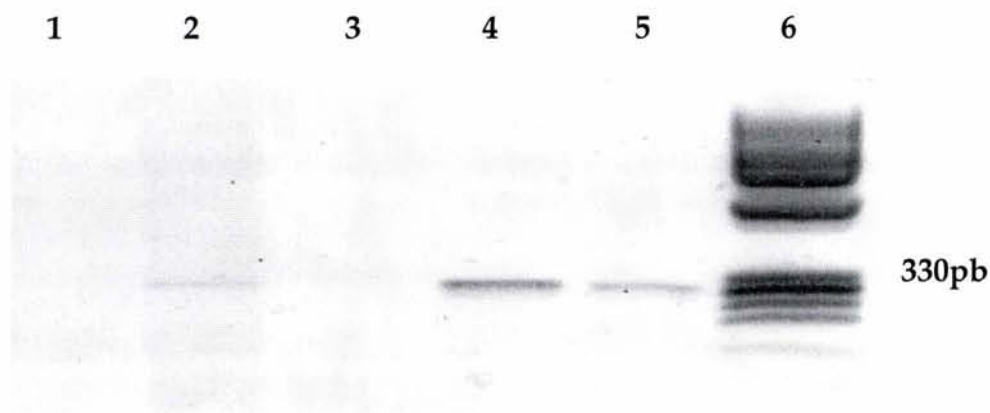
Análisis de *Northern blot*. Se muestra en el *carril 1 y 2* páncreas, en el *carril 3 y 4* músculo esquelético, en el *carril 5 y 6 ovario*, en el *carril 7 y 8* glándula suprarrenal. Un fragmento de 1.2 Kb del cDNA P450_{scc} mitocondrial de bovino marcado con [³²P] fue usado como sonda. (Tiempo de exposición 30 minutos).

FIGURA II



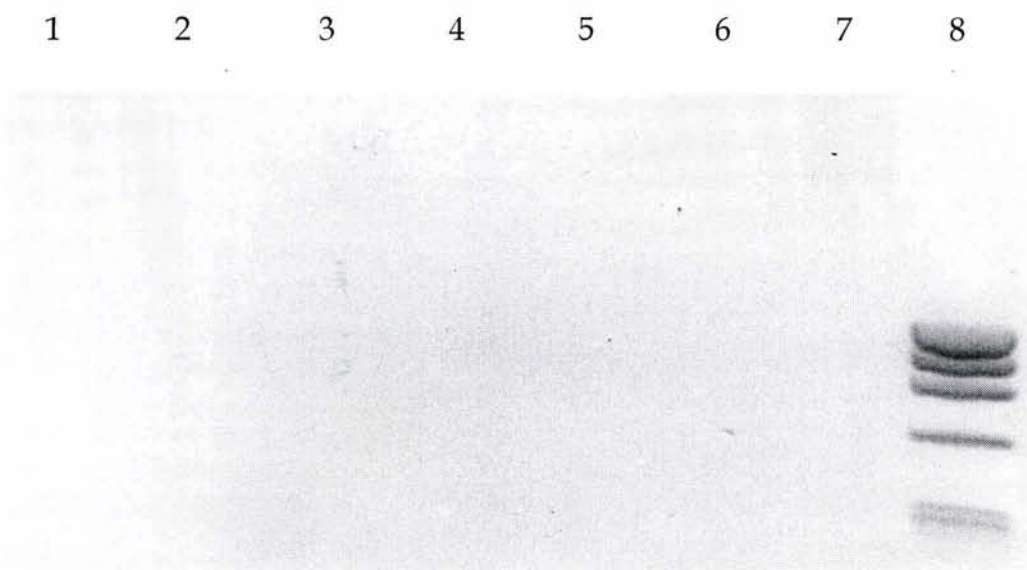
Análisis de *Northern blot*. Los tejidos presentados son: el *carril 1* páncreas , el *carril 2* músculo esquelético, el *carril 3* glándula suprarrenal, y *carril 4* ovario. Se aprecia una hibridación positiva solo en los carriles 3 y 4.

FIGURA III



Los productos obtenidos del RNA total después de la reacción de RT-PCR, mostraron una longitud de 330pb que corresponde al segmento amplificado del cDNA del citocromo P450sc y se muestran en la Figura III. En el *carril 1* (agua destilada, control interno negativo) en el *carril 2* (muestra de páncreas de 5 μ l), en el *carril 3* (músculo esquelético, tejido control negativo para la presencia del P450sc) en el *carril 4* (glándula suprarrenal), en el *carril 5* (ovario) en el *carril 6* marcador de peso molecular (ϕ X174).

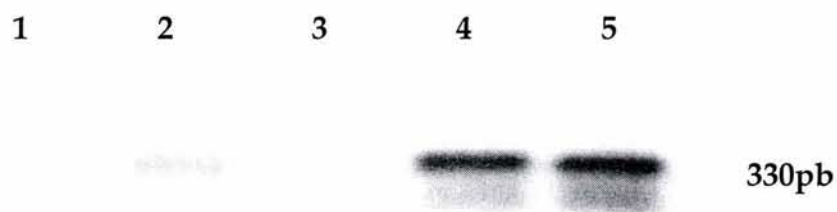
FIGURA IV



Electroforesis de productos de *PCR directo*. En el *carril 1* agua destilada (control interno negativo) en el *carril 2* páncreas, *carril 3* músculo esquelético (tejido control negativo para la presencia del P450scc), *carril 4* glándula suprarrenal, *carril 5* ovario, *carril 6* diafragma, *carril 7* DNA genómico, *carril 8* marcador de peso molecular.

Como se aprecia en la Figura IV, no existen productos de hibridación en las muestras, lo cual se interpreta como una ausencia de contaminación por DNA.

FIGURA V



Análisis de *Southern blot*. El *carril 1* (agua destilada, control interno negativo), *carril 2* corresponde al tejido pancreático (5 μ l de muestra), se observa una hibridación menos evidente, *carril 3* (músculo esquelético, tejido control negativo para la presencia del P450scc), el *carril 4* (tejido adrenal), y en el *carril 5* (ovario), se observa una hibridación intensa, ambos tejidos positivos expresan el citocromo P450scc.

Las concentraciones basales de pregnenolona (antes del inicio de la reacción) fueron de 25.76+- 8.19 pmol/mg de proteína mitocondrial para la serie control y de 23.12 +- 6.80 pmol/mg de proteína para la serie con AMG, el análisis estadístico demostró que no existieron diferencias entre ambas series (p=0.29).

La reacción se inició con la adición de malato como agente donador de equivalentes reductores. A partir de ese momento se iniciaron las colecciones seriadas de las alícuotas como se describió en material y métodos.

Como se muestra en la siguiente tabla, los valores promedio de ambas series a diferentes tiempos de muestreo fueron comparados mediante un análisis de la varianza (ANOVA). Se comprobó que existían diferencias estadísticamente significativas a partir de los 2 min de incubación. El valor promedio, la desviación estándar y el valor de “p” fueron calculados para cada tiempo.

TIEMPO (minutos)	CONTROL Pregnenolona pmol/mg proteína	AMINOGLUTETIMIDA (AMG) Pregnenolona pmol/mg proteína	Valor de p
0	25.76+- 8.19	23.12+-6.80	0.294
2	28.55+-6.67	20.99+-10.43	0.032
5	30.26+-12.79	20.45+-4.69	0.036
10	36.80+-12.10	17.33+-5.11	<0.001
15	28.09+-7.56	16.18+-8.23	<0.001
20	29.18+-7.87	15.93+-8.49	<0.001
30	29.22+-8.72	13.34+-6.08	<0.001

La cinética de producción de pregnenolona fue totalmente diferente al comparar ambas series. En ausencia del inhibidor (serie control), las concentraciones de pregnenolona presentes en el medio de incubación aumentaron en función del tiempo, alcanzando concentraciones máximas (1.5 veces el valor basal) a los 10 min de iniciada la reacción.

En la serie incubada en presencia de inhibidor (AMG) se observó una disminución constante de la concentración basal en función del tiempo.

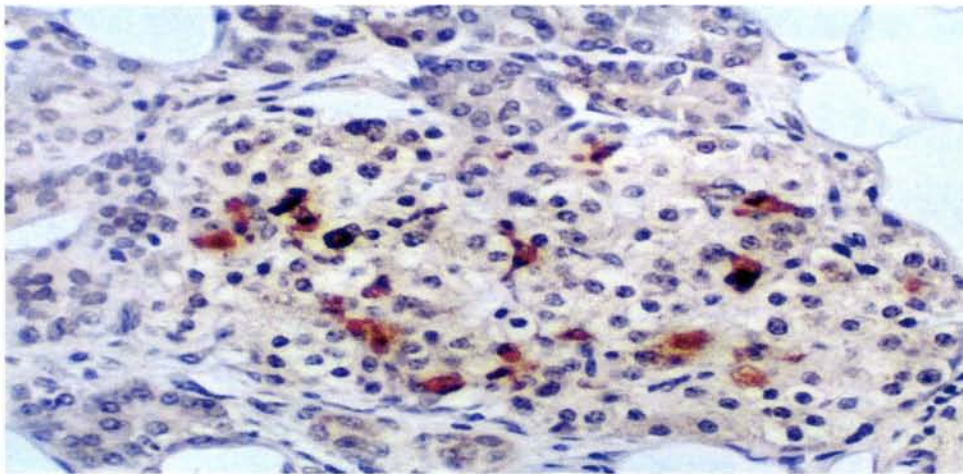
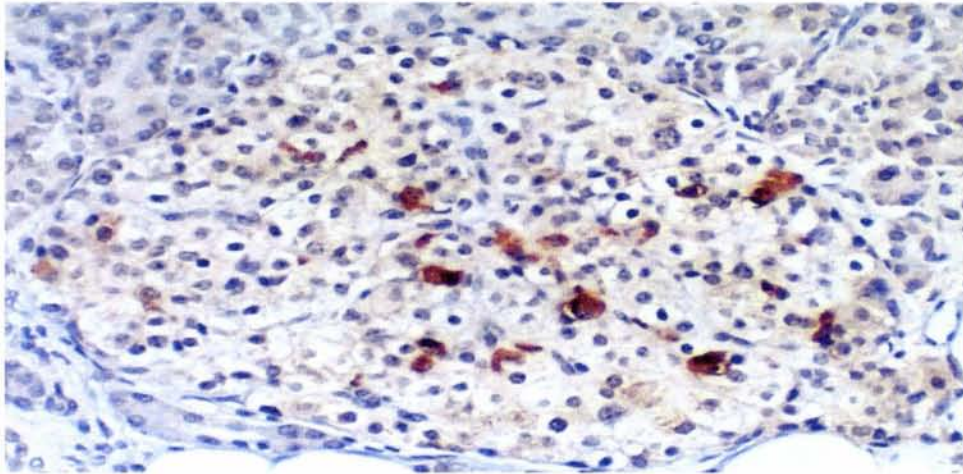
La actividad del citocromo P450_{scc} se estimó como el porcentaje de cambio de las concentraciones basales de pregnenolona en el medio. En la serie control al final del periodo de incubación este mantuvo un cambio positivo del 19.5 %, mientras que en la serie con AMG, las concentraciones de pregnenolona disminuyeron en un 45.6 %. La actividad del producto de la expresión del citocromo P450_{scc} fue demostrado por la capacidad de las mitocondrias del páncreas de transformar el colesterol en pregnenolona.

Esta transformación fue dependiente del tiempo y tuvo un comportamiento cinético bifásico, caracterizado por un componente rápido que presento su máximo a los 10 minutos, seguido de una fase de meseta.

EXPERIMENTO # 3

Fotomicrografía de páncreas normal humano.

En el *panel A* se observa la inmunolocalización del *receptor de estrógenos alfa* en células que conforman el islote pancreático.

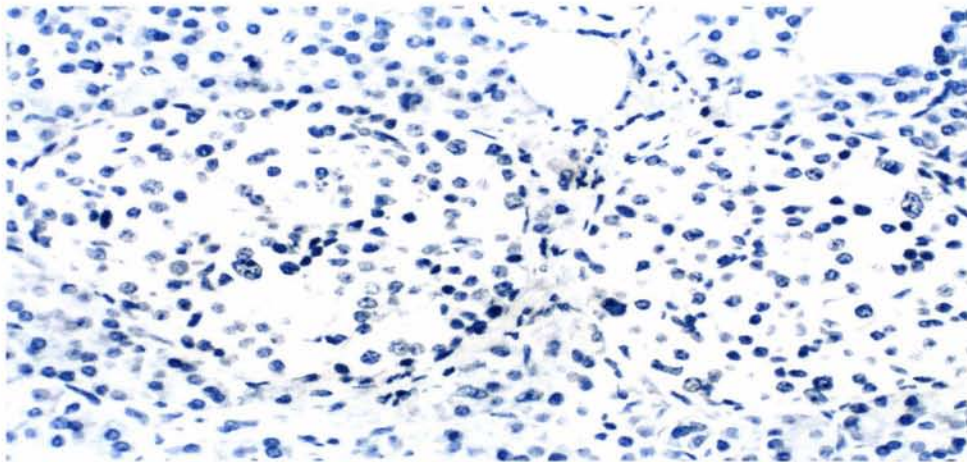
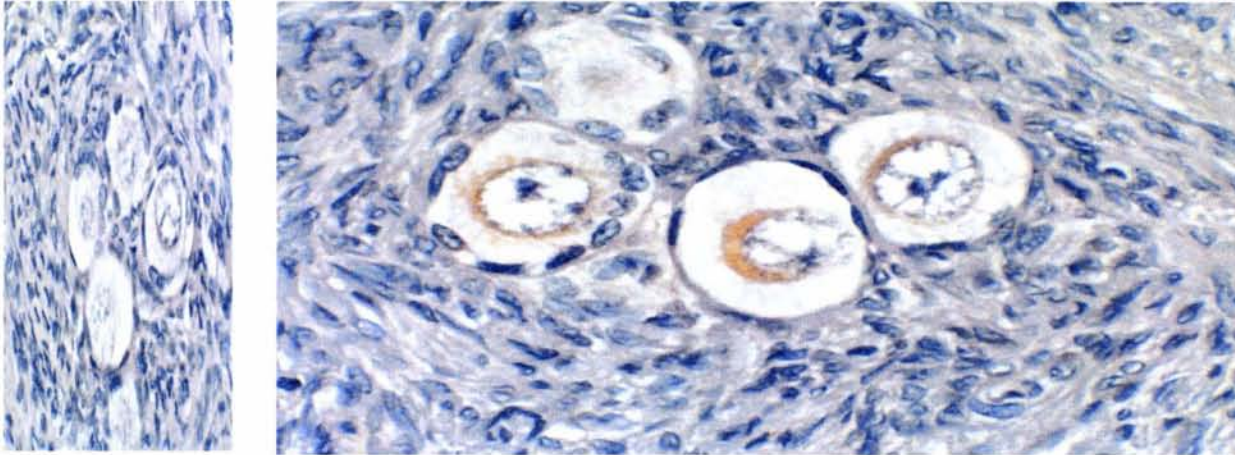


Fotomicrografía de páncreas normal humano.

En el *panel B* se observa la misma inmunolocalización del *receptor de estrógenos alfa* en células que conforman el islote. Material incluido en parafina, revelado con DAB y contrateñido con Hematoxilina

Fotomicrografía de páncreas normal humano.

En el *panel C* se observa tejido control positivo (corte de ovario humano), del *receptor de estrógenos alfa*

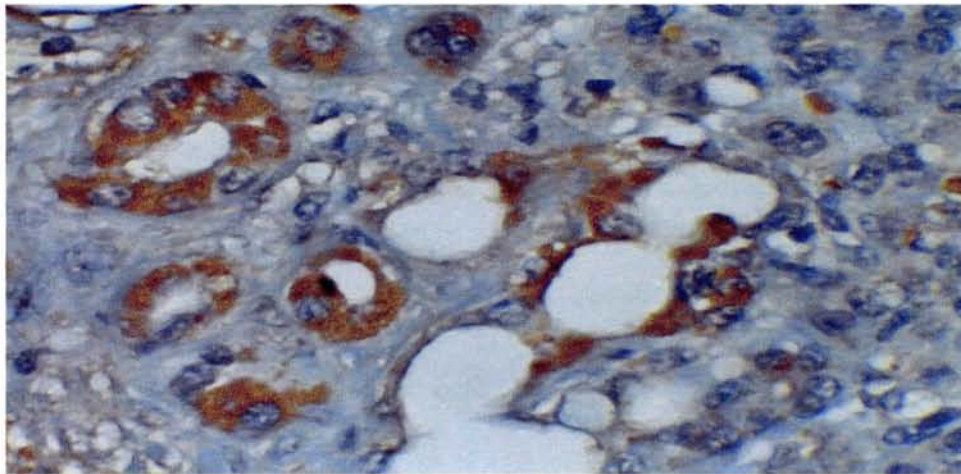
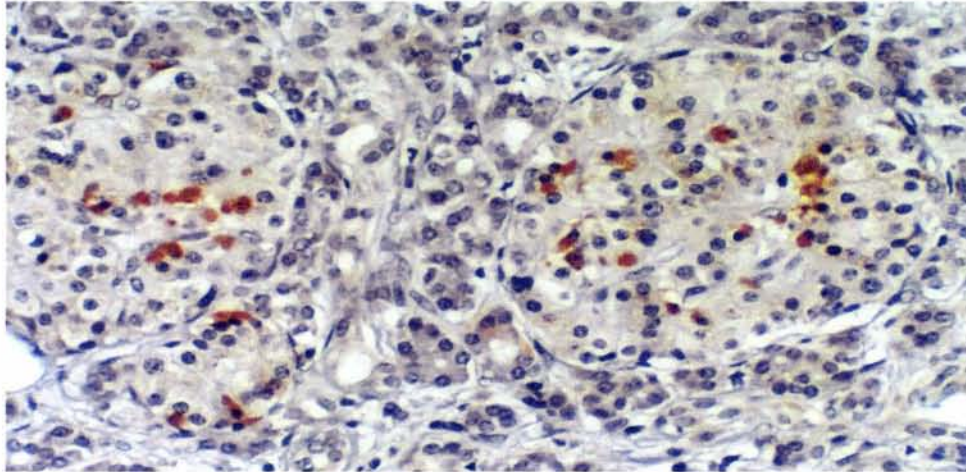


Fotomicrografía de páncreas normal humano.

Panel D, corte de tejido pancreático donde se muestran dos islotes pancreáticos con péptido neutralizante, como control interno del anticuerpo para el *receptor de estrógenos beta*. Material incluido en parafina, revelado con DAB y contrateñido con hematoxilina.

Fotomicrografía de páncreas normal humano.

En el *panel A* se observa la inmunolocalización del *receptor de estrógenos beta* en células que conforman el islote pancreático. Material incluido en parafina, revelado con DAB y contrateñido con hematoxilina.

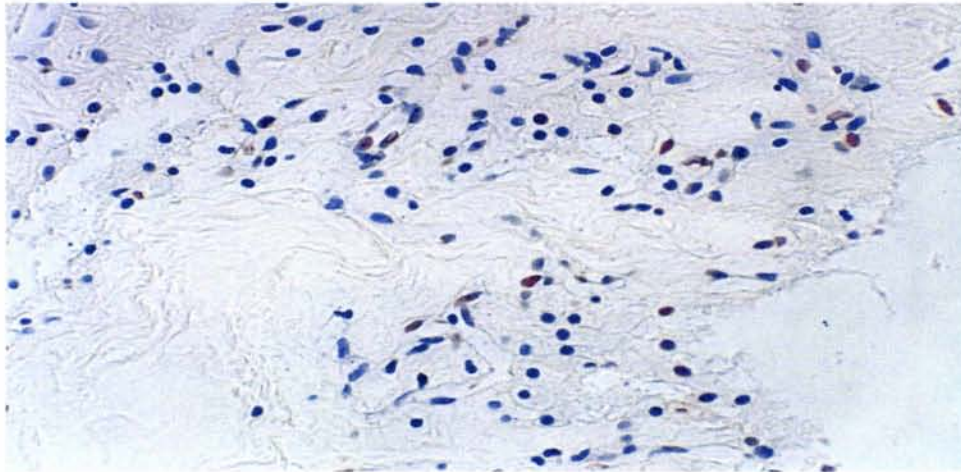
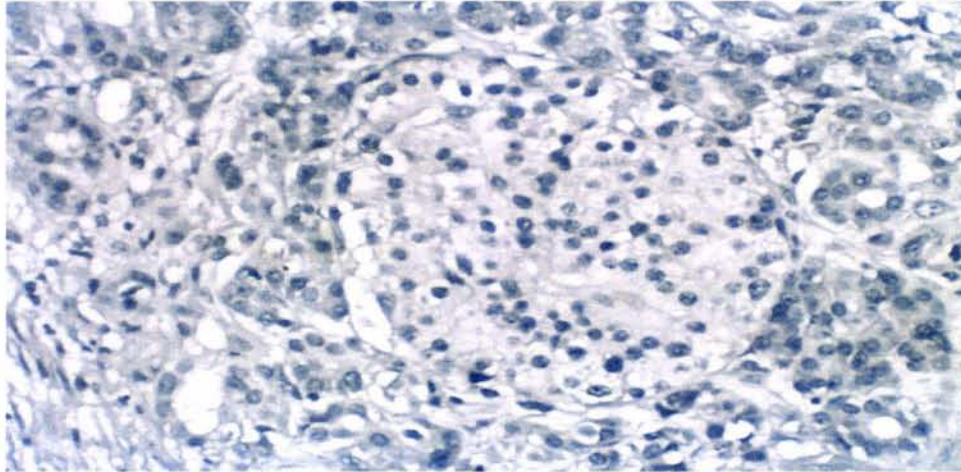


Fotomicrografía de páncreas normal humano.

En el *panel B* se observa la inmunolocalización del *receptor de estrógenos beta* en el endotelio de los vasos sanguíneos entre los acinos pancreáticos. Material incluido en parafina, revelado con DAB y contrateñido con hematoxilina.

Fotomicrografía de páncreas normal humano.

El *panel C* muestra un islote pancreático con péptido neutralizante como control interno del anticuerpo del receptor de estrógenos beta. Material incluido en parafina, revelado con DAB y contrateñido con hematoxilina.



Fotomicrografía de páncreas normal humano.

En el *panel D* se observa tejido control positivo (corte de carcinoma de glándula mamaria), para el receptor de estrógenos beta. Material incluido en parafina, revelado con DAB y contrateñido con hematoxilina.

DISCUSION

La relación entre el adenocarcinoma del páncreas y alteraciones en el perfil de andrógenos en el plasma de hombres fue lo que llevo a nuestro laboratorio a investigar de una manera propositiva la conexión entre las hormonas esteroideas y la fisiología y patología del páncreas. En 1987, Robles-Díaz y col (80), demostraron que en un grupo de 22 pacientes con cáncer del páncreas había cambios en el perfil de andrógenos del plasma, caracterizados por testosterona baja, y una relación testosterona/dihidrotestosterona (T/DHT) menor a 5. Esos cambios no se observaban en pacientes con cáncer de otras partes del tubo digestivo o en pacientes con pancreatitis crónica. En ese tiempo se propuso la relación T/DHT como un marcador tumoral del páncreas.

La especificidad y la sensibilidad de la relación T/DHT se evaluó, comparándola contra el marcador antigénico CA 19-9. En 21 casos de cáncer de páncreas y 62 controles con cánceres digestivos diferentes a páncreas y con enfermedades no malignas pancreatobiliares, la especificidad de la relación T/DHT como marcador tumoral fue del 98 %, significativamente mejor que el 79 % obtenido cuando se uso el antígeno CA19-9 (81). Estos datos confirmaban que cambios en los andrógenos estaban relacionados con el adenocarcinoma del páncreas. No estando claro si las alteraciones de los andrógenos eran causa o efecto de la neoplasia.

En los modelos experimentales de cáncer del páncreas inducidos por la inyección de mitógenos (azaserina), la incidencia era mucho mayor en animales macho (82), lo que llevó a suponer que algún factor hormonal, probablemente de origen testicular influía en la susceptibilidad a la formación de tumores. En 1987 el mismo grupo de investigadores demuestra que la susceptibilidad de las ratas a desarrollar tumores pancreáticos inducidos por la azaserina es mediada por testosterona (83).

Si en los casos clínicos se tenían alteraciones de andrógenos, y los modelos experimentales demostraban que la testosterona facilitaba el desarrollo de tumores pancreáticos, lo que quedaba por demostrar era que el páncreas tuviera la capacidad de transformar o metabolizar esteroides.

La actividad de dos enzimas que transforman esteroides, la 5 alfa reductasa y la aromatasas había sido detectada en homogenados pancreáticos libres de células. Los tejidos analizados provenían de sujetos adultos normales, de fetos humanos y de tumores (84). En 1990 se describió por primera vez la actividad conjunta del complejo enzimático 3-beta hidroxisteroide deshidrogenasa–delta 5-4 isomerasa en el páncreas (85). En ese estudio se describió y caracterizó la actividad enzimática en mitocondrias de páncreas canino, demostrando la conversión de pregnenolona a progesterona y de dehidroepiandrosterona a delta 4 androstendiona.

Estas evidencias experimentales fueron ampliadas con la demostración de la actividad de la 17-β-hidroxisteroide deshidrogenasa, por la conversión *in vivo* de testosterona en androstendiona, 5-α- dihidrotestosterona y estradiol en un modelo de perfusión en páncreas canino (1).

Con las evidencias experimentales no queda duda de que el páncreas es un órgano que tiene la capacidad de transformar esteroides y que expresa la actividad de las enzimas responsables de la síntesis de progestágenos, andrógenos y estrógenos. Estas rutas metabólicas caracterizan a los denominados órganos esteroideogénicos, siendo los más estudiados las glándulas suprarrenales, los ovarios, los testículos y la placenta. Una característica de los tejidos esteroideogénicos es la capacidad de transformar colesterol en pregnenolona. Esta transformación es dependiente de la actividad de un complejo enzimático, ubicado en la membrana interna de las mitocondrias denominado Citocromo P450_{sc} y que está codificado en el gen CYP11A1 del cromosoma 15 humano.

Uno de los objetivos de este trabajo de tesis fue dilucidar si el páncreas podría ser considerado bajo el criterio antes señalado un órgano esteroideogénico. Empleando el modelo de páncreas canino, que ya había sido utilizado con éxito para demostrar la presencia de enzimas que transforman esteroides, demostramos que las mitocondrias aisladas tienen la capacidad de utilizar al colesterol como sustrato para la formación de pregnenolona.

Esta reacción se ha utilizado como indicativa de esteroidogénesis en la glándula suprarrenal y su cinética se ha estudiado en presencia de inhibidores específicos de la reacción.. Los datos que obtuvimos en una serie de 10 experimentos demostraron: 1) la conversión de colesterol en pregnenolona, 2) que la producción de pregnenolona es dependiente del tiempo de la reacción, 3) que la reacción enzimática es susceptible de ser inhibida con aminoglutetimida.

Todos estos datos concuerdan con los reportes de experimentos semejantes realizados en glándulas suprarrenales, cuerpo lúteo y testículo (86). La conclusión de estos experimentos fue que las mitocondrias de páncreas expresan actividad de Citocromo P450_{sc}. Faltaba demostrar la presencia del transcrito del gen para afirmar sin lugar a dudas que no se trataba de una reacción semejante, o de una cadena de reacciones codificadas por diversos genes. El siguiente enfoque experimental fue identificar en homogenados de tejido pancreático el mensajero específico del gen CYP11A1. Para ese propósito se utilizó el modelo experimental de la rata y se amplificaron las señales moleculares empleando las técnicas de RT-PCR.

Como se demuestra en la sección de resultados, las muestras de ovario y suprarrenal produjeron bandas de aprox. 330 pb que corresponden a la talla esperada para el fragmento del cDNA, las muestras de músculo esquelético resultaron negativas y las muestras de páncreas produjeron en el Southern blot una banda de hibridación similar a las de ovario y suprarrenal. Para confirmar la autenticidad del gene se secuenció el cDNA de la muestra de páncreas hibridada y se comparó en su secuencia con la reportada para el exón II y parte del exón I . El análisis de las secuencias fue idéntico, lo que autenticó la presencia de transcritos del gene CYP11A1 en el páncreas. En suma, se puede afirmar que la conversión de colesterol a pregnenolona en las mitocondrias aisladas del páncreas se debe a la actividad enzimática del citocromo P450_{sc}.

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

Si bien ha quedado definido que el páncreas es un órgano esteroideogénico, faltaba demostrar el efecto que tienen los esteroides sexuales sobre el tejido pancreático. Ya se ha comentado que los andrógenos favorecen la aparición de neoplasias en modelos experimentales y que epidemiológicamente algunos tipos de tumores se presentan con diferente frecuencia en hombres y en mujeres. Una posible explicación para el comportamiento sexualmente dimórfico tendría que estar dado por la presencia de receptores para esteroides en el páncreas. Con base en la información de la literatura y debido a que no existían reportes que hubieran demostrado la presencia del receptor de andrógenos (AR) en el tejido pancreático, nos propusimos investigar la expresión y regulación de ese receptor empleando como modelo experimental a la rata.

El receptor de andrógenos, es un regulador específico de la transcripción de algunos genes y se activa y regula su síntesis por la presencia de ligandos, típicamente testosterona (87). Con base en este hecho, se diseñaron los diferentes grupos experimentales. Se buscaron condiciones donde las concentraciones de testosterona fueran muy bajas (animales neonatales, hembras adultas y machos adultos castrados), medias (machos adultos intactos) y altas (machos adultos castrados y tratados con testosterona exógena a dosis farmacológica). Esto con el objeto de observar la regulación por sustrato de la expresión del receptor en los tejidos blanco (próstata, vesículas seminales y testículo) y en el páncreas como tejido problema.

Como era de esperarse, la expresión del receptor de andrógenos se observó de acuerdo a lo previamente descrito, en las muestras de los tejidos blanco (88). En ninguna de las muestras de páncreas se apreció señal de hibridación por el análisis de Northern blot. Ante este dato negativo se plantearon las siguientes posibilidades; a) el páncreas no expresa la misma molécula receptora para andrógenos presente en los tejidos sensibles a testosterona o, b) el nivel de expresión está por debajo del límite de detección del Northern blot.

Se decidió recurrir como primera instancia a una técnica de amplificación de la señal de transcripción, combinando la transcripción reversa del RNA total extraído de las muestras de páncreas con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Esta técnica había sido utilizada con éxito en la identificación de la expresión de algunos genes en el ovario de la rata (89).

Después de someter las muestras de páncreas a RT-PCR, el análisis de Southern blot reveló señales positivas de hibridación al cDNA del AR. Como se mostró en la sección de resultados, el patrón de hibridación varió en forma inversamente proporcional a la concentración de testosterona de los animales donantes. Esas variaciones en la expresión del mRNA del AR reflejaban el efecto regulador a nivel geonómico del sustrato sobre la expresión del gene, tal como se presenta en los tejidos blanco. Para eliminar la posibilidad de que los cambios en la expresión fueran debidos a un error experimental, se coamplificó en la misma serie de muestras al mRNA del gene de la ciclofilina. La hibridación de la ciclofilina fue constante en todas las muestras, por lo que inferimos que las variaciones observadas en el AR fueron debidas al diferente ambiente androgénico de los animales y no al proceso de amplificación de la señal.

Se concluyó en este experimento, que a) la actividad transcripcional del AR en el páncreas está presente, aunque en mucho menor proporción que en los tejidos considerados como dependientes de andrógenos, y b) que aun a pesar de la baja expresión génica, ésta se regula por la presencia del ligando específico. Estas dos características se interpretaron como indicativas de la funcionalidad del AR en páncreas.

Hay ya evidencias experimentales de la respuesta del páncreas como órgano blanco de andrógenos. En estudios recientes se ha demostrado que la testosterona aumenta los niveles del mRNA de insulina *in vivo* e *in vitro*, que las concentraciones circulantes de testosterona modulan la secreción de la insulina, y que en cultivo de islotes tratados con testosterona se incrementa la actividad del gene promotor de la insulina (90).

Desde el punto de vista clínico, la incidencia de tumores pancreáticos está relacionada con el sexo y la edad de los individuos. Un ejemplo de este dimorfismo sexual es la incidencia del adenocarcinoma. Durante la edad reproductiva (hasta los 45 años de edad), la frecuencia es tres veces mayor en el sexo masculino, pero después de los 55 años la frecuencia es igual en ambos sexos (74, 76). Estos cambios sugieren que factores gonadales, muy probablemente los esteroides sexuales tienen un papel importante en la predisposición o protección para la aparición de este tumor.

El aparente efecto protector de los estrógenos en las etapas tempranas de la carcinogénesis experimental ha sido descrito en algunos modelos experimentales (91), pero no se ha esclarecido si es por el efecto anti-androgénico de los estrógenos o una propiedad intrínseca de estos últimos compuestos. Los datos clínicos sugieren que es la primera posibilidad (efecto antiandrogénico) la que pudiera estar relacionada con el efecto antitumoral.

A los esteroides ováricos (estrógenos y progesterona) también se les ha involucrado en el desarrollo de tumores pancreáticos. Existen reportes en la literatura de casos clínicos, en los que tumores del páncreas, predominante quísticos, se presentan con mayor frecuencia en el sexo femenino (9.5 a 1) y preferentemente en mujeres en edad reproductiva (92).

Uno de estos casos es el tumor quístico-papilar (PCN), el cual es una neoplasia de baja malignidad y en el cual se ha sugerido la presencia de receptores para estrógenos (93). Con el objetivo de relacionar el efecto de los esteroides ováricos en el desarrollo del PCN y debido a la poca información existente en la literatura con ese tipo de tumores, se decidió investigar en una serie de PCN la expresión de los receptores para progesterona y estrógenos.

Se consiguieron muestras de PCN incluidas en parafina, en las cuales se utilizó la técnica de inmunohistoquímica. El objetivo fue inmunolocalizar la proteína receptora utilizando anticuerpos específicos contra el receptor de progesterona (PR), y de los subtipos, alfa y beta del receptor de estrógenos (ER). En el 85 % de los casos (6 de 7 muestras estudiadas) se identificó el PR. En el caso del ER, se observó que la isoforma beta del receptor se expresa en el mismo porcentaje que el PR, pero la isoforma alfa, solo se identificó en el 28% de los casos (2 de 7). La baja expresión del ER alfa en este tipo de neoplasia, puede ser la causa por la que algunos autores reportaban como ausente a este receptor, ya que la mayoría de los estudios reportados se hicieron antes de la clonación del ER beta humano (94). Esta diferencia en la expresión de las isoformas del ER, es una manifestación de la actividad tejido específico de los estrógenos como ha sido descrita para otros tejidos (95).

La predominancia del ER beta puede estar relacionada con la baja malignidad del tumor, como se demostrado en el cáncer de mama (96). A diferencia del tejido pancreático normal donde los receptores se expresan principalmente en las células de los islotes, en el tejido tumoral los receptores se inmunolocalizaron en las células acinares. Con estos resultados podemos concluir que los esteroides ováricos tienen receptores específicos en el tejido pancreático, y que el receptor de estrógenos expresa las dos isoformas conocidas, pero en forma preferencial la isoforma beta. La caracterización del tipo de receptores presentes en el páncreas, y su capacidad de regularse, abren la posibilidad de ensayar terapias hormonales específicas en aquellos pacientes con tumores no resecables, metastásicos o recurrentes.

CONCLUSIONES

- *En homogenados de páncreas de animales en diversas condiciones endocrinas se demostró la presencia del mRNA del receptor para andrógenos. Aún cuando la expresión genética del receptor de andrógenos es baja, las concentraciones del mRNA específico cambiaron dependiendo de la concentración de andrógenos en el medio. Estos cambios son similares a los reportados en tejidos que responden a los andrógenos. Estos resultados se interpretan como una evidencia de la funcionalidad del receptor de andrógenos en el páncreas.*
- *Empleando la reacción acoplada de la transcriptasa reversa y la reacción en cadena de la polimerasa fue posible demostrar en un análisis de Southern Blot, la presencia de los productos de transcripción para el gene CYP11A1*
- *El producto de transcripción del gene CYP11A1 en el tejido pancreático, es de talla similar al expresado en los tejidos esteroideogénicos (ovario y glándulas suprarrenales)*
- *Se demostró en preparaciones de mitocondrias aisladas por la transformación in vitro de colesterol en pregnenolona que el complejo enzimático citocromo P450_{sc} tiene actividad en el tejido pancreático.*
- *La presencia de los transcritos del gene CYP11A1 y la actividad de su producto de traducción son evidencia de la actividad esteroideogénica de novo del páncreas*
- *Se demostró por inmunohistoquímica la presencia del receptor de estrógenos y del receptor de progesterona en páncreas humano. Se demostró que la forma predominante de expresión del receptor de estrógenos es la isoforma beta.*

El páncreas es un órgano esteroideogénico, responde al efecto de hormonas esteroideas, y tiene un comportamiento sexualmente dimórfico.

1. C. Fernández-del Castillo, V. Díaz-Sánchez, G. Varela-Fascinetto, A. Altamirano, A. Odor-Morales, RM. López-Medrano, G. Robles-Díaz. *Testosterona biotransformation by the isolated perfused canine pancreas*. Pancreas. 6 (1991) pp. 104-111
2. K. Iwahashi, HS. Ozaki, M. Tsubaki, JI. Onishi, Y. Takeuchi, Y. Ichikawa. *Studies of the immunohistochemical and biochemical localization of the cytochrome P450_{scc}-linked monooxygenase system in the adult brain*. Biochim. Biophys. Acta. 1035 (1990) pp. 182-189
3. C. Fernández-del Castillo, G. Robles-Díaz, V. Díaz-Sánchez, A. Altamirano. *Pancreatic cancer and androgen metabolism high androstendione and low testosterona serum levels*. Pancreas. 5 (1990) pp. 515-518
4. R. Tsuchiya, N. Fujisawa. *On the etymology of pancreas*, Int. J. Pancreatology. 21 (1997) pp. 269-272
5. Aristotle. *Medical terms used by Aristotle in medical etymology*, in Stedman's Medical Dictionary Illustrated 23rd ed., 3rd Asian ad. Williams & Wilkins, Baltimore, Maruzen, Tokyo, 1996.
6. H. von Staden. *Herophilus, the art of medicine in early Alexandria*, Cambridge University Press, Cambridge, (1989) pp. 72
7. HH. Von Dorsche, S. Falkmer. *Ontogeny of human Langerhans islets. A review of some light and electron microscopical, immunohistochemical, and functional data on fetal development of the endocrine pancreas*, J. Evol. Bioch Phys. 36 (2000) pp. 701-718
8. HT. Debas, SJ. Mulvihill. *Neuroendocrine design of the gut*, Am J. Surg. 161 (1991) pp 243-245
9. QS. Pan, ZP, Fang, FJ. Huang. *Identification, localization, and morphology of APUD cells in gastroenteropancreatic system of stomach-containing teleosts*, World J. Gastroenterol. 6 (2000) pp. 842-847

10. LM. Montuenga, L. Guembe, MA. Burrell, ME. Bodegas, A. Calvo, JJ. Sola, P. Sesma, AC. Villaro. *The diffuse endocrine system from embryogenesis to carcinogenesis*. *Prog. Histochem. Cytochem.* 38 (2003) pp. 155-158
11. LC. Murtaugh, DA. Melton. *Genes, signals, and lineages in pancreas development*. *A. Rev. Cell. Develop. Biol.* 19 (2003) pp. 71-89
12. H. Winkler. *The adrenal chromaffin granule: a model for large dense core vesicles of endocrine and nervous tissue*. *J. Anat.* 183 (1993) pp. 237-252
13. B. Sawicki. *Evaluation of the role of mammalian thyroid parafollicular cells*. *Acta Histochem* 97 (1995) pp. 389-399
14. DE. Bockman, GS. Sohal. *A new source of cells contributing to the developing gastrointestinal tract demonstrated in chick embryos*. *Gastroenterology* 114 (1998) pp. 878-882
15. B. Amory, J.L. Mourmeaux, J.L. C. Rémacle. *In vitro cytodifferentiation of perinatal rat islet cells within a tridimensional matrix of collagen*. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 24 (1988) 91-99
16. C. Saillan-Barreau, M. Dufresne, P. Clerc, D. Sánchez, H. Corominola, C. Moriscot, O. Guy-Crotte, C. Escrieut, N. Vaysse, R. Gomis, N. Tarasova, D. Fourmy. *Evidence for a functional role of the cholecystinin-B/gastrin receptor in the human fetal and adult pancreas*. *Diabetes* 48 (1999) pp. 2015-2021
17. I. Nishimori, M. Kamakura, K. Fujikawa-Adachi, M. Nojima, S. Onishi, MA. Hollingsworth, A. Harris. *Cholecystinin A and B receptor mRNA expression in human pancreas*. *Pancreas* 19 (1999) pp.109-113
18. WJ. Hamilton, HW. Mossman. *Embriología humana*. Edt. Intermedica (1999) pp. 428-435
19. LK. Moore, TVN. Persaud. *Embriología clínica: desarrollo del páncreas*. Edt. Elsevier (2004) pp. 264-267

20. P.C. Freeny, TL. Lawson. *The pancreas*. En: Charles Putman & Carl E Ravin (eds). Vol. 1, 2a. ed. Philadelphia: WB Saunders Company. (1994) pp. 961-986
21. M. Polak, L. Bouchareb-Banaei, R. Scharfmann, P. Czernichow. *Early pattern of differentiation in the human pancreas*. Diabetes 49 (2000) pp. 225-232
22. M. Campuzano, MF. Herrera, LF. Uscanga, G. Robles-Díaz. *Páncreas*. Edit. McGraw-Hill Interamericana (2000) pp. 11-21
23. KL. Moore, AF. Dalley. *Anatomía*. Lipincott Williams-Wilkinsm Edit. Medica Panamericana 4ª ed. (2002)
24. F. Geneser. *Histología: Glándulas digestivas anexas: páncreas*. Edit. Medica Panamericana (2000) pp 510-518
25. AC. Guyton, JE. Hall. *Tratado de fisiología medica*. Edt. McGraw-Hill Interamericana (2001) 10ª ed. pp. 898-901
26. G. Adler. *Regulation of human pancreatic secretion*. Digestion 58 (1997) pp. 39-42
27. J. Morisset, S. Julien, J. Laine. *Localization of cholecystokinin receptor subtypes in the endocrine pancreas*. J. Histochem. Cytochem. 51 (2003) pp. 1501-1513
28. EM. Bailyes, PC. Guest, JC.Hutton. “*Insulin synthesis*” Ashcroft, FM y Ashcroft, SJH. Eds. Oxford University Press. Cap. 3, 1era. ed., New York, U.S.A. (1992) pp. 64-92
29. CA. Maurer, HU. Baer, TH. Dyong, E. MuellerGaramvoelgyi, H. Friess, C. Ruchti, JC. Reubi, MW. Buchler. *Carcinoid of the pancreas: clinical characteristics and morphological features*. Eur. J. Cancer. 32A (1996) pp. 1109-1116
30. FS. Greenspan, GJ. Strewler *Endocrinología básica y clínica*. Edit. Manual moderno. 4ª. Edición (2000) pp. 685-687

31. DF. Steiner, G.I. Bell, HS. Tager, AH. Rubenstein. *Chemistry and biosynthesis of the islet hormones: insulin, islet amyloid polypeptide (amylin), glucagon, somatostatin, and pancreatic polypeptide*. En: De Groot LJ (Ed). *Endocrinology*. 3rd. ed. Chicago: WB Saunders, (1995):1296-1299
32. W. Yang, A.A. Reyes, N.C. Lan. *Identification of the GABA a receptor subtype mRNA in human pancreatic tissue*. *FEBS Lett*. 341 (1994) pp. 257-262
33. RL. Sorenson, DG. Garry, TC. Brelje. *Structural and functional considerations of GABA in islets of Langerhans*. *Diabetes* 40 (1991) pp. 1365-1374
34. MD. Majewska. *Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA a receptor: mechanism of action and physiological significance*. *Prog. Neurobiol*. 38 (1992) pp. 379-395
35. T. Rosenbaum, R. Vidaltamayo, C. Sánchez-Soto, A. Zentella, M. Hiriart. *Pancreatic cells synthesize and secrete nerve growth factor*. *Proc. Natl Acad. Science, USA*. 95 (1998) pp. 7784-7788
36. MB. Schneider, J. Standop, A. Ulrich, U. Wittel, H. Friess, A. Andren-Sandberg, PM. Pour. *Expression of nerve growth factors in pancreatic neural tissue and pancreatic cancer*. *J. Histochem. Cytochem*. 49 (2001) pp. 1205-1210
37. SJ. Miknyoczki, AJP. Klein Szanto, BA. Ruggeri. *Neurotrophin-Trk receptor interactions in neoplasia a possible role in interstitial and perineural invasion in ductal pancreatic cancer*. *Critical Rev. Oncoge*. 7 1996 pp. 89-100
38. J. Morisset, H. Wong, JH. Walsh, J. Laine, J. Bourassa. *Pancreatic CCKB receptors their potential roles in somatostatin release and delta-cell proliferation*, *American Journal of Physiology-gastrointestinal and Liver Physiology* 279 (2000) pp. G148-G156
39. E. Ludvigsen, R. Olsson, M. Stridsberg, ET. Janson, Sandler. *Expression and distribution of somatostatin receptor subtypes in the pancreatic islets of mice and rats*. *J. Histochem. Cytochem*. 52 (2004) pp. 391-400

40. TW. Schwartz. *Development of pancreatic islets in pancreatic polypeptide-overexpressing mice*. Inter. J. Molec. Med. 14 (2004) pp. 201-205
41. I. Hanukoglu. *Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis*. J. Steroid Biochem Molec. Biol. 43 (1992) pp. 779-804
42. EP. Mensah-Brown, TA. Bailey, DJ. Pallot, A. Garner. *Peptidergic hormones and neuropeptides, and aminergic neurotransmitters of the pancreatic islets of the houbara bustard (Chlamydotis undulata)*. J Anat. 196 (2000) pp. 233-41
43. M. Hiriart, R. Vidaltamayo. *Hormonas pancreáticas*. Ciencia 53 (2002) pp. 36-46
44. GI. Bell, R. Pictet, WJ. Rutter, B. Cordell, E. Tischer, HM. Goodman. *Sequence of the human insulin gene*. Nature 284 (1980) pp. 26-32
45. LJ. DeGroot, M. Besser, HG. Burger, JL. Jameson, DL. Loriaux, JC. Marshall, WD. Odell, JT. Potts, AH. Rubenstein. *Endocrinology*. Eds. Saunder, Philadelphia, 1995.
46. J. Morisset, H. Wong, JH. Walsh, J. Laine, J. Bourassa. *Pancreatic CCKB receptors their potential roles in somatostatin release and delta cell proliferation*. American J. Physio. Gastro. Liver Physiol. 279 (2000) pp. G148-G156
47. JL. Ramírez, M. Grant, M. Norman, XP. Wang, S. Moldovan, FJ. De Mayo, C. Brunicardi, U. Kumar. *Deficiency of somatostatin (SST) receptor type 5 (SSTR5) in associated with sexually dimorphic changes in the expression of SST and SST receptors in brain and pancreas*. Molec. Cellular. Endo. 221 (2004) pp. 105-119
48. F. Panzuto, C. Severi, R. Cannizzaro, M. Falconi, S. Angeletti, A. Pasquali, VD. Corleto, B. Annibale, A. Bounadonna, P. Pederzoli, G. DelleFare. *Utility of combined use of plasma levels of chromogranin A and pancreatic polypeptide in the diagnosis of gastrointestinal and pancreatic endocrine tumors*. J. Endocri Invest. 27(2004) pp. 6-11
49. A. Bist, PE. Fielding, CJ. Fielding. *The sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol*. Proc. Natl. Acad. Sci. 94 (1997) pp. 10693-10698

50. Y. Lange, J. Ye, J. Chin. *The fate of cholesterol of exiting lysosomes*. J. Biol. Chem. 272 (1997) pp. 17018-17022
51. MP. Reinhart. *Intracellular sterol trafficking*. Experientia 46 (1990) pp. 599-611
52. F. Martínez, A. Uribe, MT. Espinosa-García, O. Flores-Herrera. *Las mitocondrias de tejidos esteroideogénicos*. Mensaje Bioquímico, XIX. Edit. por la facultad de medicina. UNAM. (1995) pp. 65-98
53. CJ. Fielding, PE. Fielding. *Intracellular cholesterol transport*. J. Lipid. Res. 38 (1997) pp. 1503-1521
54. LW. Miller. *Mitochondrial specificity of the early steps in steroidogenesis*. J. Steroid. Biochem. Molec. Biol. 55 (1995) pp. 607-616
55. V. Haucke, T. Lithgow. *The first steps of protein import into mitochondria*. J. Bioenergetics. Biomembranes. 29 (1997) pp. 11-17
56. D. Ardail, JP. Privat, M. Egret-Charlier, C. Levrat, F. Lerme, P. Louisot. *Mitochondrial contact sites lipid composition and dynamics*. J. Biol. Chem. 265 (1990) pp 18797-18802
57. AV. Grinberg, F. Hannemann, B. Schiffer, J. Muller, U. Heinemann, R. Bernhardt. *Adrenodoxin structure stability and electron transfer properties*. Prot. Struct. Func. Genet. 40 (2000) pp. 590-612
58. G. Queipo, M. Deas, C. Arranz, F. Larrea. *Sex hormone-binding globulin stimulates chorionic gonadotrophin secretion from human cytotrophoblasts in culture*. Hum. Reprod. 13 (1998) pp. 1368-1371
59. GL. Hammond, GV. Avvakumov, YA. Muller. *Structure function analyses of human sex hormone-binding globulin effects of zinc on steroid-binding specificity*. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 85 (2003) pp. 195-200
60. SM. Kahn, DJ. Hryb, AM. Nakhla, NA. Romas, W. Rosner. *Sex hormone-binding globulin is synthesized in target cells*. J. Endoc. 175 (2002) pp. 113-120

61. WM. Pardridge. *The transport of protein-bound hormones into tissue in vivo*. Endo. Rev. 2 (1981) pp. 103-123
62. M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz. *Steroid hormone receptors: many actors in search of plot*. Cell. 83 (1995) pp.851-857
63. JW. Welch. *The role of heat shock proteins as molecular chaperones*. Current Opinion Cell Biol. 3 (1991) pp. 1033-1038
64. JM. Schlesinger. *Heat shock proteins*. J.B.C. 265 (1990) pp. 12111-12114.
65. DF. Smith. *Chaperones in progesterone receptor complexes*. Sem. Cell. Develop. Biol. 11 (2000) pp. 45-52
66. T. Perlmann, RM. Evans. *Nuclear receptors in sicily: all in the famiglia*. Cell. 90 (1997) pp. 391-395
67. RJ. Pietras, I. Nemere, CM. Szego. *Steroid hormone receptors in target cell membranes*. Endocrine 14 (2001) pp. 417-427
68. T. Simoncini, AR. Genazzani. *Non-genomic actions of sex steroid hormones*. Eur. J. Endo. 148 (2003) pp. 281-292
69. DR. Nelson, L. Koymans, T. Kamataki. *P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature*. Pharmacogenetics 6 (1996) pp. 1-42
70. JJ. Muller, A. Lapko, G. Bourenkov, K. Ruckpaul, U. Heinemann. *Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis*. J. Biol. Chemistry. 276 (2001) pp. 2786-2789
71. C.R. Jefcoate, B.C. McNamara, I. Artemenko, T. Yamazaki. *Specific aspects of electron transfer from adrenodoxin to cytochromes P450_{ssc} and P450_{11 beta}*. J. Biol. Chemistry. 272 (1997) pp. 4883-4888

72. C.W. Welsch. *Host factors affecting the growth of carcinogen-induced rat mammary carcinomas: a review and tribute to Charles Brenton Huggins*. Cancer Res. 45 (1985) pp. 3415-3443
73. H.T. Lynch, O. Neb. *Genetics and pancreatic cancer*. Arch Surg. 129(1994) pp. 266-268
74. A. Andren-Sandberg, D. Hoem, PL. Backman. *Other risk factors for pancreatic cancer: hormonal aspects*. Annals. Oncology. 10 (1999) pp. 131-135
75. C. Chan, G. Bilbao, MF. Herrera. *Comportamiento biológico, alteraciones moleculares y factores pronósticos de los tumores de la encrucijada duodenopancreatobiliar*. Edit. McGraw-Hill Interamericana (2000) pp. 295-308
76. JC. Morales-Linares, TJ. Gómez-Méndez, C. Chan. *Carcinoma de páncreas: estudio retrospectivo de 32 años*. Rev. Guatemala. Cir. 4 (1995) pp. 84-90
77. DB. Lubahn, TR, Brown, JA. Simental. *Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86 (1989) pp. 9534-9538
78. K. Morohashi, Y. Fugi-Kuriyama, Y. Okada. *Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA of mitochondrial cytochrome P-450sc of bovine adrenal cortex*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81 (1984) pp. 4647-4651
79. SB. Sufi, A. Donaldson, SL. Jeffcoate. *Method manual of the programme for the provision of matched assay reagents for the radioimmunoassay of hormones in reproductive physiology*. Switzerland, World Health Organization. (1985)
80. G. Robles-Díaz, V. Díaz-Sánchez, JP. Mendez. *Low serum testosterone/ dihydrotestosterone ratio in patients with pancreatic carcinoma*. Pancreas 2 (1987) pp. 684-687
81. G. Robles-Díaz, V. Díaz-Sánchez, C. Fernández del Castillo, M. Morales, G. Aceves, E. Galván, A. Altamirano. *Serum testosterone dihydrotestosterone ratio and CA 19-9 in the diagnosis of pancreatic cancer*. American J. Gastroenterology. 86 (1991) pp. 591-594
82. D. Longnecker, B. Roebuck, J. Yager, H. Lilja, B. Siegmund. *Pancreatic carcinoma in azaserine treated rats*. Cancer 47 (1981) pp. 1562-1572
83. E. Lhoste, B. Roebuck, J. Stern, D. Longnecker. *Effect of orchiectomy and testosterona on the early stages of azaserine induced pancreatic carcinogenesis in the rat*. Pancreas 1 (1987) pp. 38-43

84. MJ. Iqbal, B. Greenway, ML. Wilkinson, PJ. Johnson, R. Williams. *Sex steroid enzymes aromatase and 5- α reductase in the pancreas a comparison of normal adult, foetal and malignant tissue*. Mol. Science 65 (1983) pp. 71-75
85. G. Mendoza-Hernández, I. López-Salache, JL. Rendón. *Delta-5-3- β -hydroxysteroid dehydrogenase–isomerase activity in canine pancreas*. Life Sciences. 47 (1990) pp. 467-475
86. VI. Uzgiris, CA. Whipple, HA. Salhanick. *Stereoselective inhibition of cholesterol side chain cleavage by enantiomers of aminoglutethimide*. Endocrinology. 101 (1977) pp. 89-92
87. M. Beato. *Gene regulation by steroid hormones*. Cell. 56 (1989) pp. 335-344
88. VE. Quarmby, WG. Yarbrough, DB. Luban, FS. French, EM. Wilson. *Autologous down-regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid*. Mol Endocrinol 4 (1990) pp. 22-28
89. RD. Koods, OC. Eric. *Expresion of basic fibroblast growth factor in the rat ovary detection of mRNA using reverse transcription-polymerase chain reaction amplification*. Mol Endocrinol 3 (1989) pp. 2041-2048
90. S. Morimoto, C. Fernández-Mejia, G. Romero-Navarro, N. Morales-Peza, V. Díaz-Sánchez. *Testosterone effect on insulin content, messenger ribonucleic acid levels, promoter activity, and secretion in the rat*. Endocrinology 142 (2001) pp. 1442-1447
91. C. Sumi, DS. Longnecker, BD. Roebuck, T. Brinck-Johnsen. *Inhibitory effect of estrogen and castration on the early stage of pancreatic carcinogenesis in fisher rats treated with azaserina*. Cancer Res 49 (1989) pp. 2332-2336
92. A. Morales, JM. Ruiz-Molina, H. Orozco, G. Robles-Díaz, V. Díaz-Sánchez. *Papillary-cystic neoplasm of the pancreas a sex steroid dependent tumor*. Int. J. Pancreatology. 24 (1998) pp. 219-225
93. 7th. International symposium. *Predictive oncology intervention strategies*. Montréal Canada 2003

93. A. Carbone, OF. Ranelletti, A. Rinelli, MF. Vecchio, L. Lauriola, M. Piantelli, A. Capelli. ***Type II estrogen receptors in the papillary cystic tumor of the pancreas.*** Am. J. Clin. Pathol. 92 (1989) pp. 572-576
94. E. Enmark, M. Peltö-Huikko, K. Gräfen. ***Human estrogen receptor beta gene structure, chromosomal localization and expression pattern.*** J. Clin. Endocrinol. Metab. 82 (1997) pp. 4258-4265
95. S. Nilsson, G. Kuiper, JA. Gustafsson. ***ER beta a novel estrogen receptor offers the potential for new drug development.*** Trends Endocrinol Metab. 9 (1989) pp. 387-395
96. K. Iwao, Y. Miyoshi, C. Egawa. ***Quantitative analysis of estrogen receptor beta mRNA and its variants in human breast.*** Int. J. Cancer 88 (2000) pp. 733-736



Androgen Receptor in the Rat Pancreas: Genetic Expression and Steroid Regulation

Vicente Díaz-Sánchez, Sumiko Morimoto, Angélica Morales, *Guillermo Robles-Díaz, and †Marco Cerbón

Departments of Reproductive Biology and *Gastroenterology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, and †Molecular Biology Unit in Reproductive Health, FES-Zaragoza, National Autonomous University of México, México City, México

Summary: Androgens influence the incidence and prevalence of pancreatic cancer in humans and animal models. To our knowledge there has been molecular demonstration of the presence of neither the androgen receptor (AR) nor transcripts of the AR gene. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)-Southern blotting was employed for molecular detection and measurement of the androgen receptor messenger ribonucleic acid (AR mRNA) in pancreas. Total RNA obtained from pancreas, prostate, seminal vesicles, and testes of neonatal and adult male and female rats, as well as castrated males substituted with testosterone cyclopentylate, was analyzed by Northern blot technique. Positive hybridization to AR cDNA was obtained in all tissues assayed but not in the pancreas. However, a clear AR ³²P cDNA hybridization signal was obtained in pancreatic tissues after

cDNA synthesis using RT-PCR-Southern blotting. The levels of the AR transcripts obtained by RT-PCR in the various pancreatic samples were as follows: adult females and neonatal animals > castrated adult males > adult males > castrated adult males substituted with testosterone. These results indicated that the pancreatic tissue possessed transcriptional activity of the AR gene, although to a lesser extent than the typical androgen responsive tissues (prostate and seminal vesicles). In conclusion, transcriptional activity of the AR gene in the pancreas seemed to be modulated by the androgenic milieu in the tissue similar to that reported for the classical androgen-responsive organs. **Key Words:** Androgen receptor—Reverse transcription—Polymerase chain reaction—Rat pancreas.

The pancreas is a mixed secretion gland, under the influence of peptide and steroid hormones. Experiments with azaserine-induced pancreatic tumors have demonstrated that orchietomized rats developed fewer and smaller atypical acinar cell nodules and that this protective effect of orchietomy is partially reversed with testosterone treatment (1). The finding of sex steroid biosynthetic enzymes in pancreatic tissue (2,3) and the demonstration of testosterone biotransformation by the isolated perfused pancreas strongly suggest the par-

ticipation of androgens in the pancreatic function. Binding proteins for estrogens, progesterone, and androgens have been described in normal and malignant tissue (4), but to our knowledge definitive evidence at the molecular level for the androgen receptor (AR) has not yet been provided. In the present communication, we attempt to detect, quantify, and determine the regulation of AR messenger RNA (mRNA) in the pancreas of animals in different endocrine conditions using reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification.

METHODS

Five groups of six Wistar strain rats each were formed as shown in Table I.

Manuscript received June 22, 1994; revised manuscript accepted October 11, 1994.

Address correspondence and reprint requests to Dr. V. Díaz-Sánchez, Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Tlalpan 14000, D.F. México.

RNA extraction. Pancreas, prostate, seminal vesicles, and testis were removed immediately after the animals were sacrificed, tissues were homogenized, and total RNA was isolated by the guanidine isothiocyanate-LiCl method (5). RNA concentration was determined by spectrophotometric analysis.

Northern blot. Twenty micrograms of total RNA for each sample was fractionated by electrophoresis on a 1% agarose gel and then transferred onto a nitrocellulose membrane and cross-linked at 80°C for 2 h. Prehybridization was performed by overnight incubation at 42°C in buffer (6). The membrane was then hybridized to a AR cDNA which was labeled with dCTP α -³²P by either nick translation (7) or random priming methods (8). After hybridization the membrane was washed under high-stringency conditions (6) and exposed to x-ray film at -70°C using an intensifying screen.

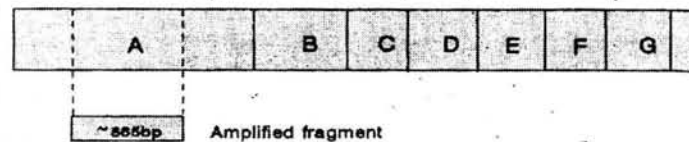
RT. Total RNA extracted from each pancreatic tissue was reverse transcribed to synthesize stranded cDNA. Briefly, 1 μ g of total RNA was incubated for 60 min at 42°C with 25 U of AMV reverse transcriptase (Promega) in a 20- μ l reaction volume containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol (DTT), 0.2 mM spermidine, 1 mM for each dNTP and 180 pmol of random hexadeoxynucleotide primers.

Oligonucleotide primers. The sequences of the oligonucleotide primers for PCR are shown in Fig. 1. Exons A through H are represented. The primers set flanked the AR cDNA sequence from base 383 to base 1248 as numbered by Lubahn et al. (9) and corresponded to the N-terminal domain of AR. The predicted size of the AR PCR product was about 865 bp.

PCR. The single-strand cDNA synthesized by RT was subjected to PCR. Twenty microliters of cDNA was amplified with 68 pmol of each primer and 5 U of Taq DNA polymerase (Promega) in a 100- μ l volume. The reaction was performed for 32 cycles. Each cycle consisted of an incubation period of 2 min at 95°C, 2 min at 55°C, and 2 min at 72°C, with

TABLE 1. Groups of Wistar strain rats studied (n = 6)

Group I	Neonatal
Group II	Adult females
Group III	Adult males
Group IV	Adult gonadectomized males
Group V	Adult gonadectomized males substituted with testosterone cyclopentylate, 5 mg



Nucleotide sequence of the primers:

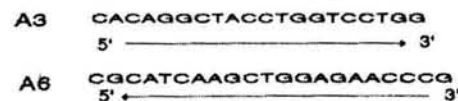


FIG. 1. Structure of the AR cDNA and the primer set for PCR. The primer set flanked the AR cDNA sequence from base 383 to base 1248 and corresponded to the N-terminal domain of AR. The predicted size of the AR PCR product was calculated as about 865 bp. Boxes A through H represent the exons of the AR.

the last phase of 72°C of the last cycle extended 10 min.

Southern blot. Ten microliters of PCR products from each sample was applied on a 1% agarose gel and subjected to electrophoresis, then transferred to nitrocellulose membrane and cross-linked to 80°C for 2 h. The membrane was then hybridized under conditions similar to those described for the Northern analysis.

RESULTS

To assess the extent of expression of the AR in the pancreas, we compared by Northern analysis the specific mRNA's hybridization obtained in different tissues. As shown in Fig. 2, RNA samples extracted from androgen-responsive organs (seminal vesicle and prostate) exhibited a positive hybridization with the specific cDNA of the AR. It was clear from those samples that the different levels of expression of the AR mRNA corresponded to the endocrine status of the animal. At low levels of circulating androgens (gonadectomized animals) the hybridization signal was markedly increased, and in the p

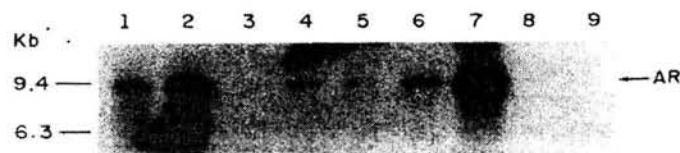


FIG. 2. Northern analysis of RNA prepared from different tissues. 1, seminal vesicles, intact adult males; 2, seminal vesicles, gonadectomized adult males; 3, negative control tissue; 4, prostate, gonadectomized adult males; 5, prostate, intact adult male; 6, seminal vesicles, intact adult males; 7, seminal vesicles, gonadectomized adult males; 8, pancreas, adult males; 9, pancreas, gonadectomized adult males. Molecular weight marker shown on the left.

of physiological levels of androgens the hybridization signal was less evident. These findings were interpreted as "down regulation" of the AR expression by the ligand steroid. The mRNA obtained from pancreatic tissue analyzed by Northern blot did not show evidence of hybridization to AR cDNA. To explore further the possibility of a low level of expression of the AR in pancreatic tissue, beyond the detection limit of the Northern analysis, we applied to the mRNA samples extracted from pancreas the RT-PCR, which recently was successfully employed to detect specific gene expression at low RNA levels in rat ovary (10). Total RNA extracted from the pancreas of neonatal animals and adult females, adult males, castrated adult males, and castrated adult males substituted with testosterone, as well as testicles (positive control sample), were reverse transcribed and the DNA products amplified by PCR. Testicle RNA not reverse transcribed was used as a negative control sample in these experiments. After standardization of the coupled reactions, we obtained RT-PCR products of about 860 bp, which corresponded to the predicted size of the AR PCR product for exon A (Fig. 3). The amplified region of exon A is located in the less homologous region among the steroid hormone receptor gene superfamily and therefore increased

the specificity for the identification of the AR. When the samples were analyzed by Southern blotting, a clear AR ³²P cDNA hybridization signal was obtained (Fig. 4). As shown in Table 2, the levels of the AR transcripts obtained by RT-PCR in the various pancreatic samples presented the following pattern: adult females and neonatal animals > castrated adult males > adult males > castrated adult males substituted with testosterone. These variations in mRNA expression for pancreatic AR indeed reflected physiological changes induced by the androgenic environment at genomic level. The specificity of androgen regulation upon its own receptor was assessed by a coamplification experiment using, in addition to the AR, the constitutive protein cyclophilin (11). As shown in Fig. 5, the densitometric profile of the Southern blot of cyclophilin was similar in pancreas obtained from either intact or castrated males.

DISCUSSION

Androgens induce development and maintenance of male reproductive tract tissues through their interaction with a specific receptor. The AR is a ligand-activated and trans-acting regulator of specific gene transcription (12). Studies on the AR have recently been facilitated by the cloning of AR cDNA. The AR has a domain structure characteristic of the steroid receptor family, with the greatest sequence similarity to the progesterone, mineralocorticoid, and glucocorticoid receptors (13). The use of AR cDNA probes in Northern blot analysis has confirmed the presence of AR mRNA in reproductive and nonreproductive tissues, but little is known about the hormonal regulation of AR mRNA, particularly in the nonclassical androgen-responsive tissues.

Pancreatic cancer affects more men than women; several clinical and experimental studies have focused on the possible role of androgens as indica-

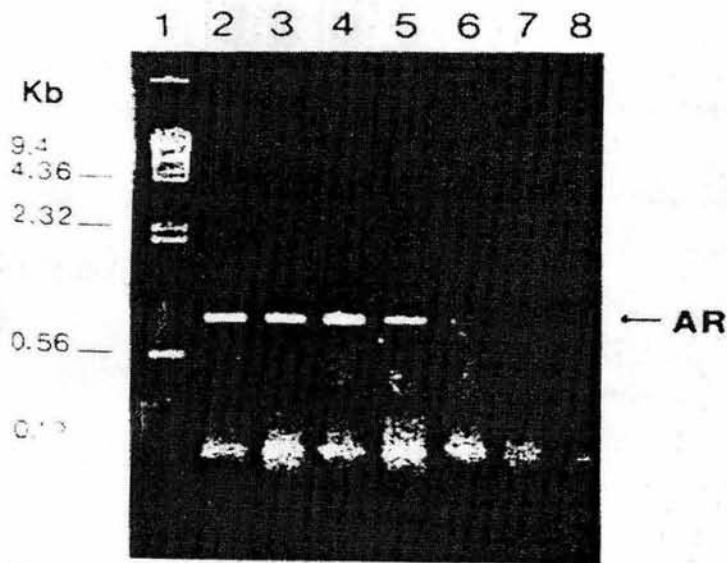


FIG. 3. RT-PCR products from total RNA. 1, λ HindIII; 2, pancreas, neonatal animals; 3, pancreas, adult females; 4, pancreas, castrated adult males; 5, pancreas, intact adult males; 6, pancreas, gonadectomized adult males treated with testosterone; 7, adult testicle; 8, negative control samples (RNA not reverse transcribed). The RT-PCR products were about 860 bp, which corresponded to the predicted size of the AR PCR product generated using the primer set of oligonucleotides selected for exon A.

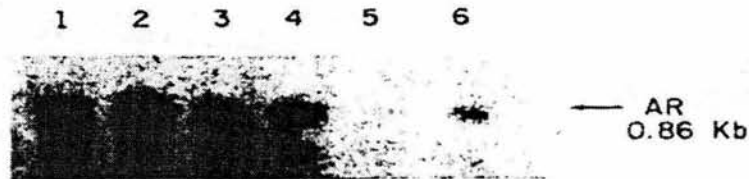


FIG. 4. Southern blot analysis of RT-PCR products from pancreatic RNA. 1, neonatal; 2, adult females; 3, castrated males; 4, intact males; 5, castrated males + testosterone; 6, testicle. The position of the theoretical AR segment is marked at the right.

TABLE 2. Densitometry analysis of the AR transcripts obtained by RT-PCR in pancreas

	mm ²
Female	1,561
Neonatal	1,523
Gonadectomized males	978
Intact males	584
Gonadectomized males + testosterone	144
Testes	344

Results are expressed as the total area under the curve calculated by the trapezoidal method.

tors and/or etiological factors in pancreatic carcinogenesis (14). Low serum testosterone levels have been found consistently in patients with pancreatic carcinoma. Moreover, a low testosterone/dihydrotestosterone ratio has been described, suggesting increased testosterone uptake by the tumor and increased biotransformation to the reduced metabolite 5 α -dihydrotestosterone (15). In experimental models of pancreatic carcinogenesis, the tumor growth rate is stimulated by testosterone, whereas it is inhibited by antiandrogens or castration (16). These studies suggest that testosterone exerts a trophic effect on the pancreatic carcinoma. AR is detectable using conventional ligand binding methods or Northern blot analysis in early-stage human prostatic adenocarcinomas, in Dunning R3327 G and H rat tumors, and in the LNCaP human metastatic prostate tumor cell line (17); however, in the nonclassical androgen responsive tissues, the ex-

pression of the AR could be below the detection limit. A strategy to increase the sensitivity for the detection of steroid receptor genes was reported by Hirata et al. This group reported, for the estrogen receptor in brain tissue, that using mRNA RT-PCR Southern blotting assay, the sensitivity increased; at least 10⁴-fold (18). In the present study we followed a similar approach to detect and quantify the AR mRNA in the pancreatic tissue. Positive hybridization to AR cDNA was obtained in pancreatic mRNA only after cDNA synthesis and amplification using RT-PCR. The pancreatic tissue expressed less transcriptional activity of the AR gene than the typical androgen-responsive organs; however, the transcriptional activity of the AR gene in the pancreas appears to be modulated by the androgenic milieu, similar to that reported for androgen target organs (19). The results presented here demonstrate that in the pancreas, although the genetic expression of the androgen receptor is low, the levels of specific mRNA changed depending upon the androgen concentration, similar to that reported for androgen-responsive tissues. These findings are interpreted as evidence of the functionality of the AR in pancreas and gives further support to the hypothesis of an androgen dependency of some pancreatic tumors in animal models. Whether androgens contribute to the genesis of pancreatic cancer or modulate its development in humans deserves further investigation.

Acknowledgment: This work was partially supported by the Human Reproduction Programme of WHO (Geneva, Switzerland), The Rockefeller Foundation (New York, NY, U.S.A.), the PUIS-UNAM (Mexico City, Mexico) and CONACYT (Mexico City, Mexico). The molecular bioreagents for the AR detection were kindly provided by Dr. F. S. French, University of North Carolina.

REFERENCES

1. Meijers M, Visser CJT, Klijn JGM, et al. Effect of orchidectomy, alone or in combination with testosterone and cyproterone acetate on exocrine pancreatic carcinogenesis in rats and hamsters. *Int J Pancreatol* 1992;11:137-46.
2. Mendoza-Hernández G, López-Solache I, Rendón JL, Díaz-Sánchez V, Díaz-Zagoya JC. 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase activity in canine pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;152:376-82.
3. Fernández-dei-Castillo C, Díaz-Sánchez V, Varela G, et al. Testosterone biotransformation by the isolated perfused rat pancreas. *Pancreas* 1991;6:104-11.
4. Corbishley TP, Iqbal MJ, Wilkinson ML, Williams R. Androgen receptor in human normal and malignant prostatic tissue and cell lines. *Cancer* 1986;57:1992-5.
5. Cathala G, Sauvouret JF, Méndez B, et al. A method

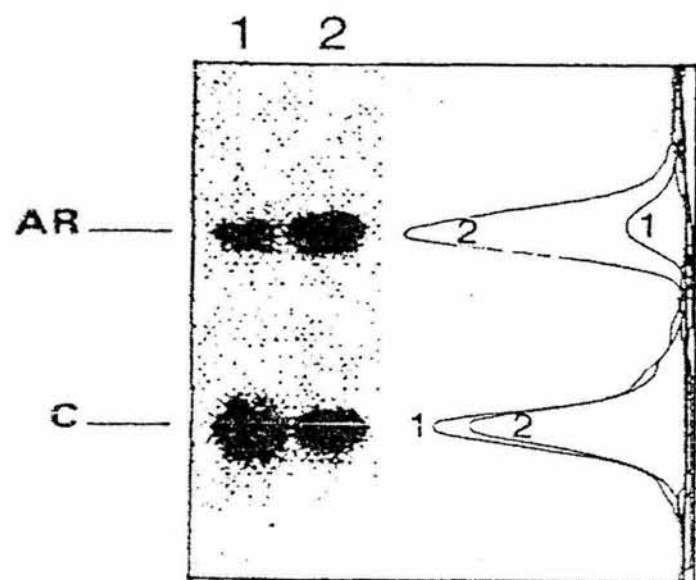


FIG. 5. RT-PCR Southern blotting of the AR and cyclophilin (C). 1, hybridization with AR cDNA; 2, Hybridization with C cDNA. A, Pancreas, intact males; B, pancreas, castrated males.

- isolation of intact, translationally active ribonucleic acid. *DNA* 1983;2:329-35.
3. Thomas PS. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:5201-18.
 7. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, eds. *Molecular cloning, a laboratory manual*. New York: Chris Nolan, 1986:10.6-8.
 8. Feimberg A, Vogelstein V. A technique for radiolabelling restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983;137:6-13.
 9. Lubahn DB, Brown TR, Simental JA, et al. Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:9534-8.
 10. Koo RD, Erik OC. Expression of basic fibroblast growth factor in the rat ovary; detection of mRNA using reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. *Mol Endocrinol* 1989;3:2041-8.
 11. Haendler L, Hoerter-Warbinek R, Hofer E. Complementary DNA for human T-cell cyclophilin. *EMBO J* 1987;6:547-50.
 12. Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 1989; 56:335-44.
 13. De Vos P, Claessens F, Peeters B, Rombauts W, Heyns W, Verhoeven G. Interaction of androgen and glucocorticoid receptor DNA-binding domains with their response elements. *Mol Cell Endocrinol* 1983;90:R11-6.
 14. Benz C, Hollander C, Miller B. Endocrine-responsive pancreatic carcinoma: steroid binding and cytotoxicity studies in human tumor cell lines. *Cancer Res* 1986;46:2276-81.
 15. Fernández-del-Castillo C, Robles-Díaz G, Díaz-Sánchez V, Altamirano A. Pancreatic cancer and androgen metabolism: high androstenedione and low testosterone serum levels. *Pancreas* 1990;5:515-8.
 16. Greenway B, Duke D, Pym B, Iqbal J, Johnson P, Williams R. The control of human pancreatic adenocarcinoma xenografts in nude mice by hormone therapy. *Br J Surg* 1982; 69:595-7.
 17. Tilley W, Willson C, Marcelli M, McPaul M. Androgen receptor gene expression in human prostate carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1990;50:5382-6.
 18. Hirata S, Osada T, Hirai M, Hagihara K, Kato J. Expression of estrogen receptor in the rat brain. Detection of its mRNA using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;41:583-7.
 19. Quarmby VE, Yasbrough WG, Luban DB, French FS, Willson EM. Autologous down-regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol* 1990;4:22-8.

Synthesis of Steroids in Pancreas: Evidence of Cytochrome P-450scc Activity

Angélica Morales, *Adela Cuéllar, †Jorge Ramírez, Felipe Vilchis, and Vicente Díaz-Sánchez

*Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán; *Department of Biochemistry, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez; and †Instituto de Fisiología Celular, National Autonomous University of México, México City, México*

Summary: In pancreas, the activities of several sex steroid-transforming enzymes have been reported. Data have been obtained in perfused organs, total tissue homogenates, and subcellular organelles. These data, concurrent with the description of the presence of ligand-regulated steroid receptors, as well as the sexually dimorphic behavior of some pancreatic tumors, are clear evidence in support of the participation of steroid hormones in the pancreatic function. In this study, the steroidogenic ability of the pancreas was demonstrated by two different methods: (a) in tissue homogenates, by the identification of cytochrome P-450scc gene (CYP11A) transcripts after reverse transcription–polymerase chain reaction amplification (RT-PCR); and (b) in isolated mitochondria by the glutethimide-dependent inhibition of cholesterol–pregnenolone biotransfor-

mation. The results obtained in a series of independent experiments showed that (a) the pancreatic tissue possessed transcriptional activity of the CYP11A gene, although to a lesser extent than the typical steroidogenic tissues, and (b) isolated mitochondria obtained from the pancreas were able consistently to synthesize pregnenolone; furthermore, the addition of the specific inhibitor aminoglutethimide (AMG) blocked its synthesis. On the whole, these findings are interpreted as clear evidences of the activity of the cytochrome P-450scc enzymatic complex (P450scc), responsible for the transformation of cholesterol into pregnenolone and considered the first and limiting step in steroid biosynthesis. **Key Words:** Cytochrome P-450scc—Pancreatic mitochondria—Pregnenolone biosynthesis.

In human pancreatic tissue (adult and fetal), steroid-transforming enzyme activities such as the aromatase complex and the 5 α -reductase have been found in cell-free homogenates as well as in the mitochondrial fraction of subcellular preparations (1). In canine pancreas, we previously reported the activity of the 17 β -hydroxysteroid-dehydrogenase (2), and in the same experimental model, the activity of the 3 β -hydroxysteroid-dehydrogenase also was reported (3). These findings taken together are strong evidence that in the human as well as in the dog pancreatic tissue, there is a very active biotransformation of steroid hormones. Furthermore in dynamic studies such as the isolated perfused canine pancreas, infused [³H]testosterone is readily transformed

into other [³H]C-19 (mainly androstenedione) and [³H]C-18 steroid metabolites (4). Although species-specific differences must not be disregarded, it is very likely that in human pancreas, the same conversion takes place. In support of this supposition is the finding that male patients with pancreatic carcinoma show alterations in the circulating androgen profile. There is no experimental evidence in human pancreas to show that the same phenomenon takes place; however, male patients with pancreatic carcinoma show alterations in the androgen profile. The changes are characterized by low testosterone, high androstenedione serum concentrations and a low testosterone/dihydrotestosterone (T/DHT) ratio (5). This distinctive serum androgen profile is seen only in male subjects with adenocarcinoma and has been proposed as a potential tumor marker for diagnosis, as well as for follow-up purposes (5,6).

All of these experimental and clinical data strongly suggest a role for steroid hormones in the physiology/pathology of the pancreas and the possibility that the

Manuscript received January 22, 1998; revised manuscript accepted November 16, 1998.

Address correspondence and reprint requests to Dr. V. Díaz-Sánchez, Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador, Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Tlalpan 14,000, D.F. México. E-mail: vidisa@quetzal.innsz.mx

pancreas, in addition to its well-documented ability to transform steroids, could also be capable of synthesizing steroid hormones from cholesterol.

Cytochrome P-450_{scc} (P450_{scc}) is the enzyme that catalyzes the side-chain cleavage reaction of cholesterol to yield pregnenolone; this is described as the first and rate-limiting reaction in the biosynthesis of steroid hormones (7). It is well known that P450_{scc} is localized in the inner mitochondrial membrane of the steroidogenic tissues, such as those from adrenal cortex, ovaries, testes, and placenta, and constitutes the expression protein of the CYP11A gene (8–10). Recent immunochemical and biochemical studies showed that P450_{scc} is also present in mitochondria from other tissues such as the white-matter cells of the brain (11,12). To investigate whether the pancreas has the capacity to synthesize steroid hormones from cholesterol, we looked for specific transcripts of the CYP11A gene in tissue homogenates and for the conversion of cholesterol into pregnenolone in isolated mitochondria preparations.

METHODS

Preparation of mitochondria

Pancreatic mitochondria were isolated from the pancreas of male mongrel dogs by differential centrifugation (13). The pancreas was excised, cleaned of fat and connective tissue, and chopped while suspended in cold isolation medium (IM) prepared with 0.3 M mannitol, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, and 0.2% fatty acid-free bovine serum albumin (BSA), adjusted to pH 7.4. The pancreatic tissue was gently homogenized in a Polytron (0.2 of maximal power) for 10 s and then centrifuged. The mitochondrial pellet (light brown) was separated and resuspended in 2 ml of IM supplemented with 3 mg/ml of BSA and incubated in ice for 10 min; the volume was adjusted to 40 ml with IM and centrifuged at 10,800 g for 10 min. The final mitochondrial pellet was resuspended to a final concentration of 20 mg protein/ml, determined by the method of Lowry et al. (14) by using bovine serum albumin (fraction V) as standard.

Incubation procedure

Intact mitochondria (5 mg/ml protein) were preincubated for 10 min at 30°C in a medium composed of 0.25 M sucrose, 20 mM KCl, 10 mM phosphate buffer pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 15 mM triethanolamine buffer pH 7.4, 50 μM trilostane, 200 μg cholesterol, and 10 mg BSA. Where indicated, 1 mM DL-aminoglutethimide (AMG reaction inhibitor) was added. The reaction was started by adding 10 mM malate. At the times indicated, 100-μl

aliquots were transferred into 1 ml hexane to stop the reaction. All samples were kept at 4°C until analyzed.

Pregnenolone quantification

Total pregnenolone was extracted from the incubation media aliquots by adding 10 ml of diethyl ether and shaking for 1 min. Organic solvent extracts were evaporated to dryness, and the solid residue was resuspended in 2 ml of phosphate-buffered saline, pH 7.2, 1% gelatin. Duplicate aliquots of 0.5 ml were assayed for their pregnenolone concentration. Pregnenolone was measured by a liquid-phase radioimmunoassay as described by Shears and Boyd (15). Sensitivity of the assay was 31.25 pg/ml with a coefficient of variation of 14%. The working range of the standard curve was from 31.25 to 1,000 pg/ml. Within- and between-batch variation was 11 and 15%, respectively. Data reduction and data analysis were performed by using a four-parameter logistic transformation of the standard curve (16).

Expression of P450_{scc} messenger RNA

Total cellular RNA was obtained from pancreas, skeletal muscle, adrenals, and ovaries of adult Wistar rats, by the method of Chomczynski and Sacchi (17). Samples of total RNA (20 μg) were denatured and electrophoresed on 1.0% agarose gels containing formaldehyde (final concentration, 6.0%). Samples were transferred to hybridization membranes (GeneScreen; DuPont, Boston, MA, U.S.A.) and subsequently cross-linked for 2 h at 80°C under vacuum. Membranes were prehybridized for 16–18 h at 42°C in 50% formamide, 2× 0.15 M sodium chloride, and 0.015 sodium citrate (SSC), 4× Denhardt's, 0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 100 μg/ml denatured salmon sperm DNA, and hybridized for 16–18 h at 42°C in 50% formamide, 4× Denhardt's, 120 mM sodium phosphate, pH 6.8, 0.1% SDS, 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 100 ng/ml salmon sperm DNA, by using a 1.2-Kb fragment of the bovine mitochondrial P450_{scc} complementary DNA (cDNA; kindly provided by Dr. K. Morohashi, Kyushu University, Fukuoka, Japan), labeled with ³²P. The labeled cDNA probes were prepared (to ~1–1.5 × 10⁸ cpm/μg DNA) by using a random primer-labeling kit (Prime-it II; Stratagene, La Jolla, CA, U.S.A.) and [³²P]deoxycytosine triphosphate (dCTP; s.a. 3,000 Ci/mmol; DuPont-NEN) (18).

After overnight hybridization, the membranes were washed in 2× SSC at room temperature (2× 15 min) and then with 0.1× SSC plus 0.1% SDS at 50°C for 15 min twice. The washed membranes were then exposed to Kodak X-OMAT film at –70°C by using intensifying screens (19). Oligonucleotide primers were designed

from the P450scc cDNA sequence reported by Morohashi et al. (20). Forward primer 5'GAG AAC TTC CAG AAG TAT GGC corresponded to 238–258 nucleotides, and reverse primer 5'GCC CTG CTG CTT GAT GCG corresponded to the reverse complement of 553–570 nucleotides. This set of primers was used for reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR) and sequence analysis.

The method for RT-PCR was performed as described in the protocol from the Perkin-Elmer ThermoStable rTth Reverse Transcriptase RNA-PCR Kit. The reaction was carried out on ~150 ng total RNA extracted from the pancreas, skeletal muscle, adrenals, and ovaries. Sterile distilled water and pAW109 RNA (308 bp) were used as negative and positive internal controls, respectively. Each RT reaction contained in addition to each RNA, 0.2 mM of each (A, C, G, and T) dNTPs, 0.75 μ M of the reverse primer, 1.0 mM MnCl₂, and 5.0 units of the rTth DNA polymerase diluted with water and buffer 1 \times up to 20 μ l. The reaction mixture was incubated at 70°C for 10 min, and then diluted with 80 μ l of a solution of 1.8 mM MgCl₂, 0.8 \times chelating buffer, and 0.15 μ M of the forward primer. PCR sequential cycles of amplification were performed by using a Perkin-Elmer Thermocycler for 35 cycles, each cycle consisting of 1 min at 95°C and 1 min at 60°C, the first step of 2 min at 95°C and the final step of 7 min at 60°C.

Southern blot analysis

Twenty-microliter aliquots of the amplified PCR products were separated by electrophoresis on a 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Band sizes of the products were determined by the mobility of ϕ X 174RF DNA HindIII fragments. The amplified DNAs were transferred to nylon membranes and then hybridized under conditions similar to those described earlier.

Sequence analysis

The nucleotide sequence of the RT-PCR product from the pancreas was determined through direct sequencing by the dideoxynucleotide chain-termination method (21). The RT-PCR product was sequenced in both strands by using an Amplicycle Sequencing Kit (Perkin Elmer-Roche, Branchburg, NJ, U.S.A.). Products of the sequencing reaction were analyzed on an 8% urea-polyacrylamide gel. After electrophoresis, the gels were dried and exposed to Kodak XAR-5 x-ray films for 8–16 h at room temperature.

RESULTS

Mitochondrial viability was estimated by measuring oxygen uptake through the respiratory chain by using a

Clark-type electrode. Mean respiratory control value was 6.5, and the mean ADP/O ratio was 2.5 by using malate-glutamate as substrate. The kinetics of cholesterol side-chain cleavage to yield pregnenolone was evaluated in 10 separate mitochondrial preparations. Pregnenolone production (pmol/mg protein) was assessed in serial measurements of two sets of tubes at 0-, 2-, 5-, 10-, 15-, 20-, and 30-min incubation. One set was the control condition, and the second had AMG as specific reaction inhibitor. Pregnenolone mean baseline values were similar for the control and the AMG group (25.76 \pm 8.19 pmol/mg and 23.12 \pm 6.80 pmol/mg of mitochondrial protein, respectively; p = 0.29). P450scc activity was triggered by the addition of malate, as a source of reducing equivalents to the mitochondrial preparations. The pattern for the time course of pregnenolone biosynthesis in the control was totally different from that in the AMG-treated mitochondria. In the absence of the specific P450scc inhibitor, pregnenolone concentrations increased as a function of time, reaching peak concentration values (1.5 times the baseline value) at 10 min of incubation, whereas in the AMG-treated mitochondria, a constant decline in pregnenolone levels was found throughout the sampling period. Individual values obtained in each experiment were pooled and subjected to a statistical test [t test within analysis of variance (ANOVA)], finding that, indeed, between both series, there were significant differences in the amount of assayable pregnenolone, from 2-min incubation time onward. Mean pregnenolone concentrations, standard deviations, and p values for both sets of conditions are presented in Table 1.

Specific binding of the P450scc cDNA was observed in the Northern blot analysis only for RNA samples obtained from adrenals and ovaries (positive tissues for the presence of P450scc), whereas RNA samples obtained from skeletal muscle and pancreas did not show evidence

TABLE 1. Pregnenolone concentrations (mean \pm s.d. n = 10) in the conditioned media after incubation of pancreatic mitochondria in control conditions and in the presence of aminoglutethimide

Time of sampling (min)	Control pregnenolone (pmol/mg protein)	Aminoglutethimide pregnenolone (pmol/mg protein)	p Value ^a
0	25.76 \pm 8.19	23.12 \pm 6.80	0.294
2	28.55 \pm 6.67	20.99 \pm 10.43	0.032
5	30.26 \pm 12.79	20.45 \pm 4.69	0.036
10	36.80 \pm 12.10	17.33 \pm 5.11	<0.001
15	28.09 \pm 7.56	16.18 \pm 8.23	<0.001
20	29.18 \pm 7.87	15.93 \pm 8.49	<0.001
30	29.22 \pm 8.72	13.31 \pm 6.08	<0.001

^a p Values were calculated by a paired t test within analysis of variance.

of specific binding of the labeled probe by this method (Fig. 1). Further to explore the possibility of a low level of expression of the P450_{scc} gene in these tissues, a reverse transcription of RNA to cDNA was attempted, followed by subsequent amplification by using RT-PCR. After the RT-PCR reaction, the resulting products were size-fractionated by electrophoresis through 2% agarose gel, transferred to nylon filters, and subjected to hybridization, as described in Materials and Methods. Adrenal and ovarian samples displayed bands of ~330 bp, corresponding to the expected molecular weight of the amplified cDNA fragment. The skeletal muscle sample remained negative, and the pancreas sample produced a hybridization band similar to those observed for adrenal and gonadal samples (Fig. 2). In a Southern blot analysis, positive hybridization with the specific probe for P450_{scc} was confirmed for adrenal, ovary, and pancreas samples, as shown in Fig. 3. To eliminate the possibility that the hybridization signals corresponded to genomic DNA, a direct PCR (no RT reaction) was used as a control. The RT-PCR products from the pancreatic tissue were eluted and subjected to further amplification and sequence determination. Sequence analysis of the cDNA fragment demonstrated that the nucleotide sequence, spanning the whole exon II and parts of exon I and exon III, was identical to that reported for the rat P450_{scc} gene (data not shown).

DISCUSSION

The demonstration of the activity of sex steroid-transforming enzymes in pancreatic tissue (1–3), the evidence of [³H]testosterone biotransformation into [³H]C-19 and [³H]C-18 metabolites by the isolated perfused organ (4), and the presence of functional steroid receptors in tissue homogenates (22) are strong experimental

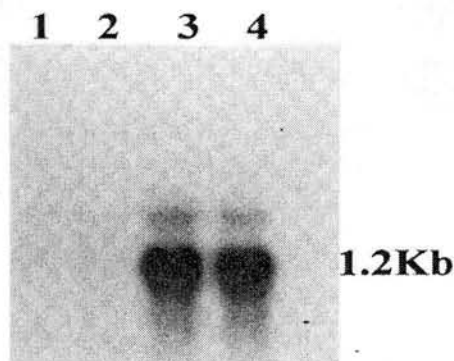


FIG. 1. Northern blot analysis: ~150 ng of RNA were applied in lanes as follows: (1) pancreas, (2) skeletal muscle, (3) adrenal gland, and (4) ovary. A 1.2-Kb fragment of the bovine mitochondrial P450_{scc} cDNA labeled with ³²P was used as probe.

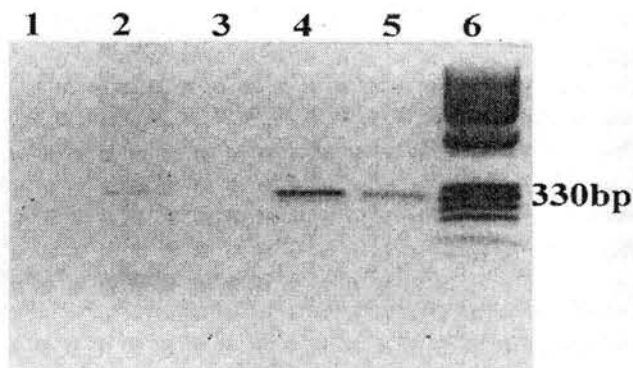


FIG. 2. RT-PCR products from total RNA. Ten µl of the products was applied in lanes as follows: (1) water, (2) pancreas, (3) skeletal muscle, (4) adrenal, (5) ovary, and (6) the molecular weight marker: ØX174. The RT-PCR products were ~330 bp, which corresponded to the predicted size of P450_{scc} cDNA fragment generated as described in Methods.

evidence that the pancreas is indeed an organ with great similarities to the classic steroidogenic tissues. Cholesterol, as the precursor in steroid biosynthesis, is transferred from blood and largely stored as cholesterol esters within the steroidogenic cells. When required, it is released and passes into the mitochondria, where it is transformed into pregnenolone by the cytochrome P450_{scc} enzyme encoded by the CYP11A gene. Mitochondria isolated from pancreatic tissue homogenates are capable of synthesizing pregnenolone. This event occurs as a biphasic process, characterized by a rapid component of ~10-min duration, followed by a secondary relatively slow phase.

This kinetics of cholesterol conversion is similar to that found in bovine and dog adrenals, although in the latter, pregnenolone synthesis occurs in a much shorter period of seconds (13). Biotransformation of cholesterol into pregnenolone is prevented by AMG, the amino-derivative of the hypnotic drug glutethimide. AMG is a recognized inhibitor of the cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450_{scc}) in mitochondrial preparations from adrenals, corpus luteum, testes, and brain (23). The drug has two enantiomers, D and L, and both are active. When the racemic mixture was used for binding to cor-

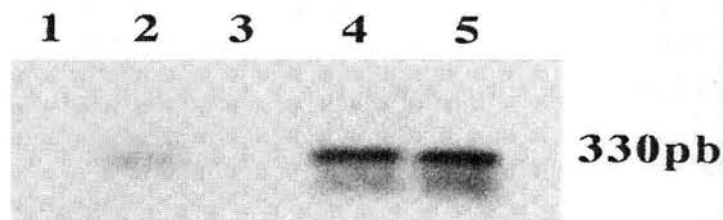


FIG. 3. Southern blot analysis of RT-PCR products: (1) water, (2) pancreas, (3) skeletal muscle, (4) adrenal, and (5) ovary. The bovine mitochondrial P450_{scc} cDNA labeled with ³²P was used as probe.

pus luteum mitochondrial P450 and inhibition of P450_{scc}, an IC₅₀ (half-maximal inhibition) value of 26 μ M was reported (24). The proposed mechanism of action of AMG is the interaction of the primary amine with the cytochrome at a site near or within the heme prosthetic group. This prevents the binding of the substrate to the enzyme and therefore the reduction of P450_{scc}, a necessary step preceding the oxidation of the substrate (25). Pancreatic mitochondria incubated in the presence of AMG showed a time-dependent decrease in the amount of pregnenolone released to the incubation media, which was detectable as early as 2 min after the addition of malate. Because the amount of AMG added to the incubation media (1 mM) was well above the reported IC₅₀, the inhibition of pregnenolone synthesis persisted throughout the incubation period, yielding almost half the amount of the pregnenolone present before the beginning of the reaction. These data are consistent with the results reported in comparable experiments with mitochondria obtained from adrenal glands (13,26) and reveal the presence of an enzymatic complex that has the same mechanism of action as that of P450_{scc} for the conversion of cholesterol to pregnenolone. The expression of the CYP11A gene is well documented in the "classic" steroidogenic tissues, such as those from adrenal cortex, testes, ovary, and placenta (27). In another group of organs such as submandibular glands, stomach, intestine, and brain, the finding of CYP11A gene transcripts has been related to steroidogenic activity (28). The biochemical evidence presented here gives support to the assumption that the inhibition of pregnenolone biosynthesis observed in the presence of AMG is in fact due to the impaired activity of the P450_{scc} enzymatic complex.

In this study, by using the coupled reaction of RT-PCR and Southern blotting, it was possible to demonstrate the presence of transcripts of the CYP11A gene in pancreas. This genetic evidence gives further support to the assumption that the inhibition of pregnenolone biosynthesis observed in the presence of AMG is in fact due to the impaired activity of the P450_{scc} enzymatic complex. It might be that the pancreatic steroidogenic activity is related to paracrine or autocrine regulatory processes or both. In support of this hypothesis, there is the finding that in some tissues, pregnenolone acts as a noncompetitive antagonist on the γ -aminobutyric acid (GABA_A) receptors (29). Indeed, in pancreatic islets, GABA is present at concentrations comparable to those in the central nervous system, and specific GABA_A receptors also are expressed in human pancreatic tissue (30). The role of steroid hormones in the physiology of the pancreas is scantily explored. To our knowledge, this is the first time

that the activity of the CYP11A gene is demonstrated in the pancreatic tissue. This finding establishes a new scope for future studies on the physiology and pathology of the pancreas and may contribute to the understanding of the changes occurring in the serum androgen profile in male patients with pancreatic cancer. Whether the steroid synthesis is relevant only in male pancreas deserves further investigation.

Acknowledgment: This work received partial support from the Human Reproduction Program, World Health Organization (Switzerland), the Rockefeller Foundation (U.S.A.), and the Miguel Alemán Foundation (México). Angélica Morales was recipient of a National Council of Science and Technology CONACyT (México) Scholarship Award.

REFERENCES

- Iqbal MJ, Greenway B, Wilkinson ML, Johnson PJ, Williams R. Sex-steroid enzymes aromatase and 5 α -reductase in the pancreas: a comparison of normal adult, foetal and malignant tissue. *Clin Sci* 1983;65:71-5.
- Mendoza-Hernández G, López-Solache I, Rendón JL, Díaz Sánchez V, Díaz-Zagoya JC. 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase activity in canine pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;152:376-82.
- Mendoza-Hernández G, López Solache I, Rendón JL. 3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase activity in canine pancreas. *Lif Sci* 1990;47:467-75.
- Fernández del Castillo C, Díaz-Sánchez V, Varela-Fascinetto G, et al. Testosterone biotransformation by the isolated perfused canine pancreas. *Pancreas* 1991;6:104-6.
- Fernández del Castillo C, Robles-Díaz G, Díaz-Sánchez V, Alta mirano A. Pancreatic cancer and androgen metabolism: high androstenedione and low testosterone serum levels. *Pancreas* 1990;5:515-8.
- Robles-Díaz G, Díaz-Sánchez V, Fernández del Castillo C, et al. Serum testosterone/dihydrotestosterone ratio and CA 19-9 in the diagnosis of pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol* 1991;86:591-4.
- Stone D, Hechter O. Studies on ACTH action in perfused bovine adrenals: the site of action of ACTH in corticosteroidogenesis. *Arch Biochem Biophys* 1954;51:457-69.
- Harding BW, Wong S, Nelson DH. Carbon monoxide binding substance in rat adrenal. *Biochim Biophys Acta* 1964;92:415-7.
- MacIntoch EN, Mitani F, Usigiris VI, Alonso C, Salhanick M. Function oxidases of the ovary and testis. *Ann NY Acad Sci USA* 1973;212:392-405.
- Winkel CA, Snyder JM, MacDonald PC, Simpson ER. Regulation of cholesterol and progesterone synthesis in human placental cell in culture by serum lipoproteins. *Endocrinology* 1989;106:1054-60.
- Hu YZ, Bourreau E, Jung-Testas I, Robel P, Baulieu EE. Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:8215-9.
- Iwahashi K, Ozaki HS, Tsubaki M, Onishi JI, Takeuchi Y, Ichikawa Y. Studies of the immunohistochemical and biochemical localization of the cytochrome P450_{scc}-linked monooxygenase system in the adult brain. *Biochim Biophys Acta* 1990;1035:182-5.
- Cuéllar A, Díaz-Sánchez V, Altamirano A. Impaired pregnenolone biosynthesis in adrenal cortex mitochondria by Adriamycin. *J Steroid Biochem* 1987;28:437-40.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.

15. Shears SB, Boyd SG. The effect of azastene, cyanoketone and trilostane upon respiration and cleavage of the cholesterol side chain in mitochondria from bovine adrenal cortex. *Eur J Biochem* 1981;117:75-80.
16. Rodbard D, Munson PJ, DeLean A. *Improved curve-fitting, parallelism testing, characterization of sensitivity and specificity, validation and optimization of radioligand assays: radioimmunoassay and related procedures in medicine: Proc Symp Berlin (West)*. Vienna: IAEA, 1977:469-82.
17. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
18. Thomas PS. Hybridization of the denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:5201-18.
19. Freimberg A, Volgelstein V. A technique for radiolabelling restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analyt Biochem* 1983;137:6-13.
20. Morohashi K, Fuji-Kuriyama Y, Okada Y, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for mRNA of mitochondrial cytochrome P-450_{sc} of bovine adrenal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:4647-51.
21. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-7.
22. Díaz-Sánchez V, Morimoto S, Morales A, Robles-Díaz G, Cerbón M. Androgen receptor in the rat pancreas: genetic expression and steroid regulation. *Pancreas* 1995;11:241-5.
23. Vanden Bossche H. Inhibitors of P450-dependent steroid biosynthesis: from research to medical treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;4:1003-21.
24. Uzgiris VI, Whipple CA, Salhanick HA. Stereoselective inhibition of cholesterol side chain cleavage by enantiomers of aminoglutethimide. *Endocrinology* 1977;101:89-92.
25. Salhanick HA. Basic studies on aminoglutethimide. *Cancer Res* 1982;42(suppl 2):3315S-21S.
26. Privalle CT, Crivello JF, Jefcoate CR. Regulation of intramitochondrial cholesterol transfer to side-chain cleavage cytochrome P-450 in rat adrenal gland. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:702-6.
27. John ME, John MC, Ashley P, McDonald RJ, Simpson ER, Watterman MR. Identification and characterisation of cDNA clones specific for cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450_{sc}. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:5628-32.
28. Dalla Valle L, Belvedere P, Simontacchi C, Colombo L. Extraglandular hormonal steroidogenesis in aged rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;43:1095-8.
29. Majewska MD. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA_A receptor: mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol* 1992;38:379-95.
30. Yang Wu, Reyes AA, Lan NC. Identification of the GABA_A receptor subtype mRNA in human pancreatic tissue. *FEBS Lett* 1994;341:257-62.

The β Form of the Estrogen Receptor Is Predominantly Expressed in the Papillary Cystic Neoplasm of the Pancreas

*Angélica Morales, †Andrés Duarte-Rojo, ‡Arturo Ángeles-Ángeles, †Carlos M. Mery, §Juan M. Ruíz-Molina, *Vicente Díaz-Sánchez, and †Guillermo Robles-Díaz

Departments of *Reproductive Biology, †Gastroenterology, and ‡Pathology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán," and the §Department of Surgery, Instituto Nacional de Cancerología, México City, México

Introduction: Papillary cystic neoplasm (PCN) of the pancreas is a low-malignancy tumor affecting predominantly young females. Sex steroid hormones have been involved in its development and/or growth. Estrogen receptor (ER) has been scarcely found in this tumor, although there is some evidence suggesting expression of the beta-isoform. Unlike ER, progesterone receptor (PR) expression has been consistently observed. Immunohistochemical analysis of the two isoforms of ER has not been performed in this tumor. **Aim:** To characterize expression of ER isoforms with an immunohistochemical method. **Methodology:** Expression of ER-alpha, ER-beta, and PR was analyzed by immunohistochemistry using isoform-specific ER and PR antibodies in paraffin-embedded tissue blocks from seven cases of PCN of the pancreas.

Results: Most patients were young females. ER-alpha and ER-beta were present in two and six tumors, respectively. PR was identified in six tumors. **Conclusions:** ER-beta expression predominates over the alpha-isoform in PCN of the pancreas. This finding supports the idea that previous negative results on ER expression were a consequence of the use of antibodies with low anti-beta activity. The role of ER-beta in the milieu of factors promoting the development and aggressiveness of PCN needs to be elucidated to address novel diagnostic and therapeutic approaches. **Key Words:** Pancreatic neoplasms—Papillary cystic neoplasm—Estrogen receptor—Progesterone receptor—Immunohistochemistry.

Papillary cystic neoplasm (PCN) of the pancreas constitutes a tumor with low malignancy potential and accounts for 1–2.5% of all pancreatic neoplasms (1,2). It affects mainly women (female:male ratio, 9.5:1) in their second and third decade of life, usually presenting with an indolent clinical course (1,3). Tumors are characteristically large (mean diameter, 10.3 cm) and mostly benign, although a malignancy rate of 15% has been reported (3). Knowledge about its cellular origin remains obscure. Exocrine acinar, endocrine, and embryonal origins have been proposed (4).

Due to the high prevalence of PCN in young fertile women, the possibility of a role for sex steroids in its development and/or growth has been investigated (2,5–7). These hormones are involved in the control of the normal and cancerous exocrine pancreas (8–12), and a higher rate of growth of PCN has been documented under states of increased sex steroid stimulation, such as pregnancy (7). Various studies have investigated the presence of estrogen receptors (ER) or progesterone receptors (PR) in PCN by using immunohistochemical staining, with controversial

findings. However, expression of PR has been more consistently reported.

Originally, effects of estrogens were believed to be mediated by a single receptor, and the search for estrogen involvement in the pancreas was limited to this "classic" receptor. However, in 1989 Carbone et al., using a ligand assay, found that, in PCN, most of the steroid was bound to a newly identified ER (type II or β -isoform), with very low binding to the previously addressed "classic" ER (type I or α -isoform). Also, identification of ER using immunohistochemistry yielded negative results in the same cases (13). These findings offered an explanation for the negative results obtained in the search for ER by available immunohistochemistry: antibodies used in immunostaining were raised against the specific α -isoform sequences, thus overlooking the β -isoform (13,14).

The more recent cloning of the human ER- β (15) and the advent of immunohistochemical commercial kits for its identification have permitted a better characterization of sex steroid receptor expression profiles in several neoplasms. Identification of such a profile in PCN could give us valuable information about its origin and could be useful in defining tumoral behavior, in determining a prognosis, and in predicting responsiveness to medical treatment, as has been reported for other tumors (16–19).

The purpose of this study was to characterize the expression

Manuscript received March 13, 2002; revised manuscript accepted September 7, 2002.

Address correspondence and reprint requests to Guillermo Robles-Díaz, Departamento de Gastroenterología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán," Vasco de Quiroga # 15, Delegación Tlalpan, México, D.F. 14000, México. E-mail: grd@quetzal.innsz.mx

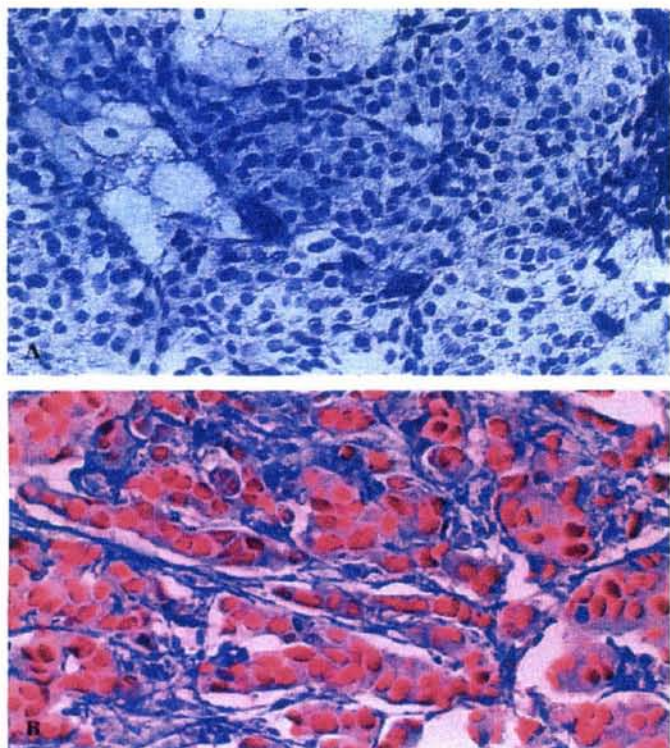


FIG. 1. A: Estrogen receptor-beta-negative control in a papillary cystic tumor of the pancreas. B: Estrogen receptor-beta-positive control in a breast carcinoma (Avidin-biotin complex).

sion of ER isoforms in PCN, with an immunohistochemical method, using α - and β -specific antibodies. Expression of PR was also investigated.

MATERIAL AND METHODS

Paraffin-embedded tissue blocks from seven patients with PCN of the pancreas referred to a third-level hospital between June 1994 and June 2000 were retrieved for immunohistochemical analysis. The clinical records of these patients were reviewed, and 4- μ m-thick representative tissue slices from each case were prepared for the study. These were stained with hematoxylin and eosin to confirm the diagnosis of PCN. For immunohistochemistry, the system streptavidin-biotin was used, performed in Ventana's automated stainer (NexEs, Tucson, AZ), using Ventana's basic DAB detection kit for mouse/rabbit antibodies (standard procedure) and open secondary kit for goat antibodies, where donkey anti-goat biotinylated secondary antibody (Santa Cruz, CA, diluted 1:100) with 30-minute incubation was used. Antigen retrieval was performed using 10 mM EDTA buffer pH 8 in a microwave pressure-cooker. In the automated stainer, primary incubation time was 32 minutes. Horse serum was used for blocking non-specific staining. The following primary antibodies were used: anti ER- α (F-10) (mouse monoclonal, Santa Cruz, CA, cat No. sc-8002) epitope mapping at the carboxy terminus of ER- α of human origin, non-cross-reactive with ER- β ; anti ER- β (N-19) (goat polyclonal, Santa Cruz, CA, cat No. sc-6820) epitope

mapping at the amino terminus of ER- β of human origin specifically; and anti PR (AB-52) (mouse monoclonal, Santa Cruz, CA, cat No. sc-810) specific for PR-A and PR-B of human origin. All primary antibodies were diluted 1:100. Evident nuclear staining was considered positive. Breast carcinoma tissue served as a positive control for ER- α and ER- β and endometrium for PR. The same were used for negative controls, stained without the primary antibodies. Microphotographs of both positive and negative controls for ER- β are shown in Figure 1.

RESULTS

Histologically, all tumors had the characteristic features of PCN (Figures 2 and 3). ER- α and ER- β were present in two and six tumors, respectively, while PR was present in six (Figure 4). Demographic and main clinical information as well as immunohistochemistry results for each case are presented in Table 1. Six of the tumors were found in young fertile women; the other tumor was present in a 75-year-old man. Clinical data from two patients (cases 6 and 7) were not available. Except for the male patient, there was no

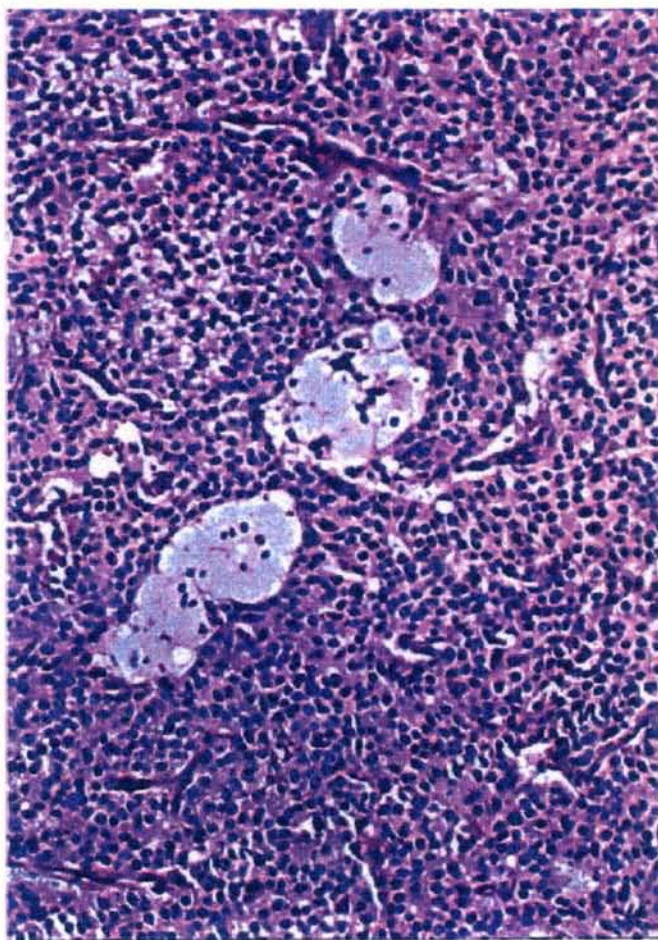


FIG. 2. The tumor is composed of polygonal cells arranged in a solid pattern. Larger cells with foamy cytoplasm are also seen (Hematoxylin & eosin stain).

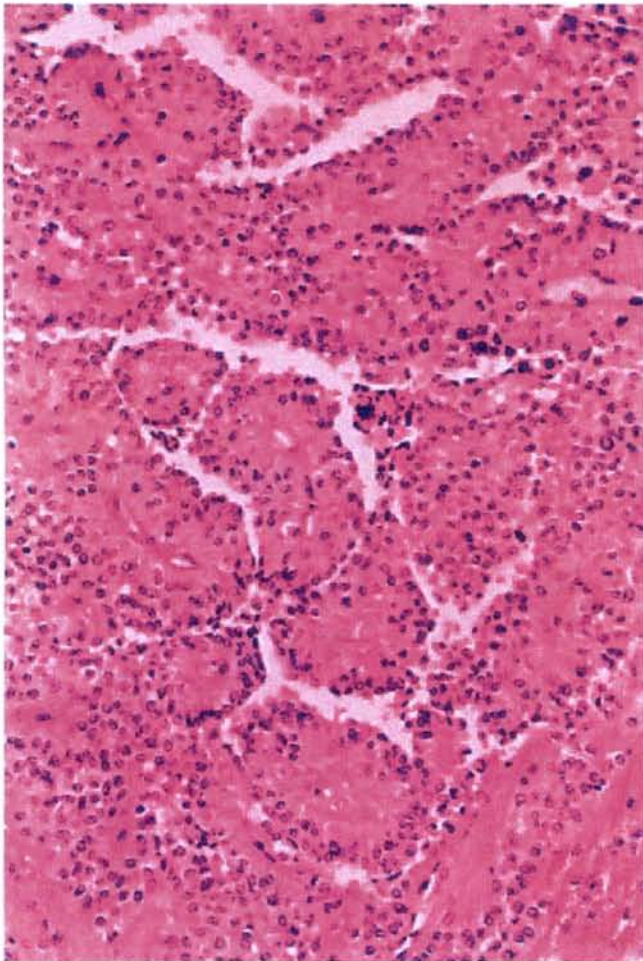


FIG. 3. This area shows the pseudopapillary pattern characteristic of this neoplasm (Hematoxylin & eosin stain).

smoking or alcoholism history. Signs of feminization were not evident in the male patient. Menstrual abnormalities were not present in female patients, and a history of hormonal contraception was recorded only in case 3, a patient who was pregnant at the moment of PCN diagnosis. This previously reported case (7) showed a tumor size increase of 140% in about 5.5 weeks. Four patients underwent a Whipple resection, and one of them (case 5) died of uncontrolled bleeding immediately after surgery. In this case, neoplastic involvement of the mesocolon was found. In case 1, the tumor was considered unresectable because of local extension into mesenteric vessels and porta vein by CT scan; however, a biopsy was performed, and a diagnosis was established. None of the patients had evidence of node involvement or metastases. No recurrences were detected, and increase in tumor size was noted only in case 1.

DISCUSSION

Expression of estrogen and progesterone receptors in PCN of the pancreas has been matter of a long debate since their presence was first described in 1987 by Ladanyi (5). Results of previously published studies (2–7,13,14,20–35)

analyzing ER and PR expression are depicted in Table 2. When summarizing these results, irrespective of the methodology used in the study, it can be observed that 6 of 139 (4%) tumors were reported to express ER, while 91 of 118 (77%) were positive for PR.

In the current study, we documented the predominant expression of ER- β over ER- α (six and two tumors tested positive, respectively), as well as the presence of PR in six of seven cases of PCN, through an immunohistochemical method using ER isoform-specific antibodies. The predominant finding of ER- β supports the theory that negative results in previous studies evaluating expression of ER were a consequence of the use of antibodies without anti- β activity, as has been previously suggested (13,14). Therefore, ER

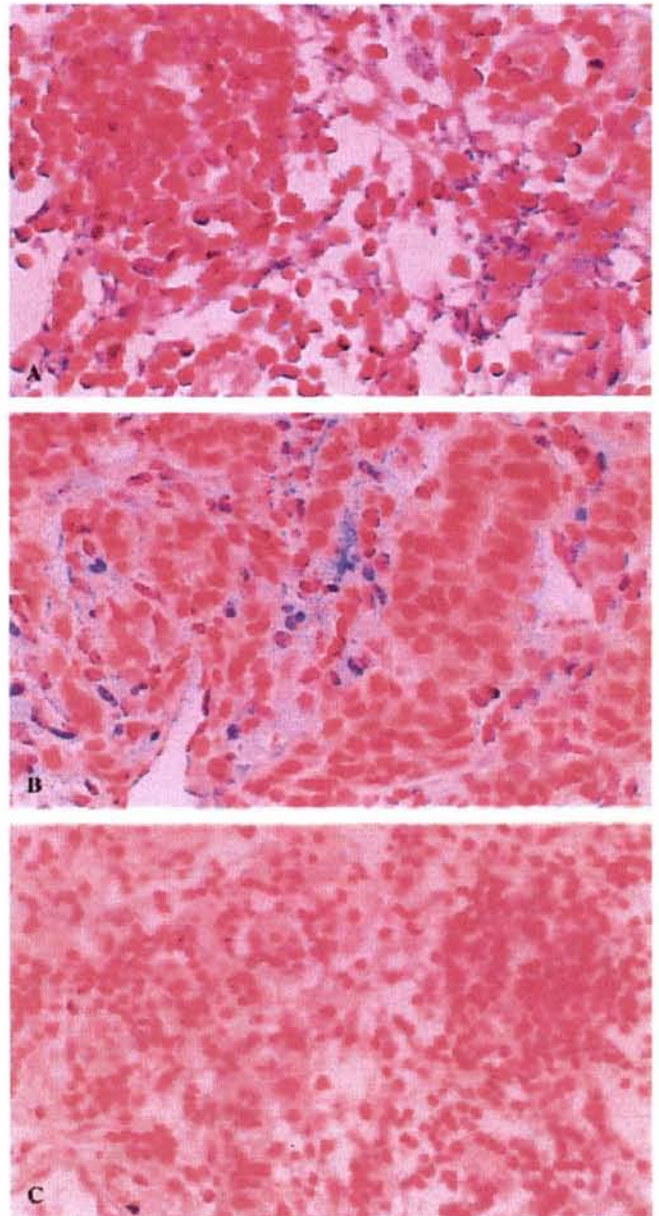


FIG. 4. Immunostaining for estrogen receptors-beta (A) and -alpha (B) and progesterone receptor (C). All of them are diffusely positive in the nuclei (Avidin-biotin complex).

TABLE 1. Clinicopathologic findings in seven patients with papillary cystic neoplasm of the pancreas

Case no.	Sex	Age (yr)	Chief complaint	Localization of the tumor	Greatest diameter (cm)	ER- α	ER- β	PR
1	M	75	Weight loss	Head	9.1	-	+	+
2	F	21	Abdominal mass	Head	10	-	+	-
3	F	21	Abdominal pain	Head	12	-	+	+
4	F	18	Abdominal pain	Head	7.2	+	+	+
5	F	16	Abdominal mass	Head	10	+	+	+
6	F	14	NA	Head	4.7	-	+	+
7	F	24	NA	NA	NA	-	-	+

NA, not available.

expression in PCN should be a more frequent phenomenon than has been reported. This evidence, as well as the high prevalence of PCN in women and its rapid growth under conditions of elevated estrogen and progesterone circulating levels—as occur in pregnancy (7)—seems to indicate a sex-hormone dependency of the tumor. Still, occurrence of this tumor in males suggests that these hormones might not be the only factor required for its development. However, the possibility of an increased estrogenic microenvironment in tumoral pancreatic tissue can not be discarded, especially when taking into account the fact that the pancreas is an organ capable of converting androgens into estrogens through aromatase activity (36) or transforming a weak estrogen (estrone) into a more active one (estradiol) via 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase function (37).

Since the synthesis of PR is considered to be induced by estrogens (38), the common finding of PR in the absence of ER had suggested that the former could be expressed in an estrogen-independent manner, as has been proposed for the T47D breast cancer carcinoma cell line (39), meningioma cells (40), and gastric cancer cells (41). However, these reports were done before the cloning of the ER- β , and therefore the expression of this receptor isoform was not investigated. Now, the knowledge that ER- β is expressed in T47D (42), meningioma (43), and PCN (as was observed in the current study), suggests the possibility that estrogen, by means of this receptor, might participate in the induction of PR synthesis.

Experimental data about the role of ER- β in inducing PR are still under debate. One study demonstrated that ER- α

TABLE 2. Results of published literature evaluating sex hormone receptors in papillary cystic neoplasm of the pancreas

Reference	n	Sex	Method	ER expression	PR expression
Ladanyi (1987) (5)	1	F	BA	1	1
Miettinen (1987) (20)	2	F	IHC	0	NE
De Lagausie (1988) (21)	1	F	IHC	0	1
Wrba (1988) (22)	1	F	IHC ^a /BA	0	1
Yamaguchi (1989) (23)	14	13 F/1 M	IHC	0	NE
Carbone (1989) (13)	2	F	IHC ^a /BA	0/2 ^b	2
Dogliani (1990) (24)	1	?	IHC	0	1
Katz (1990) (25)	1	F	BA	0	0
Stömmmer (1991) (26)	5	F	IHC	NE	5
Klöppel (1991) (27)	2	M	IHC	0	0
Pettinato (1992) (28)	15	?	IHC	0	0
Jorgensen (1992) (29)	2	F	IHC	2	NE
Paes de Lima (1993) (30)	5	?	IHC	1	NE
Nishihara (1993) (6)	3	2 F/1 M	IHC/BA	0	3/2 ^c
Zamboni (1993) (31)	10	9 F/1 M	IHC	0	10
Skarda (1994) (32)	1	F	BA	0	1
Mao (1995) (3)	3	F	IHC	0	NE
Grant (1996) (33)	1	F	IHC	0	1
Remadi (1996) (34)	1	F	IHC	0	1
Lee (1997) (14)	6	F	IHC	0	6
Ohiwa (1997) (35)	1	M	IHC	0	0
Morales (1998) (7)	1	F	IHC/mRNA	0	1/1
Lam (1999) (2)	8	7 F/1 M	IHC	0	0
Kosmahl (2000) (4)	57	?	IHC	0	57

^aIHC performed for ER.^bIHC was negative, but high levels of ER- β and low levels of ER- α were found by BA.^cIHC was positive in three patients and BA was positive in two.^dTwo of 59 patients were excluded; gender of the included ones was not specified.

IHC, immunohistochemistry; BA, binding assay; NE, not evaluated.

knockout mice are able to express PR in the brain, suggesting that ER- β may be responsible for PR expression (44). However, it has also been shown that ER- β knockout mice are unable to downregulate PR in the uterus, suggesting that repression of PR might be an ER- β mediated event (45). These conflicting results evidence the tissue-specific biologic activities of estrogen, which adds complexity to the mechanisms of action of this hormone (46) and to the role of ER- β in PR induction in the PCN and other pancreatic neoplasms.

Because PCN of the pancreas is a low-malignancy neoplasm, a conservative surgical resection is the currently recommended therapeutic approach (47,48). Fifteen percent of patients present with metastasis or invasion of adjacent structures, and tumor recurrence after resection has been reported (2,3,14). However, no useful marker of prognosis has been identified. Zamboni et al. proposed that a positive PR status could be a marker of a good prognosis (31), as it has been demonstrated in patients with meningiomas (17). Most patients reported in the present series were positive for PR, including the two patients with extrapancreatic invasion. Thus, PR prognostic utility may be limited, which is in accordance with the findings of a more recent report of six cases of PCN. In that report it was concluded that PR status does not appear to be useful in predicting aggressive behavior (14).

Recently, ER- β has been shown to decrease gradually in relation to a more malignant phenotype in colon (49) and breast cancer (50), thus suggesting that it may constitute a marker of low malignancy or good prognosis. Moreover, it has also been implicated in inhibition of angiogenesis (46), which is related to solid tumor growth and invasiveness (51). These findings lead us to suppose that ER- β is not a simple spectator in the milieu of factors promoting the development of PCN. Rather, it might constitute a repressor of progression to malignancy. If this proves to be true, and a tissue-specific function of ER- β and PR in PCN is characterized, specific hormonal therapy addressed to ER- β or PR might constitute a novel therapeutic approach in PCN in those patients with unresectable, metastasized, or recurrent tumors. However, clarifying the role of ER- β in PCN biology demands more studies.

Acknowledgments: This study was supported in part by a grant from Mr. Luis García-Guerrero.

REFERENCES

- Klimstra DS, Wenig BM, Heffess CS. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: a typically cystic carcinoma of low malignant potential. *Semin Diag Pathol* 2000;17:66-80.
- Lam KY, Lo CY, Fan ST. Pancreatic solid-cystic-papillary tumor: clinicopathologic features in eight patients from Hong Kong and review of the literature. *World J Surg* 1999;23:1045-50.
- Mao C, Guvendi M, Domenico DR, et al. Papillary cystic and solid tumors of the pancreas: a pancreatic embryonic tumor? Studies of three cases and cumulative review of the world's literature. *Surgery* 1995;118:821-8.
- Kosmahl M, Seada LS, Janig U, et al. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: its origin revisited. *Virchows Arch* 2000;436:473-80.
- Ladanyi M, Mulay S, Arseneau J, et al. Estrogen and progesterone receptor determination in the papillary cystic neoplasm of the pancreas. *Cancer* 1987;60:1604-11.
- Nishihara K, Tsuneyoshi M, Ohshima A, et al. Papillary cystic tumor of the pancreas: Is it a hormone-dependent neoplasm? *Path Res Pract* 1993;189:521-6.
- Morales A, Ruiz-Molina JM, Orozco-Esteves H, et al. Papillary-cystic neoplasm of the pancreas. *Int J Pancreatol* 1998;24:219-25.
- Blevins GT Jr, McCullough SS, Wilbert TN, et al. Estradiol alters cholecystokinin stimulus-response coupling in rat pancreatic acini. *Am J Physiol* 1998;275:G993-8.
- Nieuwenhuizen AG, Schuiling GA, Liem SMS, et al. Progesterone stimulates pancreatic cell proliferation in vivo. *Eur J Endocrinol* 1999;140:256-63.
- Andren-Sandberg A, Hoem D, Backman PL. Other risk factors for pancreatic cancer: hormonal aspects. *Ann Oncol* 1999;10(Suppl 4):131-5.
- Hollande E, Fanjul M, Houti N, et al. Expression of estrogen receptors during growth of human pancreatic adenocarcinoma cells (CAPAN-1)-relationship with differentiation. *In Vitro Cell Dev Biol* 1998;34:593-9.
- Abe M, Yamashita J, Ogawa M. Medroxyprogesterone acetate inhibits human pancreatic carcinoma cell growth by inducing apoptosis in association with Bcl-2 phosphorylation. *Cancer* 2000;88:2000-9.
- Carbone A, Ranelletti FO, Rinelli A, et al. Type II estrogen receptors in the papillary cystic tumor of the pancreas. *Am J Clin Pathol* 1989;92:572-6.
- Lee WY, Tzeng CC, Chen RM, et al. Papillary cystic tumors of the pancreas: assessment of malignant potential by analysis of progesterone receptor, flow cytometry, and ras oncogene mutation. *Anticancer Res* 1997;17:2587-91.
- Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4258-65.
- Walker MJ, Beattie CW, Patel MK, et al. Estrogen receptor in malignant melanoma. *J Clin Oncol* 1987;5:1256-61.
- Hsu DW, Efrid JT, Hedley-Whyte ET. Progesterone and estrogen receptors in meningiomas: prognostic considerations. *J Neurosurg* 1997;86:113-20.
- Villa E, Moles A, Ferretti I, et al. Natural history of inoperable hepatocellular carcinoma: estrogen receptors' status in the tumor is the strongest prognostic factor for survival. *Hepatology* 2000;32:233-8.
- Speirs V, Kerin MJ. Prognostic significance of oestrogen receptor beta in breast cancer. *Br J Surg* 2000;87:405-9.
- Miettinen M, Partanen S, Fraki O, et al. Papillary cystic tumor of the pancreas: an analysis of cellular differentiation by electron microscopy and immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 1987;11:855-65.
- De Lagausie P, Maillot B, Viala T, et al. Un cas de tumeur papillaire du pancréas. *Gastroenterol Clin Biol* 1988;12:965-7.
- Wrba F, Chott A, Ludvik B, et al. Solid and cystic tumor of the pancreas: a hormonal-dependent neoplasm? *Histopathology* 1988;12:338-41.
- Yamaguchi K, Miyagahara T, Tsuneyoshi M, et al. Papillary cystic tumor of the pancreas: an immunohistochemical and ultrastructural study of 14 patients. *Jpn J Clin Oncol* 1989;19:102-11.
- Dogliani C, Gambacorta M, Zamboni G, et al. Immunocytochemical localization of progesterone receptors in endocrine cells of the human pancreas. *Am J Surg Pathol* 1990;137:999-1005.
- Katz LBK, Ehya H. Aspiration cytology of papillary cystic neoplasm of the pancreas. *Am J Clin Pathol* 1990;94:328-33.
- Stommer P, Kraus J, Stolte M, et al. Solid and cystic pancreatic tumors: clinical, histochemical, and electron microscopic features in ten cases. *Cancer* 1991;67:1635-41.
- Kloppel G, Maurer R, Hofmann E, et al. Solid-cystic (papillary-cystic) tumors within and outside the pancreas in men: report of two patients. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1991;418:179-83.
- Pettinato G, Manivel JC, Ravetto C, et al. Papillary cystic tumor of the pancreas: a clinicopathologic study of 20 cases with cytologic, immunohistochemical, ultrastructural, and flow cytometric observations, and a review of the literature. *Am J Clin Pathol* 1992;98:478-88.
- Jørgensen LJ, Hansen AB, Burchard F, et al. Solid and papillary neoplasm of the pancreas. *Ultrastruct Pathol* 1992;16:659-66.
- Paes de Lima A, Bellotti M, Elsner B, et al. Tumores papilares y quísticos del páncreas: Estudio clinicopatológico, histopatológico, inmunohistoquímico, y de ploidia nuclear. *Medicina (Buenos Aires)* 1993;53:481-6.
- Zamboni G, Bonetti F, Scarpa A, et al. Expression of progesterone receptors in solid-cystic tumor of the pancreas: a clinicopathologic and immunohistochemical study of ten cases. *Virchows Arch A Pathol Anat* 1993;423:425-31.
- Skarda JS, Honick AB, Gibbins CS, et al. Papillary-cystic tumor of the pancreas in a young woman: fine-needle aspiration cytology, ultrastructure and DNA analysis. *Diagn Cytopathol* 1994;10:20-4.
- Grant LD, Lauwers GY, Meloni AM, et al. Unbalanced chromosomal translocation, der(17)t(13:17)(q14:p11) in a solid and cystic papillary epithelial neoplasm of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 1996;20:339-45.
- Remadi S, Mac Gee W, Doussis-Anagnostopoulou I, et al. Papillary-cystic tumor of the pancreas. *Diagn Cytopathol* 1996;15:398-402.
- Ohiwa K, Igarashi M, Nagasue N, et al. Solid and cystic tumor (SCT) of the pancreas in an adult man. *HPB Surg* 1997;10:315-21.
- Iqbal MJ, Greenway B, Wilkinson ML, et al. Sex-steroid enzymes, aromatase and 5 alpha-reductase in the pancreas: a comparison of normal adult, fetal and malignant tissue. *Clin Sci (Lond)* 1983;65:71-5.
- Martel C, Rheaume E, Takahashi M, et al. Distribution of 17 beta-hydroxysteroid

- dehydrogenase gene expression and activity in rat and human tissues. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1992;41:597-603.
38. Leavitt WW, Chen TJ, Allen TC. Regulation of progesterone receptor formation by estrogen action. *Ann N Y Acad Sci* 1977;286:210-25.
 39. Horwitz KB, Mockus MB, Lessey BA. Variant T47D human breast cancer cells with high progesterone receptor levels despite estrogen and antiestrogen resistance. *Cell* 1982;28:633-42.
 40. Romic Stojkovic R, Jovancevic M, Santel DJ, et al. Sex steroid receptors in intracranial tumors. *Cancer* 1990;65:1968-70.
 41. Wu CW, Chi CW, Chang TJ, et al. Sex hormone receptors in gastric cancer. *Cancer* 1990;65:1396-400.
 42. Vladusic EA, Hornby AE, Guerra-Vladusic FK, et al. Expression and regulation of estrogen receptor beta in human breast tumors and cell lines. *Oncol Rep* 2000;7:157-67.
 43. Carroll RS, Zhang J, Black PM. Expression of estrogen receptors alpha and beta in human meningiomas. *J Neurooncol* 1999;42:109-16.
 44. Alves SE, McEwen BS, Hayashi S, et al. Estrogen-regulated progesterone receptors are found in the midbrain raphe but not hippocampus of estrogen receptor alpha (ER alpha) gene-disrupted mice. *J Comp Neurol* 2000;427:185-95.
 45. Weihua Z, Saji S, Makinen S, et al. Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ER alpha in the uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:5936-41.
 46. Nilsson S, Kuiper G, Gustafsson JA. ER beta: a novel estrogen receptor offers the potential for new drug development. *Trends Endocrinol Metab* 1998;9:387-95.
 47. D'Amato A, Gionannini C, Pronio A, et al. Solid cystic tumor of the head of the pancreas in a young woman. *Hepatogastroenterology* 1998;45:541-4.
 48. Panieri E, Krige JE, Bornman PC, et al. Operative management of papillary cystic neoplasms of the pancreas. *J Am Coll Surg* 1998;186:319-24.
 49. Foley EF, Jazaeri AA, Shupnik MA, et al. Selective loss of estrogen beta in malignant colon. *Cancer Res* 2000;60:245-8.
 50. Iwao K, Miyoshi Y, Egawa C, et al. Quantitative analysis of estrogen receptor-beta mRNA and its variants in human breast. *Int J Cancer* 2000;88:733-6.
 51. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995;333:1757-63.