

PAGINACION VARIA

03081
20je.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**METABOLISMO IN VITRO Y MECANISMO DE ACCION
MOLECULAR DEL LEVONORGESTREL EN EL
ORGANO DEL FLANCO DEL HAMSTER.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN INVESTIGACION

BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A:

MARISA CABEZA SALINAS

**TESIS CON 1994
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**CON MUCHO CARIÑO DEDICO ESTA TESIS A MI
ESPOSO Y A MIS HIJOS JOSE LUIS Y JUAN
MANUEL.**

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO
DE BIOQUIMICA HORMONAL DEL DEPTO. DE BIOLOGIA
DE LA REPRODUCCION DEL INNSZ Y EN EL
LABORATORIO DE HORMONAS DEL DEPTO. DE
SISTEMAS BIOLÓGICOS DE LA UAM-X.**

**AGRADEZCO AL DR. GREGORIO PEREZ PALACIOS, DIRECTOR DE
PLANIFICACION FAMILIAR DE LA SECRETARIA DE SALUD, SUS
EVALUACIONES CRITICAS PARA EL MEJOR DESARROLLO DE ESTE
TRABAJO DE TESIS.**

**MI MAYOR RECONOCIMIENTO AL COMITE TUTORIAL POR SUS
DISCUSIONES Y SUGERENCIAS PARA EL CORRECTO DESARROLLO DE
ESTA TESIS DE DOCTORADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA
BASICA.**

COMITE TUTORIAL:

**1. DR. FLAVIO MENA, INVESTIGADOR Y JEFE DEL DEPTO. DE
NEUROLOGIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS DE
LA UNAM.**

**2. DR. LINO DIAZ DE LEON HERNANDEZ, INVESTIGADOR Y
SECRETARIO ACADEMICO DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMEDIACAS DE LA UNAM.**

**3. DR. MARCOS CERVON CERVANTES, INVESTIGADOR Y PROFESOR
TITULAR DE LA ENEP-ZARAGOZA ASI COMO DEL INNSZ.**

RESUMEN

En este trabajo se determinó la capacidad de los órganos del flanco del hámster para reducir en la posición 5 alfa, la doble ligadura de molécula de levonorgestrel H^3 (LNG- H^3), así como la habilidad que posee el compuesto 5 alfa reducido (5 alfa LNG), producido en este tejido, de unirse a los receptores de andrógenos. También se investigó el efecto del levonorgestrel y de su metabolito 5 alfa reducido sobre la incorporación de glucosa isotópicamente marcada con C^{14} al extracto lipídico obtenido de este tejido.

Para ello, los órganos del flanco fueron disecados del animal, homogeneizados e incubados en presencia del LNG- H^3 y NADPH a pH de 7.4. El aislamiento y la pureza radioquímica del metabolito 5 alfa reducido producido, se determinó por la técnica de dilución reversa isotópica. La capacidad de unión de los andrógenos por moléculas presentes en el citosol obtenido de homogeneizado de glándulas del flanco se determinó incubando pequeños volúmenes del citosol a $4^{\circ} C$ por 18 horas en presencia de concentraciones crecientes (1-10 nM) de mibolerona H^3 para determinar la constante de afinidad (K_d). Con este dato se realizaron, más tarde, los análisis por competencia, que tienen como objeto comprobar la presencia de los receptores de andrógenos. Para ello se incubaron pequeños volúmenes del citosol, en las mismas condiciones mencionadas arriba, con mibolerona H^3 a una concentración de 1.4 nM en diferentes tubos. A cada uno de ellos se les agregaron concentraciones crecientes (20-200 nM) de hormonas esteroides no marcadas isotópicamente. El efecto del tratamiento tópico con LNG y 5 alfa LNG, se evaluó mediante la prueba del órgano del flanco, que consiste en medir el

aumento del diámetro de la mancha pigmentada que distingue a este órgano. La incorporación de glucosa radioisotópicamente marcada al extracto lípidico así como el contenido de éstos, se determinó después de la extracción con cloroformo : metanol de los órganos del flanco previamente incubados a 37 ° C en presencia del isótopo a pH de 7.4.

Los resultados muestran que el homogeneizado obtenido de órganos del flanco es capaz de reducir el LNH-H³ a 5 alfa LNG y que este compuesto se une a los receptores citosólicos de andrógenos presentes en este tejido. La prueba del órgano del flanco revela que el 5 alfa LNG tiene un efecto androgénico menor que el LNG y la testosterona. Este compuesto es capaz de disminuir el contenido de lípidos en los órganos del flanco de las hembras en comparación con el control, mientras que en el macho castrado tratado no se observa esta reducción. Las aplicaciones tópicas de LNG y 5 alfa LNG por 15 días sobre los órganos del flanco aumentaron la incorporación de glucosa marcada isotópicamente a lípidos en forma semejante a la T en condiciones de incubación *in vitro*.

El conjunto de datos que el LNG y el 5 alfa LNG presentan actividad androgénica sobre el metabolismo de lípidos en los órganos del flanco de machos castrados y tratados, mientras que en las hembras parece tener actividad antiandrogénica.

ABSTRACT

The *in vitro* 5 alpha reduction form ^3H levonorgestrel (^3H - LNG) as well as its binding capacity to the androgens receptors by hamster flank organs was investigated. Furthermore the effect of LNG and its 5 alpha reduced metabolite formed, on the flank organ test and -U- ^{14}C glucose incorporation into lipids by this tissue were determined.

Homogenates from female hamster flank organs were incubated in presence of ^3H -LNG and NADPH at pH 7.4. Isolation and radiochemical purity of radioactive LNG metabolites were determined by reverse isotope dilution technique. Binding sites for androgens in the male hamsters flank organs cytosol, were saturated in presence of increasing concentrations (1-10 nM) of [^3H] mibolerone, permitting the calculation of affinity (Kd). For competition experiments, tubes contained 1.4 nM of [^3H] mibolerone plus a range of increasing concentrations (20-200 nM) of the different unlabeled steroids hormones, sample processing was performed for saturation analysis. The flank organ test was realized as had been reported before and -U- ^{14}C glucose incorporation into lipids and content of them, was determined in organ culture conditions to pH = 7.4.

The 5 alpha LNG metabolite formed from LNG, had binding capacity to androgen receptors in flank organs enhancing their affinity as compared with LNG. The flank organ test demonstrated that the 5 alpha reduced metabolite activity was similar to that observed for LNG and T on gonadectomized male hamster flank organs. The influence of topical applications with LNG or its 5 alpha reduced metabolite increased the radiolabeled glucose incorporation into lipids in a similar way than T in this tissue. The overall date indicated that LNG and 5 alpha LNG presented androgenic activity over the lipid pathway on male flank organs, whereas in females had antiandrogenic effect on the lipid content.

INDICE GENERAL.

INTRODUCCION

Generalidades:

- a. La glándula sebácea
- b. Actividad esteroideogénica en la piel
- c. Sustancias con propiedades antiandrogénicas
- d. El órgano del flanco como modelo para estudiar actividad lipóide en la piel.

Estructura y propiedades bioquímicas de la enzima 5 alfa reductasa

Mecanismo de acción de hormonas esteroides

- a. Modelo de cascada para la regulación de la transcripción génica por esteroides.

Criterios que se requieren para la identificación de un receptor:

- a. Capacidad de unión
- b. Afinidad
- c. Especificidad
- d. Correlaciones con las respuestas biológicas

Análisis de sistemas de receptores:

- a. Con un solo componente
- b. Con múltiples componentes
- c. Inhibición competitiva.

Androgenicidad de los compuestos 19 - nor - esteroides 7 alfa metil, 17 alfa metil substituidos.

HIPOTESIS OBJETIVOS

MATERIAL Y METODOS RESULTADOS

DISCUSION

ANEXO 1

1. EVALUATION OF LEVONORGESTREL ACTION ON THE FLANK ORGAN AND THE SEBACEOUS GLAND LIPOGENESIS OF FEMALE HAMSTERS. MARISA CABEZA AND LINO DIAZ DE LEON. Boletín de Estudios Biomédicos y Biológicos.

ANEXO 2.

2. *IN VITRO* METABOLISM AND MOLECULAR INTERACTIONS OF LEVONORGESTREL AND ITS 5 alpha REDUCED DERIVATE WITH ANDROGENS RECEPTORS IN HAMSTER FLANK ORGANS. Marisa Cabeza, Felipe Vilchis, Ana E, Lemus, Lino Díaz de León and Gregorio Pérez Palacios. J. Steroid. Biochem.

INTRODUCCION.

El acné es una enfermedad multifactorial que depende de varios mecanismos patogénicos para su expresión. El factor más importante en la patogénesis del acné es la hipersecreción de las glándulas sebáceas, que es inducida por la acción de andrógenos (1). Flamigni y Price (2) demostraron que en pacientes con acné vulgaris existe una excesiva conversión de testosterona a su metabolito 5 alfa reducido, la dihidrotestosterona (DHT), que es un potente anabólico, por lo cual podemos afirmar que el acné es una enfermedad andrógeno dependiente genéticamente determinada, por lo que el metabolismo excesivo anormal de la testosterona puede ocurrir en diferentes etapas de la vida.

Strauss (3) demostró que las glándulas sebáceas de la cara, espalda y pecho, incrementan su tamaño y secreción al aumentar la formación de DHT durante la pubertad, para luego decaer a niveles relativamente bajos cuando el crecimiento ha terminado.

Ha sido ampliamente demostrado, que los tejidos blanco para andrógenos tienen la capacidad de metabolizar testosterona a 5 alfa DHT, gracias a la catalización de la 5 alfa reductasa, que es una enzima que se encuentra presente en la mayoría de los tejidos blanco (4, 5). La piel humana (6) y las glándulas del flanco del hámster (7) son un ejemplo de este tipo de tejidos ya que presentan enzimas que metabolizan a los andrógenos, así como receptores para dichos esteroides.

La androstendiona, es otro andrógeno presente en el suero en ambos sexos. En el hombre se encuentra en menor proporción que la testosterona, mientras que en la mujer se encuentra una mayor proporción de androstendiona que de testosterona (8). Este andrógeno también es substrato de la 5 alfa reductasa y forma la 5 alfa androstandiona, que también es un metabolito activo.

Se ha demostrado que existe una interconversión entre la testosterona y la androstendiona, gracias a la catalización de la enzima 17 β hidroxisteroide reductasa, lo que explicaría el mecanismo en la producción de sebo en mujeres con acné (9).

Estudios de cinética enzimática realizados por el grupo de Voigt (10), demuestran que tanto la progesterona, como la desoxicorticosterona, son capaces de inhibir la formación de DHT, por competir con el sitio de unión de la molécula enzimática, ya que ambos tienen el grupo Δ^4 - 3 ceto en el anillo A, que según los mismos autores es el sitio principal reconocido por la enzima.

El mismo grupo demostró que las sustituciones en el C - 17 en la posición alfa , así como cualquier alteración en el núcleo esteroidal, como la pérdida de un metilo en los compuestos 19-nor, reducen la potencia de los esteroides para ser reconocidos por la 5 alfa reductasa.

Hsia y Voigt demostraron que la 17 β carboxi 4-androsten-3-ona (17 β C), que es un producto de degradación de la desoxicorticosterona, es un potente inhibidor de la formación de DHT y que en contraste con la progesterona y la desoxicorticosterona, no es precursor de andrógenos (11).

Otros compuestos que disminuyen la formación de DHT son el 17 β - N,N, dietilcarbamoil - 4 - metil - 4 aza- 5 alfa androstan - 3 ona (4 MA) que se ha demostrado, es capaz de inhibir a la 5 alfa reductasa tanto *in vivo* como *in vitro* (12) y la progesterona que es un compuesto que antagonista con el receptor de andrógenos y con la 5 alfa reductasa (13).

Actualmente se conoce una gran variedad de esteroides con actividad antiandrogénica cuyos efectos han sido descritos (14, 15) . Este grupo de sustancias han sido probadas por varias vías de acceso a la economía corporal, mostrando efectos distintos, tanto en su farmacocinética como en su

farmacodinamia. Entre los tratamientos tópicos con antiandrógenos se encuentra el uso de antagonistas para el receptor de andrógenos como la 17 alfa propilmesterolona (PM) (16), la propil testosterona (17), la 3-oxo-4 metil-aza-5 alfa - androst - 1 ene 17 carboxilato (18) que tienen alta afinidad por el receptor de andrógenos y disminuyen el tamaño de la mancha del órgano del flanco del hámster ; sin embargo no han sido probados como fármacos para mejorar el acné. El levonorgestrel (LNG), es una progestina sintética que tiene afinidad por el receptor de andrógenos (19), que mejora el acné en piel humana cuando se utiliza por la vía tópica (20) y que disminuye el tamaño del órgano del flanco del hámster aunque aumenta el diámetro de la mancha de éste, así como el número de folículos pilosos (21).

El RU 38882 (22) es un antiandrógeno no esteroide (23), 100 veces más potente sobre la piel que el acetato de ciproterona. Este compuesto disminuye el retículo endoplásmico de las células de las glándulas sebáceas en la rata. El retículo endoplásmico es una estructura involucrada en la síntesis de lípidos. Se ha demostrado que en los casos de seborrea la densidad de esta microestructura se encuentra aumentada. El RU 38882 es un antiandrógeno que no presenta efecto sistémico sobre la próstata cuando se inyecta por las diferentes vías. Se ha informado que este compuesto aplicado por la vía tópica no modifica la concentración de los receptores de andrógenos en el citosol de la dermis en las ratas castradas, mientras que los aumenta en la dermis de las ratas intactas. Dado que el RU 38882 no modifica los niveles endógenos de testosterona es probable que el compuesto impida la formación del complejo andrógeno-receptor (24).

El acetato de ciproterona, es un compuesto que se une al receptor de andrógenos y es capaz de mejorar el acné en piel humana (25) cuando se administra por la vía oral; sin embargo en aplicaciones tópicas sobre la piel, no inhibe la producción de sebo por lo que es clínicamente no es efectivo por esta vía. Su falta de eficacia, puede ser atribuida a su parcial efecto androgénico, ya que aumenta la densidad

del retículo endoplásmico en las glándulas sebáceas de la piel de la rata después de aplicaciones tópicas (22).

Resumiendo los datos anteriores se pueden visualizar 2 posibles rutas para inhibir el efecto de los andrógenos: a) el bloqueo del receptor de andrógenos a través de un antagonista ó b) por la inhibición en la formación de DHT por agentes inhibitorios de la 5 alfa reductasa.

Edgrin y Col. (26) demostraron que el levonorgestrel (LNG) es un compuesto que no tiene actividad estrogénica, ni es convertido a estrógenos *in vivo*. Es un potente anticonceptivo oral con propiedades semejantes a la progesterona; pero más potente que ella y sin presentar efectos androgénicos. Es una hormona que no tiene efectos mineralocorticoides o glucocorticoides.

Estudios realizados por Fotherby en humanos, demuestran que el levonorgestrel se absorbe a través del tracto gastrointestinal; su vida media en el plasma es de 19 a 26 horas. La principal ruta para su metabolismo en hígado, es la reducción del grupo 4 en - 3 ona en el anillo A, dando como resultado los metabolitos urinarios en forma de sales solubles que son: los glucosiduronatos de 3 alfa - 5 β tetrahidronorgestrel y el 3 β - 5 β tetrahidronorgestrel, así como el 5 β - 3 oxoesteroide. También Fotherby demostró la existencia de metabolitos hidroxilados del levonorgestrel en orina, dentro de los cuales el más abundante es el sulfato de 16 hidroxinorgestrel (27, 28).

El levonorgestrel se utiliza sólo o en combinación con el etinil estradiol por vía oral en terapia anticonceptiva. Reportes de Barranco y Jones (29) indican que este compuesto en dosis de 0.5 mg diarios por 4 meses fueron capaces de empeorar el acné de 3 de las 5 pacientes estudiadas, mientras que aplicaciones tópicas diarias con pomada conteniendo LNG al 5% por 10 semanas fueron capaces de mejorar el acné (20) . Esto puede atribuirse a que por vía tópica este compuesto es capaz de

disminuir el contenido de lípidos de células estimuladas con testosterona como ha sido demostrado por nuestro grupo (21).

Por otro lado, existe el hecho de que el acetato de ciproterona, que es un potente antiandrógeno por la vía oral (30) es un antagonista la acción de éstos bloqueando la unión de la DHT a los receptores proteínicos específicos además de disminuir la biosíntesis ovárica de andrógenos (31); sin embargo, para lograr este efecto, se requieren dosis farmacológicas elevadas, por lo cual, en los estudios reportados con humanos, no se ha alcanzado el éxito deseado, puesto que el tratamiento llega a ser prolongado y los efectos colaterales a causa de la dosis son considerables.

Dado que los órganos del flanco del hámster (OF) responden a estímulos androgénicos presentando cambios morfológicos semejantes al resto de las glándulas sebáceas, entonces éstas pueden ser un buen modelo en el estudio del efecto de agentes tópicos, además de que por ser pares, el órgano contralateral es útil como control indicador de la actividad sistémica del principio activo (32, 33).

El efecto de andrógenos en el OF ha sido ampliamente estudiado. Takayasu y Adachi (7) demostraron que después de la inyección intraperitoneal con testosterona ^3H , el metabolito que se encuentra en mayor abundancia en el OF del hámster macho es la 5 alfa DHT ; que después de tres semanas de castración la captación de 5 alfa DHT radioactiva disminuye considerablemente y que la glándula presenta atrofia además de una reducción a la mitad de la actividad de las siguientes enzimas que participan en la vía glucolítica: hexocinasa, fosfofructocinasa, aldolasa, gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa ; también se encuentra disminuida la actividad de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, que es una enzima que participa en el ciclo de las pentosas (33). Se ha informado que 20 mg de T inyectada a los machos castrados, son suficientes para aumentar el porcentaje de incorporación de glucosa ^{14}C a lactato de 3.1 a 4.8 % (34).

El grupo de Mauvais-Jarvis demostró que la T se metaboliza a DHT, 5 alfa androstandiona, androstendiona, androsterona, dehidroepiandrosterona y androstandioles tanto en folículos pilosos de piel humana, de hámster y también en los OF (35).

En 1974, Adachi demostró la presencia de receptores de T y de DHT tanto en citosol como en núcleo del OF del hámster macho. La castración en estos animales disminuye la capacidad de unión de los andrógenos a su receptor. Dicha capacidad puede ser recuperada con dosis de 20 mg de T o de DHT (34).

Frost y Gómez informan (36) que la aplicación tópica de esteroides androgénicos sobre el OF del hámster hembra causa un aumento en el diámetro de dicho órgano y que cuando se aplican antiandrógenos al mismo tiempo con esteroides androgénicos por esta vía, la acción de estos últimos puede ser inhibida. Estos datos coinciden con los de Clanachan y su grupo (37).

Por otro lado se ha demostrado que el 17 β C disminuye los lípidos en el citoplasma de las células de los OF tratados con T (38), mientras que el acetato de ciproterona o el de clormadinona no tienen este efecto. Se ha informado que 600 μ g de acetato de ciproterona inyectados simultáneamente con 20 mg de T por vía intraperitoneal reducen la vía glucolítica aumentada por la T de 4.8 % a 2.8 % . El porcentaje de incorporación de glucosa a lípidos , según estos autores disminuye de 0.009 % a 0.007 % en la tratada (34).

Cuando se incuban *in vitro* OF del hámster hembra tratadas diariamente por espacio de 3 semanas con 5 μ g de T, en presencia de este esteroide y utilizando glucosa como precursor de lipogénesis, se observa una mayor incorporación de la marca al extracto lipídico que en el caso del control. Si este experimento se repite en las mismas condiciones , pero utilizando el LNG en lugar de la T, se encuentra que la incorporación de glucosa a lípidos es semejante al control. Utilizando conjuntamente los 2 esteroides en el mismo esquema experimental, se obtiene que

la cantidad de lípidos marcados es similar al control (datos no publicados). Los resultados obtenidos por nuestro grupo indican que la T aumenta la síntesis de lípidos a partir de glucosa ^{14}C , mientras que el LNG parece inhibir este efecto de la T.

Cuando los OF del hámster hembra se trata por 3 semanas *in vivo* con T, el peso de los lípidos extraídos por el método de Folch aumenta en comparación con el control, y cuando se trata con $5\ \mu$ de LNG tópico el mismo lapso de tiempo, el peso de los lípidos extraídos es igual al control. Cuando se tratan con $5\ \mu\text{g}$ de T más $5\ \mu\text{g}$ de LNG diariamente por 3 semanas, no se observa aumento en el peso de los lípidos en comparación con el control (datos no publicados). Los datos obtenidos por nuestro grupo, sugieren que la T produce aumento y acumulación de lípidos en el OF tratados con la hormona en las condiciones experimentales, mientras que el LNG parece incrementar la degradación de la grasa en estas mismas células.

Por otro lado, ha sido informado que el LNG es una progestina que *per se*, se une con alta afinidad a los receptores de progestágenos y andrógenos; pero no de estrógenos, y que esta afinidad por el receptor de progestágenos disminuye cuando el LNG es metabolizado a 5 alfa dihidro-LNG (5 alfa LNG), 3 alfa, 5 alfa tetrahidro-LNG (3 alfa, 5 alfa LNG) y el 3 β , 5 alfa LNG. Sin embargo el 5 alfa LNG aumenta su afinidad por el receptor de andrógenos, mientras que la reducción en las posiciones 3 y 5 destruyen completamente la afinidad por los receptores a progestágenos y andrógenos en los tejidos blanco para estas hormonas (39).

En las pruebas realizadas con el OF se observa que el efecto de la T sobre la síntesis de lípidos es antagonizado por el LNG, razón por la cual, es factible que su metabolito 5 alfa reducido (5 alfa LNG), que tiene una alta afinidad por el receptor de andrógenos, sea el responsable del efecto antiandrogénico observado en este tejido.

Por otro lado, la posterior reducción de la doble ligadura en el C-3 en la molécula de LNG, podría explicar el hecho, de que cuando este producto se aplica por vía tópica en piel humana (20), no se produzcan efectos colaterales después de 10 semanas de tratamiento por esta vía.

Dados los antecedentes anteriores es de interés conocer las interacciones del LNG y sus metabolitos con los receptores de andrógenos en el OF.

ESTRUCTURA Y PROPIEDADES BIOQUIMICAS DE LA 5 alfa REDUCTASA.

La 5 alfa reductasa es una proteína hidrofóbica formada por 259 aminoácidos, con un peso molecular de 29462. Es una enzima que se encuentra en la fracción microsomal de las células blanco para andrógenos y es el catalizador responsable de la conversión de testosterona (T) a 5 alfa dihidrotestosterona (DHT) que es un andrógeno más potente. Esta enzima juega un importante papel en la diferenciación sexual ya que la induce y desarrolla los genitales masculinos (40), así como en la fisiología de los andrógenos.

La mutación del gene que codifica a la 5 alfa reductasa induce una forma de pseudohermafroditismo masculino en el cual los genitales internos son masculinos, mientras que los externos no están bien desarrollados (41). La expresión del gene que codifica a la 5 alfa reductasa está regulada por los andrógenos. La administración de T induce la expresión del RNA_m que la codifica en células de próstata, pero no en el hígado (42). Estos datos sugieren que el gene que la codifica se regula en los diferentes tejidos.

Otra característica de esta enzima es su papel en algunas anomalías como patrones de calvicie en el varón, acné e hirsutismo (43).

Existe mucha controversia acerca de la existencia del número de isoenzimas presentes en el hígado y en la próstata y sus requerimientos por cofactores. Se ha reportado en la literatura la existencia de 2 tipos de isoenzimas de la 5 alfa reductasa codificadas por diferentes genes: la de tipo I y la de tipo II. La de tipo I que cataliza la reducción de una variedad de sustratos y que es insensible al esteroide 4 aza-finasteride (43) ; pero que no es la responsable de la anomalía conocida como deficiencia de 5 alfa reductasa (44); ya que el DNA_c codificado por el gene involucrado en la síntesis de la enzima es normal en esta enfermedad genética. Otra característica de la del tipo I, es que se expresa ligeramente en la próstata del humano y tiene homología del 60 % de aminoácidos con la 5 alfa reductasa que se

expresa en el hígado (40). La estructura del gene que codifica a esta enzima, ya ha sido demostrada (44). Esta enzima se expresa a pH neutro ó básico en fibroblastos humanos (46).

La 5 alfa reductasa de tipo II, (45) se diferencia de la de tipo I en varias características:

.Inhibe su actividad en presencia del esteroide 4 aza-finasteride por lo cual se describe como sensible a finasteride.

.Parece ser la responsable de la enfermedad conocida como pseudohermafroditismo masculino con deficiencia de la 5 alfa reductasa, por lo cual su papel en la diferenciación de los genitales externos masculinos así como de la glándula prostática es muy claro. En este padecimiento, el gene autosómico presente en el cromosoma 5 que codifica a la enzima funcional puede estar alterado : por presentar una mutación o mutaciones (41) .

.Solo se expresa a pH ácido y es muy abundante en la próstata.

MECANISMO DE ACCION DE HORMONAS ESTEROIDES.

El descubrimiento de las hormonas esteroideas data desde principios de siglo. En 1962 Jensen y Jacobson identificaron proteínas celulares que unían hormonas esteroideas con alta afinidad y especificidad. Este descubrimiento revolucionó el concepto del mecanismo de acción de hormonas esteroideas. Tiempo más tarde los grupos de Jensen y Gorski lanzan el concepto de como el complejo receptor - esteroide inicia los eventos de cascada que permiten la expresión de genes específicos. Por ese tiempo, Clever y Karlson demostraron que la ecdisona (un esteroide presente en los insectos) inducía la formación de cromosomas " puff " y con esto documentó la primera demostración directa de la inducción de la expresión génica por las hormonas esteroideas. Ashburner demostró que la activación de varios genes por la ecdisona, se traducía en la síntesis de proteínas de manera rápida e independiente, mientras que otro gran número de genes respondían después de varias horas y en forma dependiente (47).

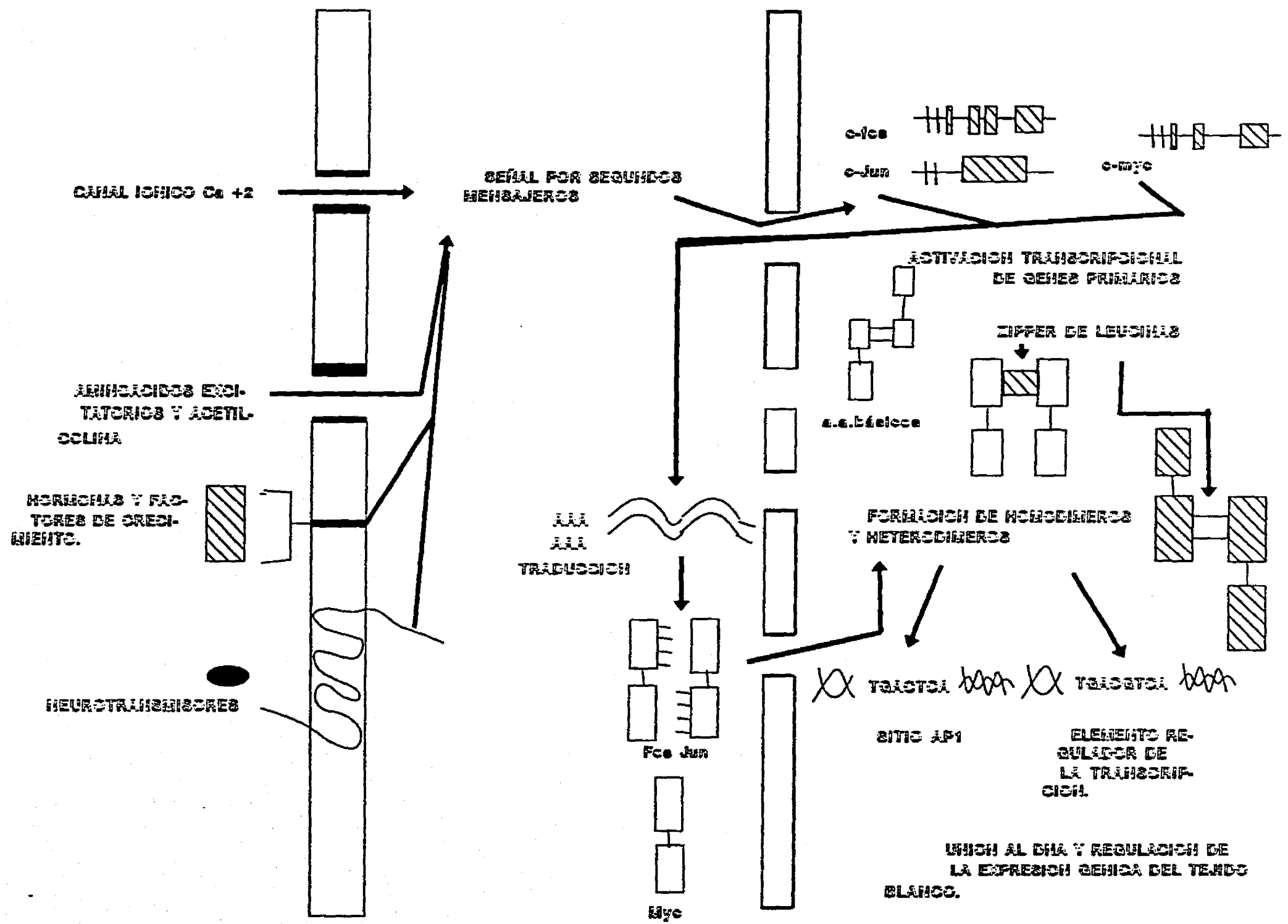
El mecanismo de acción de hormonas esteroideas, comienza cuando éstos se difunden pasivamente dentro de todas las células; los esteroideas forman complejos con proteínas receptoras intracelulares (R) que son esteroide y tejido específicas y se encuentran presentes en concentraciones de aproximadamente 10,000 a 100,000 moléculas por célula. Cada receptor une a su respectivo esteroide en forma reversible pero con alta afinidad, las constantes de disociación se encuentran entre 10^{-10} y 10^{-8} M.

La unión con el esteroide resulta en una activación que involucra cambios conformacionales, así como cambios oliméricos en el complejo hormona-receptor que hacen capaz a éste de unirse con alta afinidad a sitios específicos de la cromatina. Una vez unido al sitio aceptor nuclear, el complejo hormona-receptor parece actuar como factor transcripcional modulando la transcripción de genes específicos y posiblemente en la fase post-transcripcional alterando los niveles de RNA_m y proteínas.

La regulación de la activación de los receptores no es aún un mecanismo muy claro; sin embargo las interacciones con otras proteínas no receptores pueden ser la clave de dicha regulación. Se ha informado que las proteínas heat-shock de 90 KDa, están asociadas a la mayoría de los receptores a hormonas esteroides inactivos, pero no a la forma activa. La fosforilación, es otro evento que también ocurre antes y durante la activación del receptor, a través de cinasas asociadas al receptor, por lo que podría ser otro mecanismo de regulación. Un tercer mecanismo podría ser a través de las proteínas Fos y Jun, las cuales podrían actuar como factores de transcripción modulando la regulación de la transcripción de ciertos genes de manera positiva o negativa, como ha sido reportado para la regulación de glucocorticoides y estrógenos (48). Estas proteínas forman heterodímeros con el receptor de hormonas esteroides, quizás en forma similar al zipper regulador.

El siguiente esquema podría clarificar esta hipótesis para la regulación del estímulo transcripcional: los estímulos que pueden ser hormonales, factores de crecimiento ó bien neurotransmisores, podrían activar la transcripción de proto-oncogenes primarios, entre los cuales podrían encontrarse c-fos, c-jun, y c-myc, a través de segundos mensajeros como el AMP_c, el Ca⁺² y el acilglicerol, que pueden acoplarse a estos genes para que se lleve a cabo la transcripción como respuesta primaria (49).

Las proteínas como Fos, Jun, Myc y otras, se traducen en el citoplasma de las células blanco y rápidamente se translocan al núcleo en donde pueden formar homo ó heterodímeros. La formación de estos dímeros, se lleva a cabo a través de la unión de residuos repetidos de leucina en los dominios de las alfa- hélices de las cadenas polipeptídicas, formando la estructura conocida como " zipper " de leucina (49). Estos dímeros tienen la característica de presentar sitios de unión a secuencias específicas del DNA, como a la secuencia AP₁ ó a elementos de



MECANISMO DE TRANSCRIPCION GENICA

respuesta hormonal (SRE) (50). Esta unión está mediada por una región de aminoácidos básicos en las proteínas. El resultado de este proceso es la transcripción de genes blanco como respuesta secundaria.

Resumiendo lo anterior podemos decir que las proteínas no receptoras juegan un papel mediador en la interacción del complejo hormona-receptor con secuencias específicas del DNA y con las proteínas asociadas al DNA, mecanismo que aún no es muy claro. La interacción con oncoproteínas como Fos, Jun y Myc, ofrecen una explicación para la regulación rápida de los esteroides sobre la transcripción y soporta el modelo en cascada que se tiene para los esteroides.

MODELO DE CASCADA PARA LA REGULACION DE LA TRANSCRIPCION GENICA REALIZADA POR LAS HORMONAS ESTEROIDES.

La interacción del receptor activado con una primera secuencia específica del DNA, conocida como secuencia de regulación o elemento de respuesta hormonal (SRE), produciría una rápida inducción del producto génico (factor regulador) en unos cuantos minutos. Esta proteína ó factor regulador podría interactuar con una segunda secuencia específica, la cual a su vez podría unirse a otros factores de transcripción sumándose (o en lugar de) a los receptores de esteroides, lo cual produciría una respuesta tardía en la transcripción de genes estructurales y llevaría de 2 a 4 horas desde que el esteroide se adentró en la célula hasta que la producción de las proteínas encargadas de ejercer los efectos fisiológicos que se observan entre las 12 y 24 horas después del estímulo con esteroides (51).

Los eventos biosintéticos que resultan de la interacción esteroide-receptor, incluyen la transcripción del RNA_m precursor, el procesamiento y la traducción de proteínas específicas que alteran la función celular, el crecimiento y la diferenciación.

Una vez que el complejo hormona-receptor ha interceptado con sitios aceptores del DNA, el esteroide se libera de su receptor, desocupando los sitios de éste, y más tarde sale de las células blanco, se convierte a su sal en el hígado y en esta forma es eliminado del organismo a través de la orina, o heces fecales, o bien puede ser capturado de nuevo como materia prima para formar nuevos esteroides, como es el caso del cortisol.

La comprensión de la relación que existe entre la unión esteroide-receptor y el mecanismo de acción hormonal depende de la válida caracterización y la medición exacta de los receptores de esteroides.

CRITERIOS QUE SE REQUIEREN PARA LA IDENTIFICACION DE UN RECEPTOR.(52)

CAPACIDAD FINITA DE UNION: La respuesta biológica de las hormonas esteroides, es un fenómeno saturable, dado que se tiene que formar un complejo receptor - hormona, por lo tanto el número de receptores por unidad de masa de tejido debe de ser limitada. Este criterio se demuestra cuando el receptor se expone a diferentes concentraciones de esteroide radioactivo y subsecuentemente se mide la cantidad de esteroide unido al receptor. Este procedimiento sería muy simple si solamente existiera una sola clase de sitios de unión para un esteroide dado; sin embargo la mayoría de los sistemas poseen múltiples componentes de unión con su propia afinidad y capacidad para unir al esteroide en estudio.

ALTA AFINIDAD: Los receptores deben poseer alta afinidad para sus respectivas hormonas, ya que los niveles circulantes de éstas son de 10^{-10} y 10^{-8} M. Si los receptores no tuvieran esta característica, la respuesta no podría ocurrir.

ESPECIFICIDAD: La especificidad está dada por la respuesta de la célula blanco a la señal hormonal, sin interferencia de otras señales. Los sitios del receptor no poseen una absoluta estereoespecificidad, ya que su capacidad para distinguir a su propio agonista de otros es limitada.

ESPECIFICIDAD CELULAR O DE TEJIDO: Los diferentes tipos de células o de tejidos tienen cada uno de ellos una respuesta a hormonas que es específica. Dado que la respuesta es específica y mediada por receptores, los receptores solo van a encontrar en estas células y no en las que no responden.

CORRELACIONES CON LAS RESPUESTAS BIOLÓGICAS: La demostración de que la respuesta hormonal depende de su unión con el receptor es el criterio más difícil de establecer, por lo cual deben realizarse varios análisis.

ANALISIS DE SISTEMAS CON UN COMPONENTE SIMPLE: A pesar de que en la mayoría de los casos existen diferentes componentes de unión al receptor en esta parte se va a ilustrar como si se tratara de un solo componente.

Si la cantidad total del receptor (R_t) se determina en condiciones de equilibrio con el esteroide (S) hasta la saturación o cerca de ésta, se obtiene una curva como la que se representa en la Figura 1, la cantidad de hormona unida (RS) puede relacionarse matemáticamente a los agonistas libres (S), a los receptores totales (R_t) y a la constante de disociación K_d :

$$[RS] = \frac{[R_t][S]}{K_d + [S]}$$

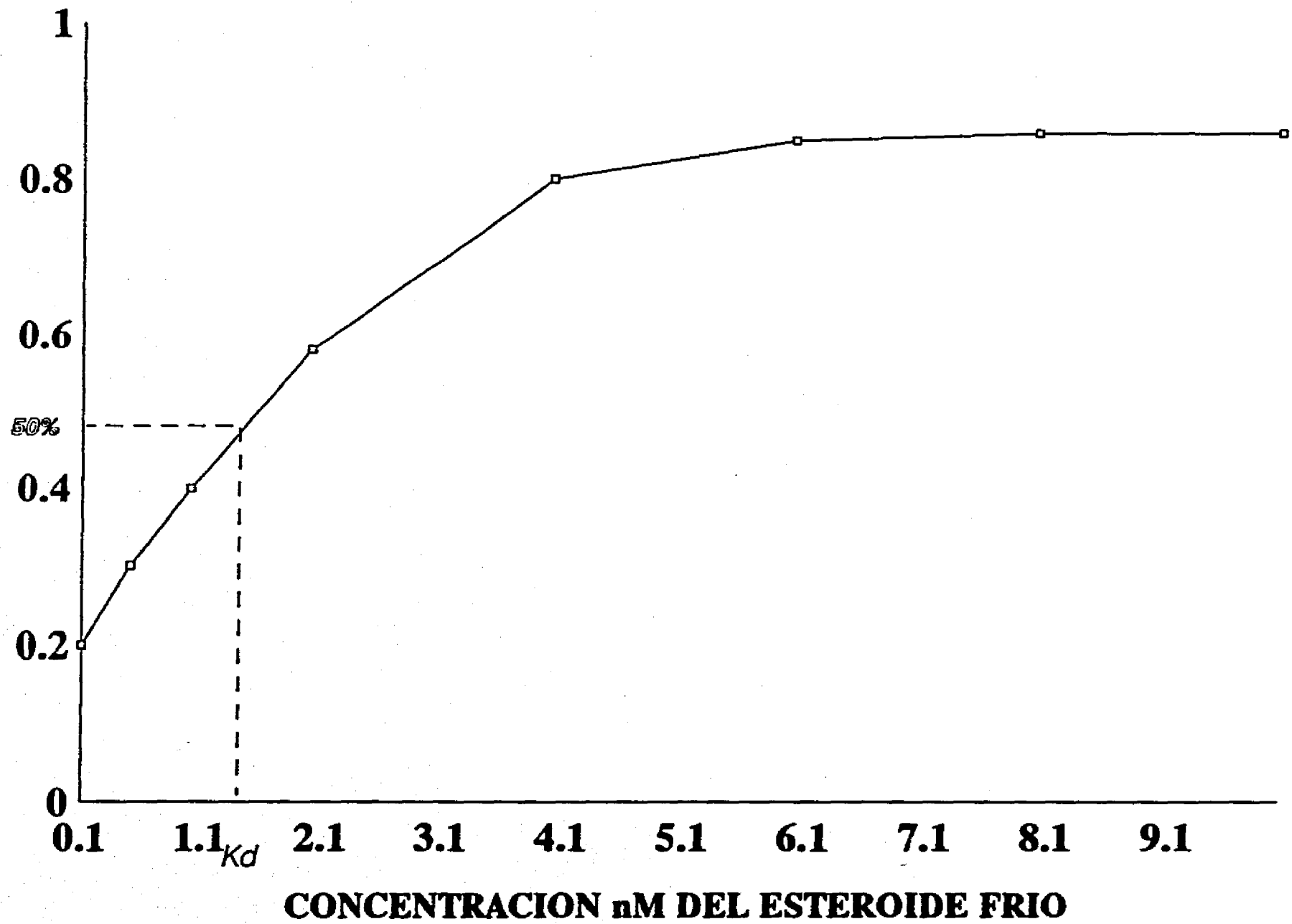
Esta relación es la clásica para la cinética enzimática empleada en la ecuación de Michaelis-Menten aplicada a una condición de equilibrio. Cuando un esteroide se agrega al sistema, los sitios del receptor llegan a saturarse y el punto de saturación es igual al número de sitios del receptor, unión total (R_t). La constante de disociación (K_d) es la concentración del esteroide a la cual se unen el 50 % de los sitios del receptor. Aunque los parámetros R_t y K_d se pueden estimar en la curva de saturación, es más exacto obtenerlos por el método gráfico de Scatchard (53).

Los sitios del receptor que se unen rápidamente a la hormona y la liberan lentamente presentan alta afinidad.

ANALISIS DE SISTEMAS DE MULTIPLES COMPONENTES.

UNION ESPECIFICA Y NO ESPECIFICA: La unión específica que se discutió más arriba, se caracteriza por tener alta afinidad y baja capacidad de unión, mientras que la no específica se caracteriza por tener baja afinidad y alta capacidad de unión al receptor.

CONCENTRACION DEL ESTEROIDE 3H UNIDO



GRAFICA 1. ANALISIS DE UNION AL RECEPTOR

La unión no específica resulta de la interacción del agonista con sitios no receptores que tienen baja afinidad y alta capacidad de unión.

La unión total del esteroide se define como:

$$RS + NS$$

en donde RS es la unión del receptor con su agonista y NS la unión a sitios no específicos.

Los sitios no específicos se miden con la cantidad de hormona radioactiva unida al receptor en presencia de la misma hormona radioinerte en exceso. El compuesto no marcado ocupa los sitios de alta afinidad del receptor, pero no interfiere con la unión al agonista ^3H a sitios no específicos. Los sitios del receptor, se estiman restando NS de RS + NS.

Para determinar las características y parámetros del receptor, se utilizan compuestos radiolnertes. Esta práctica, se basa en la premisa de que el compuesto no marcado es un agente inhibitorio. El razonamiento es verdadero cuando el agonista radiolnerte del que se trata, es idéntico al radioactivo, mientras que si se utilizan inhibidores diferentes, se asume que se va a producir una inhibición de tipo competitivo.

INHIBICION COMPETITIVA DE LA UNION AL RECEPTOR.

Los inhibidores competitivos disminuyen la unión del esteroide a los sitios del receptor, de manera que el esteroide marcado no pueda unirse a éstos. Cuando se aumenta la

concentración del agente inhibitorio se altera la K_D , sin embargo el número de sitios no cambia, en este caso se puede tener la seguridad de que se trata de un agente inhibitorio competitivo, mientras que los inhibidores no competitivos, no alteran la K_D ; pero disminuyen los sitios de unión.

Otro método utilizado en el estudio de la especificidad y la afinidad es cuando la cantidad de hormona marcada isotópicamente se mantiene constante y se varía la cantidad de esteroide agente inhibitorio. En esta forma, se puede calcular la constante de inhibición (K_i 50) que se define como la concentración de agonista no marcado radioisotópicamente, que inhibe por competencia el 50 % de los sitios de unión del receptor (I_c 50) más el cociente que resulta de dividir la concentración de hormona marcada utilizada entre la constante de disociación. Se calcula de la siguiente manera : (54)

$$K_i = I_c 50 + \frac{C}{K_d}$$

La afinidad relativa de unión (RBA), es el cociente que se determina, dividiendo las concentraciones del substrato radiolnerte a las que se observa el 50 % de la inhibición de la unión del esteroide al receptor, del esteroide radiolnerte idéntico al marcado (S), entre el que no lo es (X). Por ejemplo si la concentración del compuesto S a la que ocurre el 50 % de inhibición es de 10 nM y la del compuesto X es de 100 nM, la afinidad relativa de S será de 10/100 o sea de 0.1 nM para S. Este método es válido solo cuando las pendientes de las curvas son paralelas, si no es así, no se puede determinar el RBA, lo que indica que la inhibición no es de tipo competitivo.

La inhibición no competitiva puede ocurrir por múltiples razones, por ejemplo: el agente inhibitorio puede ser capaz de precipitar o desnaturalizar al receptor o a su sitio activo, o alternativamente, el agente inhibitorio, podría unirse a un segundo sitio del receptor y en esa forma alterar el sitio activo.

DISTINCION ENTRE LOS SITIOS DE ALTA Y BAJA AFINIDAD: Todos los métodos para separar los sitios de unión de alta y baja afinidad dependen, como se dijo anteriormente, de la afinidad del receptor por el agonista y del número de sitios de

éste, como son los análisis en los que se utilizan precipitantes y/o adsorbentes, o gradientes de sacarosa.

Para seleccionar el método más adecuado para separar los sitios de alta afinidad y baja capacidad, es necesario conocer el tipo de dato que nos daría la información más útil requerida. El gradiente de sacarosa obtenido por ultracentrifugación diferencial, ha sido ampliamente utilizado para determinar la estructura del receptor; sin embargo, no es un método adecuado para medir varias muestras. La diálisis es el método más exacto para determinar constantes de unión; sin embargo, la técnica más utilizada actualmente, por ofrecer cualidades prácticas, es el del carbón/dextrán, en éste, los errores debidos a condiciones en donde no hay un equilibrio o a la adsorción indebida de proteínas al precipitado adsorbedor, son aceptables.

ANDROGENICIDAD DE LOS COMPUESTOS 19 NOR - ESTEROIDES 7 alfa METIL 17 alfa METIL SUBSTITUIDOS.

Desde el año de 1963, el grupo de Campbell (55) descubrió el aumento en la potencia androgénica de compuestos esteroides 19 nor a los que cuando se les adiciona un grupo metilo en la posición 7 alfa aumentan su capacidad biológica. Estos compuestos son agentes más efectivos que las propias hormonas naturales para producir efectos androgénicos. La pérdida de un metilo angular en el C-10 y el aumento de este radical en la posición 7 alfa, es suficiente para aumentar varias veces la potencia androgénica de la T.

EL aumento de la potencia androgénica en los compuestos 7 alfa metilados, se debe a que el grupo 7 alfa metilo protege a la configuración 19 nor, haciendo más estable al compuesto y con mayor vida media, lo que consecuentemente se traduce en el aumento de la potencia androgénica observada.

También en el año de 1963, Segaloff (56) agregó otro grupo metilo en la posición 17 alfa de los 19 - nor- androst - 4 ene -3,17 díona, aumentando así aún más su potencia androgénica, por conferir este último grupo mayor estabilidad al compuesto, lo que lo convierte en un buen agente terapéutico como anabólico y como agente efectivo para atacar tumores malignos hormona dependientes (57).

Los compuestos 7 alfa metil andrógenos no se reducen en la posición 5 en los tejidos blanco para andrógenos, debido a que no son reconocidos por la 5 alfa reductasa a causa del grupo metilo adicionado (58). Sin embargo este compuesto es activo en tejidos que no requieren de la DHT como metabolito activo, como es el caso del músculo y la hipófisis, por lo que estos compuestos ofrecen beneficios para la salud a hombres que requieren de tratamientos con andrógenos (59).

La 7 alfa metil, 17 alfa dimetil - 19 nortestosterona también conocida como miboleron, es un compuesto que se une con muy alta afinidad a los receptores de

andrógenos y a los de progesterona. En el caso de esta última hormona, se ha observado que existe diferente afinidad de unión entre la mibolona y los receptores de progesterona en útero de rata y de ovinos, lo que sugiere la existencia de una diferencia entre especies en la estructura del receptor (60).

Otra característica de este andrógeno sintético, es su incapacidad para unirse a receptores de glucocorticoides y a la albúmina sérica que une a las hormonas esteroideas (60). Estas características hacen de este compuesto un ideal para estudios de receptores de andrógenos con alta afinidad y baja capacidad.

HIPOTESIS

Si el mecanismo de acción del LNG o sus metabolitos es a través de su interacción con los receptores de andrógenos en el OF, entonces el agonista producirá efectos antiandrogénicos sobre este órgano.

OBJETIVOS

1. Estudiar la biotransformación del LNG en el OF del hámster hembra, y particularmente la presencia de metabolitos 5 alfa reducidos del LNG (5 alfa LNG).
2. Caracterizar el receptor de andrógenos en el OF del hámster macho.
3. Demostrar que el LNG o su metabolito 5 alfa reducido interactúan específicamente con el receptor de andrógenos en el citosol y en el núcleo de las células del OF del hámster macho.
4. Determinar el efecto *in vivo* e *in vitro* del LNG y su metabolito 5 alfa reducido.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL RADIOACTIVO Y QUIMICOS:

Levonorgestrel (15, 16 ^3H) (LNG - ^3H), de actividad específica de 24.28 Ci/ mmol y LNG radioinerte obtenido de Schering AG (Berlin). (17 alfa metil ^3H) - dimetil 19 - nortestosterona (DMNT - ^3H), de actividad específica de 85 Ci/mmol y DMNT (mibolona) radioinerte obtenida de Amersham Int, plc (Buckinghamshire) y glucosa U - ^{14}C (U- ^{14}C -G), de actividad específica de 340 Ci mmol de NEN Co (Boston Mass) .

La progesterona (P_4), DHT, NADPH, y glucosa radioinertes fueron surtidos por Sigma Chemicals.

La pureza radioquímica de los compuestos marcados radioisotópicamente se estableció por cromatografía en placa fina y en papel en un sistema de Bush B3. Todos los agentes y reactivos, fueron de grado analítico.

PREPARACION DEL 5 alfa LNG:

El 5 alfa LNG se sintetizó a partir de LNG, a través de la reducción de la doble ligadura (Δ^4) con litio y amonio, cristalizado en hexano: acetato de etilo y purificado por cromatografía (64). La pureza química del LNG y del 5 alfa LNG fue verificada por sus puntos de fusión, y por su conducta en HPLC. Su espectro de absorción de rayos infrarrojos y por resonancia magnética nuclear: (60)

5 alfa LNG punto de fusión = 238°C

[alfa] $^{20}_{\text{D}}$ ($\text{CH} - \text{Cl}_3$) = 11.96°

IR: max 3380, 3280, 1719 cm^{-1}

NMRH (011.0 (t, CH_3) 2.55 (s, $\text{C} = \text{CH}$), 2.0 (bs, OH desaparece con D_2O)
p.p.m.

ANIMALES Y TEJIDOS.

Se utilizaron hámster de la raza dorados, hembras y machos entre 150 y 200 g de peso, que se mantuvieron en condiciones de bioterio, con 12 horas de luz y 12 horas de obscuridad con comida y agua *ad libitum*. Los animales fueron proporcionados por el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Xochimilco.

Los animales machos, se castraron bajo anestesia con éter 72 horas antes de los experimentos. Los animales se sacrificaron por decapitación y los OF fueron disecados, pesados y homogeneizados con un aparato de politrón (Brinkmann Instruments, Westbury, New York, utilizando buffer TEDAM compuesto por: 20 mM tris - HCl , 1.5 mM de EDTA; 0.25 mM de ditiotreitól; 5000 UK/ ml de aprotinina y 10 mM de molibdato de sodio y glicerol al 10 %. El pH de la solución fue de 7.4 a 4⁰ C. La dilución del tejido fue de 1:2. El homogeneizado se centrifugó a 105,000 g por una hora a 2⁰C, en un rotor 50.1 Beckman Ins. Palo Alto, para obtener el citosol.

Los animales hembras intactos, se sacrificaron por decapitación, los OF se disecaron, pesaron y homogeneizaron en buffer Krebs - Ringer fosfato en una proporción de 1:10.

DESARROLLO EXPERIMENTAL.

Determinación de proteínas: Las proteínas, tanto del homogeneizado como del citosol obtenidos a partir de OF de machos y hembras, se determinaron por el método de Bradford (61).

1. Se preparó una solución de albúmina (Merck, grado de reactivo), conteniendo 10 mg disueltos en 10 ml de NaCl 0.15 M. La concentración de albúmina en la solución, se comprobó con un análisis espectrofotométrico en un aparato Bush and Lomb, a 278 nm, en el espectro uv, basándose en su coeficiente de extinción $E_{280}^{1\%} = 6.6$, lo que indica que la absorbancia a esta longitud de onda, debe de ser de 0.66, si éste dato no se obtiene es necesario ajustar la concentración.
2. Las soluciones conteniendo de 10 a 100 μg de estándar de albúmina, se pipetearon en tubos de 12 X 100 mm y en un volumen de 0.1 ml. El volumen en el tubo de prueba también se ajustó a 0.1 ml con solución de NaCl 0.15 M.
3. Se le agregaron 5 ml de reactivo el cual se preparó en la siguiente forma:
Se disuelven 100 mg de azul brillante de Coomasie G-250 en 50 ml de etanol al 95%. A esta solución se le agregan 100 ml de ácido fosfórico al 85% (P/V), la solución resultante se diluye a un volumen final de 1 lt.
4. Se dibuja una Gráfica patrón de proteínas entre la cantidad de albúmina & absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.
5. La solución problema se diluye con NaCl 0.15 M. Se pipetea en cada tubo un volumen de 0.1 ml de la solución problema en tubos de 12 X 100 mm, se le agregan 5 ml de reactivo y se lee a una longitud de onda de 595 nm. Se prepara un blanco que contenga 0.1 ml de NaCl 0.15 M + 5 ml de reactivo.
6. La absorbancia resultante del problema, se interpola a la curva patrón y se extrapola de ésta al eje de las X para conocer la cantidad de proteína contenida en la muestra.

Metabolismo *in vitro* del LNG.(39)

Incubación: Se incubaron por duplicado 900 μ l de homogeneizado de OF de hámster hembra que corresponden a 3.3 mg de proteínas, en solución Krebs - Ringer fosfato conteniendo LNG - ^3H a una concentración de 8 μM en presencia de NADPH a una concentración de 431 μM en un incubador metabólico Dubnoff a 37 $^{\circ}\text{C}$ por una hora, utilizando aire como fase gaseosa y en un volumen final de incubación de 1 ml. El experimento se repitió en las mismas condiciones, solamente que en este caso, se agregó una concentración de T 10 veces mayor que la de LNG (Esquema 1). Se utilizó un control sin tejido, que se trató en forma idéntica al experimental. Al final del período de incubación, la reacción se detuvo, agregando acetato de etilo.

Extracción: Los esteroides radioactivos formados se extrajeron en 4 ocasiones con 3 volúmenes de acetato de etilo. El extracto obtenido se sometió por 3 ocasiones sucesivas a una partición con hexano y metanol al 10 % en agua con la finalidad de extraer la grasa.

Aislamiento de los compuestos radioactivos: El aislamiento y la pureza radioquímica del 5 alfa LNG, se llevó a cabo por la técnica de dilución isotópica reversa, la cual incluye una movilidad cromatográfica idéntica a la del esteroide en estudio, por lo menos en 2 sistemas de solventes diferentes y recristalizaciones sucesivas, agregando una cantidad en exceso del esteroide radioinerte hasta obtener actividades específicas constantes.

La conversión de los productos radioactivos, fue identificada en placas cromatográficas, utilizando un graficador de radiocromatogramas marca Packard.

CROMATOGRAFIA: Los compuestos se separaron por cromatografía de partición en cromatoplasmas de Al de 20 X 20 cm, con espesor de capa de 0.2 mm de sílica

gel 60 F 254DC - Alufolien Kieselgel Merk. Se utilizaron estándares externos radioinertes que se detectaron por su espectro a 240 nm con una lámpara de luz uv modelo SL 2357, el LNG, o por reacciones de color específicas (ácido molíbdico al 8 % en metanol), para compuestos reducidos, como el 5 alfa LNG.

Para identificar los compuestos radioactivos en el cromatograma, se utilizó un graficador de radiocromatogramas Packard.

Las áreas de radioactividad que mostraron una conducta cromatográfica idéntica al de los esteroides radioinertes utilizados, se eluyeron de la placa con metanol y más tarde el solvente se evaporó al vacío. Finalmente, a los esteroides en vías de identificación, se les añadió una cantidad adicional del esteroide radioinerte y se cristalizaron en forma sucesiva, mínimo en 3 ocasiones. Se determinó el contenido de la radioactividad tanto en los cristales como en las aguas madres, para calcular la actividad específica final. Los resultados se expresan en nmoles de LNG transformados/ g de proteína /hora de incubación.

Identificación del receptor en la glándula sebácea del hámster.

Curva de saturación y determinación de los parámetros de unión: Los sitios de unión del receptor de andrógenos, se saturaron en presencia de concentraciones crecientes de DMNT (1 - 10 nM) como ha sido previamente reportado (39). Los resultados se analizaron de acuerdo con el método de Scatchard (53), para calcular la constante de afinidad y el número de sitios de unión (B max) por el método de regresión lineal.

Para ello, se tomaron alícuotas de 150 μ l de citosol, conteniendo 0.83 mg de proteínas y se incubaron por triplicado durante 18 horas a 4 $^{\circ}$ C en tubos con DMNT 3 H en concentraciones crecientes de 1 - 10 nM y 50 μ l de buffer TEDAM. Con la finalidad de determinar la unión no específica, paralelamente a este grupo de tubos, se preparó otro, con idénticas concentraciones de DMNT - 3 H además

de 100 veces la concentración de cada uno de ellos de DMNT radioinerte. Pasado este tiempo, la separación de los esteroides unidos de la fracción libre, se realizó agregando 800 μ l de solución de carbón : dextrán (0.25 %: 0.025 %) en buffer TEDAM a cada uno de los tubos, agitando suavemente e incubando éstos por 10 minutos a 4 $^{\circ}$ C. Transcurrido el tiempo, los tubos se centrifugaron a 800 g por 10 minutos y se tomaron alícuotas de 200 μ l de cada uno de ellos, para cuantificar el contenido de radiactividad en cada uno de los tubos. Se agregaron 5 ml de líquido de centelleo (aquasol, Packard) y se contaron en un aparato de centelleo líquido Packard modelo tri-carb 2660. La eficiencia de conteo fue de 45 %. Los resultados se expresan en concentración nM.

Análisis por competencia del receptor de andrógenos de la glándula sebácea: Para realizar los experimentos por competencia de unión de los diferentes esteroides al receptor de andrógenos del OF del hámster macho, se utilizaron tubos que contenían una concentración de DMNT - 3 H de 1.4 nM, a los que se les agregaron concentraciones crecientes de 20 a 200 nM de los siguientes esteroides agonistas radioinertes: 5 alfa DHT, DMNT, LNG, 5 alfa LNG y P₄. El procesamiento de las muestras se realizó como se describió anteriormente para el análisis por saturación. El cálculo de la constante de inhibición (K_i) de cada compuesto, se realizó de acuerdo a los procedimientos descritos por Chang et al (54).

Determinación del contenido de grasa durante el ciclo estral.

La etapa del ciclo estral, se determinó por la técnica de frotis vaginal (62). Se analizó el contenido de lípidos por gravimetría en cada fase. El método se describe brevemente:

Los OF del hámster hembra, se disecaron, se pesaron y se separaron los derechos y los izquierdos. Se colocaron en viales previamente tarados conteniendo

cloroformo: metanol 2:1 por 24 horas hasta que las glándulas permanecieron en el fondo. Pasado el tiempo, las glándulas se sacaron del solvente, y éste se evaporó a sequedad. Los lípidos del fondo se pesaron; los resultados se expresan en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de glándula.

ANALISIS ESTADISTICO. Cada prueba se realizó en 3 ocasiones diferentes con la finalidad de obtener precisión y exactitud en los resultados. El contenido de grasa en los órganos del flanco derecho e izquierdo fue comparado mediante la prueba de X^2 . Mientras que el contenido de grasa en las diferentes etapas del ciclo fue comparado mediante el análisis de varianza de Schaffe (paquete EPISTAT).

Tratamiento *in vivo* con T, LNG y 5 alfa LNG.

60 animales hámster hembra de la especie dorados, se separaron en grupos de 4 animales cada uno y se mantuvieron en condiciones de bioterio con agua y comida *ad libitum*. Ambos flancos fueron rasurados con máquina eléctrica antes del experimento y cada 3 días durante el desarrollo del mismo. El efecto de los esteroides, se evaluó sobre el órgano del flanco derecho, mientras que el izquierdo se mantuvo como control de la absorción sistémica del principio activo. El efecto sobre el diámetro, peso, contenido y la síntesis de lípidos del OF, se determinó mediante aplicaciones diarias por vía tópica de los esteroides durante 5 semanas. El experimento se realizó por triplicado. Al órgano control, se le aplicó únicamente etanol. El efecto del solvente en estos órganos se determinó y los valores obtenidos se restaron de aquellos del órgano derecho.

El esquema de tratamiento se realizó como se indica:

- Grupo 1 (n = 4) 5 μg de T (21)
- Grupo 2 (n = 4) 5 μg de LNG (21)
- Grupo 3 (n = 4) 5 μg de 5 alfa LNG
- Grupo 4 (n = 4) 5 μg de T + 5 μ de 5 alfa LNG
- Grupo 5 (n = 4) 5 μg de T + 5 μ de LNG

Transcurrido el tiempo los animales fueron sacrificados bajo anestesia con éter.

Experimentos *in vitro* con T, LNG y 5 alfa LNG.

Con la finalidad de evaluar el efecto de los esteroides tópicos sobre la incorporación de glucosa U ^{14}C a lípidos *in vitro* por el OF del hámster hembra, éstos se midieron según el tamaño del pigmento que mostraban, se disecaron alrededor de la mancha pigmentada (63). Las glándulas izquierdas (control) se pesaron y se agruparon en grupos de 4 glándulas cada uno y se incubaron en presencia de glucosa U ^{14}C a una concentración de 2 mM por 2 horas a 37°C en 3 ml de solución Krebs - Ringer a pH de 7.4 y 150 mg de albúmina, en presencia de O_2/CO_2 , como ha sido previamente reportado para tejido graso (64). El mismo procedimiento se siguió para las glándulas derechas (tratadas). Al término de la incubación, los tejidos fueron colocados en 5 ml de líquido de Folch (65) por 24 horas a temperatura ambiente en un vial previamente tarado. Transcurrido el tiempo, se agregó 1 ml de agua destilada por una hora. Más tarde, el agua se retiró por succión al vacío. El solvente de extracción se evaporó hasta sequedad completa. Los lípidos se pesaron y se cuantificó la radiactividad contenida en ellos, en el contador de centelleo líquido Packard, modelo 3390, utilizando como solución de centelleo tolueno conteniendo 2 g de 2,5 - difenil - oxazole (PPO) y 50 mg de 1,4 bis (2 - (5 - difenil- oxazolil) benceno) (POPOP) por litro. Se calculó el porcentaje de incorporación a lípidos tomando como 100% el valor determinado para las glándulas control, sin tratamiento el cual se estimó en pmol/glándula/hora, según el criterio publicado por Cassidy et al (66). Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron en 3 ocasiones diferentes.

RESULTADOS.

DETERMINACION DE PROTEINAS.

Los resultados obtenidos por el método de Bradford muestran que el homogeneizado de un OF del hámster hembra que pesa aproximadamente 16 mg, posee un contenido proteínico de 0.53 mg, 2 glándulas de peso aproximado de 29 mg contienen 0.907 mg de proteína y 3 glándulas de aproximadamente 43 mg, contienen alrededor de 1.66 mg de proteínas.

METABOLISMO *in vitro* DE LNG.

Formación de 5 alfa LNG : La recuperación de material isotópicamente marcado con ^3H de la fracción metanólica resultante de la partición entre el metanol y hexano de extractos de incubación de homogeneizado de OF de hámster hembra, fue de 95 %.

Durante la purificación de los compuestos del extracto metabólico por cromatografía en placa fina, se identificaron zonas radioactivas correspondientes al LNG $R_f = 0.55$ y 5 alfa LNG $R_f = 0.65$, que tuvieron un comportamiento cromatográfico idéntico a sus estándares radioinertes.

Los resultados del experimento 1 indican que el LNG ^3H es transformado a 5 alfa LNG por el homogeneizado de OF del hámster hembra, incubado *in vitro* en presencia de NADPH. Mientras que en el control sin tejido, el LNG se recupera íntegramente como este compuesto. Asimismo el exceso de T en el medio de incubación disminuye la velocidad de conversión de LNG a su metabolito 5 alfa reducido (Tabla 1 y Gráfica1).

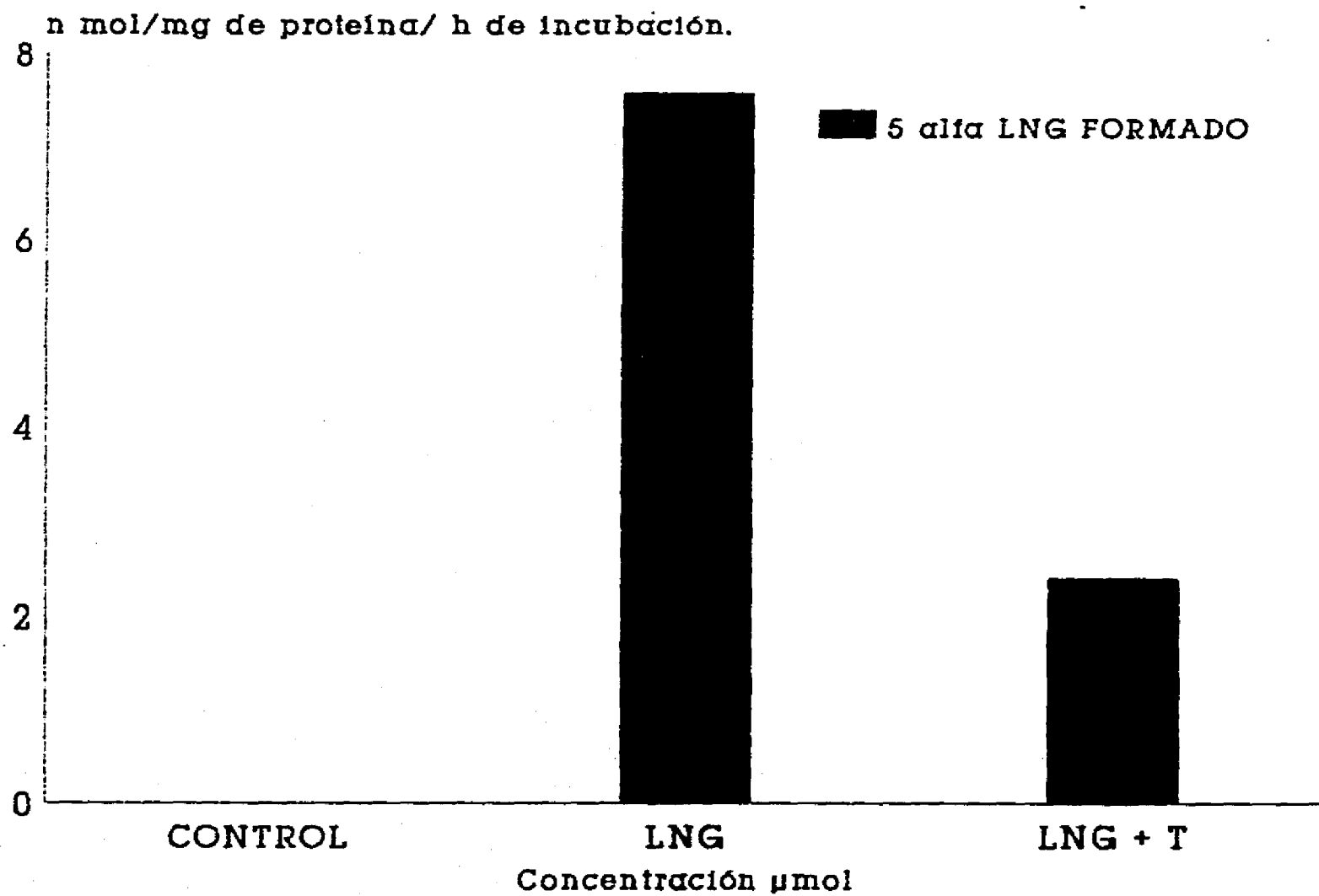
La Tabla 2 muestra las actividades específicas constantes obtenidas después de recrystalizar en 3 ocasiones sucesivas las muestras procedentes del eluato de la

EXPERIMENTO	VELOCIDAD DE CONVERSION DE LNG A 5 alfa LNG EN nmol/g de proteína/hora de incubación
CONTROL (sin homogeneizado)	-
1	7.6
2 [T] en exceso	2.4

TABLA 1. Velocidad de conversión LNG-³H a 5 alfa LNG-³H por el homogeneizado de órgano del flanco del hámster hembra incubado in vitro por una hora a 37 °C, 1 en ausencia ó 2 en presencia de una concentración 10 veces mayor de testosterona (T) en el medio de incubación.

EXPERIMENTO N°	RECRISTALIZACIONES SUCCESIVAS. A.E (³ H) dpm/mg.
1	C ₁ 462 C ₂ 269 C ₃ 200 AM ₃ 274
2	C ₁ 310 C ₂ 302 C ₃ 273 AM ₃ 430

TABLA 2. Datos de recristalización del compuesto aislado, 5 alfa LNG, del homogeneizado del órgano del flanco del hámster hembra incubado in vitro en presencia de LNG ³H o LNG ³H + T en exceso de 10 X.



GRAFICA I. METABILISMO in vitro DEL LNG

zona cromatográfica correspondiente a 5 alfa LNG , con la adición del mismo compuesto radioinerte en los 2 experimentos realizados.

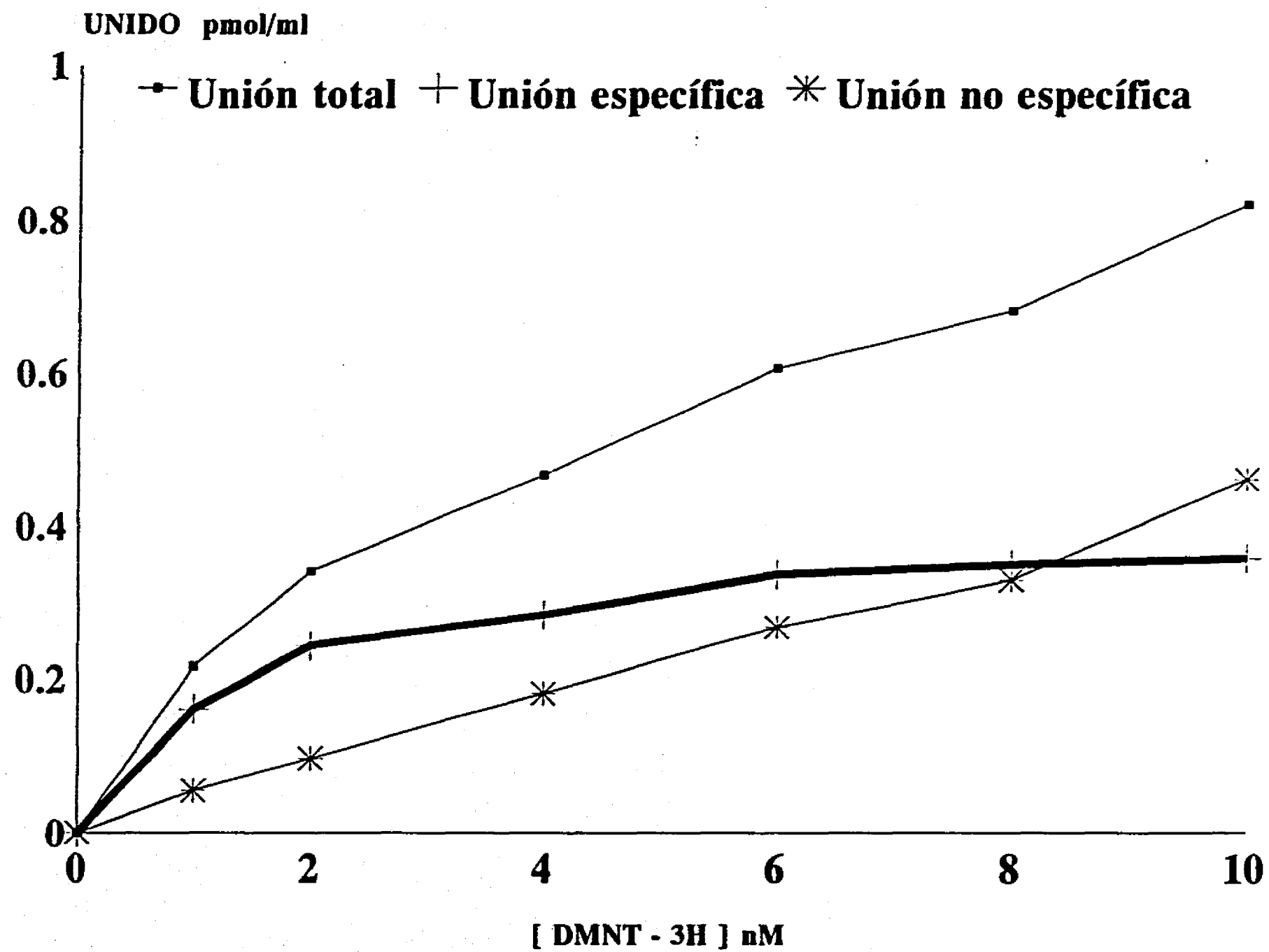
CURVA DE SATURACION DEL RECEPTOR DE ANDROGENOS.

La Gráfica 2 a muestra la curva de saturación del receptor citosólico de andrógenos obtenido de homogeneizado de OF de hámster macho castrados con DMNT - ^3H . El análisis de la curva por el método de Scatchard, (Gráfica 2 b) muestra un receptor con alta afinidad y baja capacidad de unión a la miboleron marcada en esta glándula. Los valores para K_d y B_{max} fueron de 1.38 nM y de 0.42 nM respectivamente.

ANALISIS POR INHIBICION COMPETITIVA.

El análisis por inhibición competitiva se muestra en la Gráfica 3. La adición de DMNT, DHT, LNG, 5 alfa LNG y P_4 radioinertes en concentraciones crecientes, produjo diferentes grados de desplazamiento de la DMNT - ^3H del receptor de andrógenos del citosol obtenido de OF de hámster machos.

El competidor más potente por los sitios de unión al receptor después de la DMNT, $K_i = 6.1$, fue la DHT con un valor para $K_i = 7\text{nM}$. El 5 alfa LNG y el LNG también inducen un desplazamiento significativo como lo muestran sus valores para K_i de 18 nM y 20 nM respectivamente para cada compuesto mientras que la P_4 , resultó ser un competidor ineficaz. El orden de afinidad para el receptor de andrógenos por los compuestos esteroides fue 5 alfa DHT > 5 alfa LNG > LNG.



GRAFICA 2a. CURVA DE SATURACION DEL RECEPTOR DE ANDROGENOS.

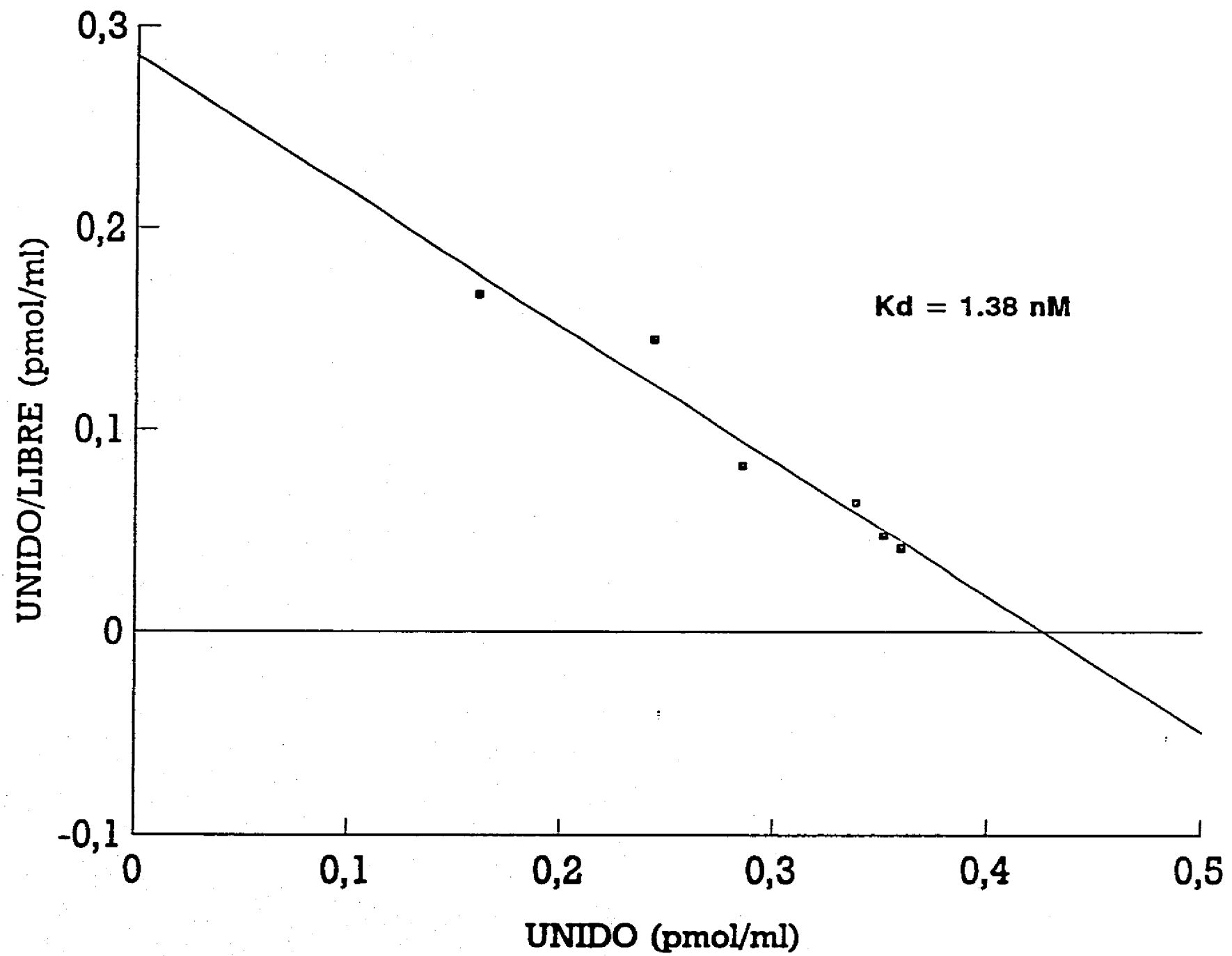


FIGURA 2 b. GRAFICA DE SCATCHARD. Curva de Saturación de receptores citosólicos.

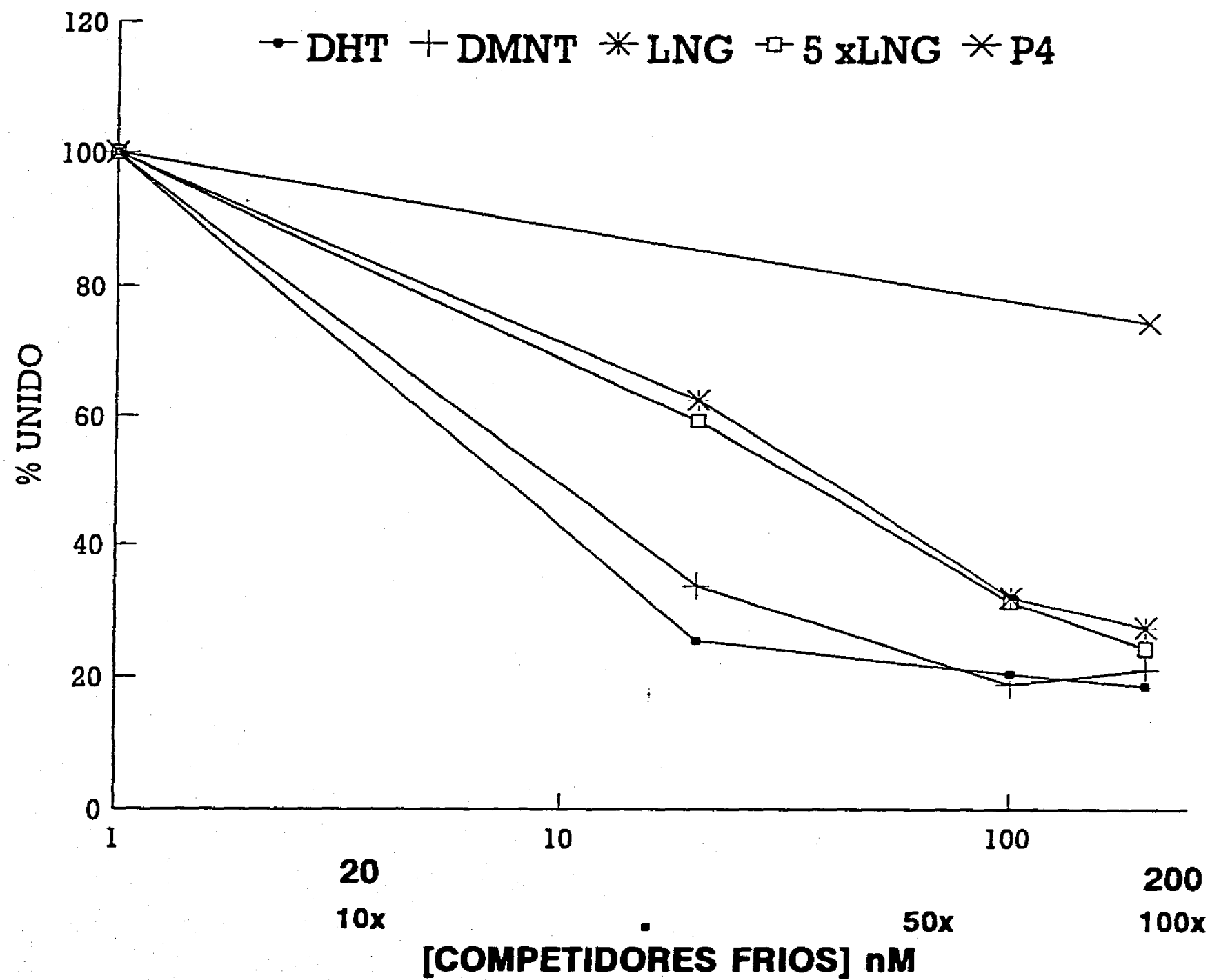


FIGURA 3. CURVA DE DESPLAZAMIENTO DE ESTEROIDES RADIOINERTES. RECEPTORES DE ANDROGENOS DEL OF.

DETERMINACION DEL CONTENIDO DE GRASA DE LAS GLANDULAS DEL FLANCO DEL HAMSTER DURANTE EL CICLO ESTRAL.

Los resultados que se observaban al comparar el contenido de lípidos en las diferentes etapas del ciclo estral se muestran en la Tabla 3 . La diferencia entre el contenido de lípidos entre los OF derechos e izquierdos no es significativa, mientras que existe una diferencia significativa en el contenido de lípidos entre el estro y el diestro, esta no es tan clara entre el proestro, metaestro y estro. El orden de contenido de lípidos en las diferentes etapas del estro fue: estro > metaestro > proestro > diestro.

TRATAMIENTO *IN VIVO* CON T, LNG y 5 alfa LNG.

Los resultados del tratamiento *in vivo* se muestran en la Tabla 4. El LNG produjo un aumento en el porcentaje del diámetro de la mancha, así como del número de folículos pilosos, en forma semejante a la T, al igual que el contenido de lípidos, cuando éstos se cuantifican por glándula bajo el criterio de Cassidy et al (66). Los resultados muestran que la T+LNG, aumentan el contenido de lípidos de los OF en la misma forma que cada tratamiento por separado; sin embargo, no se observa un efecto sumatorio, lo que sugiere un mecanismo de acción semejante para los 2 esteroides.

El 5 alfa LNG, aplicado tópicamente durante 5 semanas, no altera significativamente el tamaño de la mancha pigmentada del OF, ni aumenta el número de folículos pilosos ; sin embargo disminuye el contenido de lípidos cuando se compara con su control (glándula izquierda). Cuando se combina con la T, no parece contrarrestar el efecto de ésta sobre la pigmentación y el número de folículos pilosos; pero disminuye considerablemente el contenido de lípidos (Tabla 4).

ETAPA DEL CICLO	CONTENIDO DE LÍPIDOS EN $\mu\text{g}/\text{mg}$ DE GLÁNDULA	
	GLÁNDULA DERECHA	GLÁNDULA IZQUIERDA
PROESTRO	324 \pm 69	283 \pm 98
ESTRO	400 \pm 26	432 \pm 23
METAESTRO	372 \pm 12	362 \pm 2.2
DIESTRO	208 \pm 82	221 \pm 103

TABLA 3. Contenido de lípidos de los OF del hámster hembra durante el ciclo estral. La prueba de X^2 muestra que no existe diferencia significativa entre las glándulas derechas e izquierdas y la Schaffe indica que existe una diferencia significativa entre el estro y el diestro, pero no existe una diferencia tan marcada entre proestro, metaestro y estro.

TRATAMIENTO *IN VITRO* CON T, LNG Y 5 alfa LNG.

Los resultados de la incubación *in vitro*, se presentan en la Tabla 4. El tratamiento con 5 alfa LNG, disminuye el porcentaje de incorporación de glucosa marcada a lípidos en comparación con su control en estas condiciones; el tratamiento con 5 alfa LNG junto con T, disminuye el porcentaje de incorporación aumentado por la testosterona, cuando se comparan estos 2 experimentos . Cuando las glándulas fueron tratadas con LNG junto con la testosterona , el porcentaje de incorporación disminuye si se comparan los tratamientos por separado, lo que sugiere que la T y el LNG tienen un mecanismo de acción semejante, mientras que el 5 alfa LNG parece tener otro tipo de mecanismo de acción sobre los órganos del flanco del hámster hembra.

GRUPO EXPERIMENTAL	PORCENTAJE DE AUMENTO EN LOS ORGANOS DEL FLANCO		
	DIAMETRO DE LA MANCHA (mm)	CONTENIDO DE LIPIDOS (mg/glándula)	INCORPORACION DE GLUCOSA U-14C (pmol/glándula/hora)
CONTROL NO TRATADO	2.7 ± 0.30 *	5.9 ± 0.94 *	1.66 ± 0.19 *
	100%	100%	100%
T	80%	12%	27%
LNG	20%	13%	21%
5 alfa LNG	3%	-14%	-22%
T + LNG	35%	14%	6%
T + 5 alfa LNG	70%	-7%	0%

TABLA 4. Porcentaje de aumento de 3 parámetros diferentes de los órganos del flanco del hámster hembra tratados diariamente por 15 días con 5 µg de los esteroides.

* Los valores indicados representan los obtenidos para el control ± SD y fueron considerados como el 100% para propósitos de comparación.

DISCUSION.

Los experimentos que se llevaron a cabo, fueron con la finalidad de esclarecer el papel de la T y el efecto del LNG en los dos mecanismos de acción molecular propuestos para el modelo del OF.

Los resultados muestran las siguientes evidencias:

1. En el OF, el LNG se reduce a 5 alfa LNG, compitiendo con la T por los sitios de unión a la 5 alfa reductasa presente en este tejido (7), como lo muestra el resultado del experimento 2 (Tabla 1 y Gráfica 1).

2. La DMNT así como la DHT radioinertes en concentraciones crecientes son capaces de inhibir la unión de la DMNT- ^3H al receptor de andrógenos en forma competitiva como lo muestran sus valores de K_i de: 5.7 y de 6.6 respectivamente.

El LNG y el 5 alfa LNG radioinertes en concentraciones crecientes, también producen una inhibición en la unión de la DMNT - ^3H al receptor de andrógenos, como lo muestran sus valores de K_i de 20.4 y 18.4 respectivamente; sin embargo, en la Gráfica 3 puede observarse que estas curvas tienen una pendiente que no es paralela, a la que muestra la curva de inhibición utilizando a la DMNT radionerte que es idéntica a la marcada con ^3H . Este dato indica que no tienen relativa afinidad de unión, por lo que no se trata de un mecanismo inhibitorio competitivo, sino de uno no competitivo, que puede deberse a varias causas, por ej. : a la precipitación o desnaturalización del receptor provocada por el inhibidor, o bien a que el inhibidor se une a un segundo sitio del receptor y en esta forma altera su sitio activo (52).

3. El tratamiento *in vivo* con esteroides por 5 semanas al OF, muestra que la T aumenta el diámetro de la mancha pigmentada así como el número de folículos

pilosos únicamente con 5 μg , mientras que el OF no tratado no muestra dicho aumento. También aumenta la contenido de grasa por mg de glándula en el OF tratado.

5 μg de LNG diariamente por 5 semanas, produjeron un aumento en el diámetro de la mancha y en el número de folículos pilosos en el OF tratado al igual que en el porcentaje de lípidos por glándula.

5 μg de 5 alfa LNG diariamente por 5 semanas, no alteran significativamente el porcentaje de aumento del diámetro de la mancha en el órgano del flanco tratado, mientras que disminuyen el porcentaje de lípidos contenidos en este órgano. Estos datos muestran una respuesta diferente en cuanto al tamaño de la mancha y desarrollo de los folículos pilosos del OF se refiere. Mientras que el LNG produce un efecto semejante al de la T sobre estos 2 parámetros, el efecto del 5 alfa LNG es diferente. Estos datos podrían explicarse comparando estos resultados con los obtenidos por Wright y sus col. en piel humana. Estos autores demostraron que la 5 alfa dihidroprogesterona, que se forma a partir de la 5 alfa reducción de la progesterona (P_4), interactúa con el receptor de dihidrotestosterona; pero sin producir efecto androgénico (71).

Por otro lado, ha sido reportado que el 3 alfa androstandiol es capaz de producir un efecto semejante al de la testosterona sobre los parámetros antes descritos en el OF, mientras que el 3 β androstandiol no tiene actividad androgénica (68), debido a que al metabolizarse, este compuesto forma otros muy polares que carecen de dicho efecto. Mientras que en la piel humana el 3 β androstandiol tiene un comportamiento metabólico diferente (68) al observado para el OF.

Es probable que el 5 alfa LNG sea convertido a 3 alfa ó 3 β LNG por la 3 alfa y 3 β hidroxisteroide- deshidrogenasa, que ha sido descrita en en este tejido en trabajos anteriores (68).

Si esto fuera correcto, entonces en la piel humana este compuesto podría no tener un efecto; sin embargo hemos demostrado que el tratamiento tópico con LNG al 5% diariamente durante 10 semanas, mejora el acné en piel humana (20), este mecanismo probablemente se deba a que el LNG o sus metabolitos actúen disminuyendo la densidad del retículo endoplásmico, ya que se ha visto que la cantidad de lípidos disminuye con este compuesto.

Otro mecanismo podría ser a través de la regulación de los receptores de membrana que activan el sistema de la adenilato ciclasa, por la T o sus metabolitos, esta idea se basa en los datos informados por Xu y col. (69) que muestran que la T aumenta el número de receptores β adrenérgicos en el tejido adiposo. Asimismo, se ha informado de la existencia de receptores de membrana en la epidermis y estas estructuras se han relacionado con la activación de la adenilato ciclasa, mecanismo que se encuentra aumentado en padecimientos como la psoriasis, en el que los receptores β adrenérgicos se encuentran considerablemente aumentados (70).

Por otro lado, existe el hecho de que la cantidad de sebo en la piel de individuos con deficiencia de 5 alfa reductasa es igual a la cantidad contenida en la piel de individuos normales . Asimismo ha sido reportado, que la piel de individuos normales tratados con finasteride, un compuesto que tiene alta afinidad por la 5 alfa reductasa II, y que la inhibe, contiene la misma cantidad de sebo que la de los individuos normales no tratados (72). Estos datos sugieren 2 posibilidades: la primera, que la presencia de una isoenzima (la 5 alfa reductasa I) es la responsable de la actividad

androgénica en la piel, y la segunda, que el mecanismo de acción androgénico en este tejido es semejante a aquel observado para el tejido adiposo (69).

BIBLIOGRAFIA.

1. Flamigni C. Androgen metabolism in human skin . J. Clin. Endocrinol. 32 (1971) 737-743.
2. Price, V.H. Testosterone metabolism in the skin. Arch. Dermatol. 111 (1975) 1396-1502.
3. Strauss J; Kligman, AM; Pochi M:D. The effect of androgens and estrogens on human sebaceous glands. J. Invest. Dermatol. 39 (1963) 139-155.
4. Bazzano GS and Reisner RM. Steroid pathways in sebaceous glands. J. Invest. Dermatol. 62 (1974) 211-216.
5. Hay, JB and Hodgins, MB. Metabolism of androgens by human skin in acne. Br. J. Dermatol. 91 (1974) 123 - 128.
6. Bonne C; Saural JH; Chivot M; Lehuchet D. Androgen receptor in human skin. Br. J. Dermatol. 97 (1977) 501 - 503.
7. Takayasu S; Adachi K. The *iv vivo* and *in vitro* conversion of testosterone to 17 β - hydroxy - 5 alfa androstan - 3 - one (DHT) by the sebaceous gland of hamsters. Endocrinology 90 (1972) 73 - 80.
8. Pochi PE; Strauss JS; Rao GS . Plasma testosterone and estrogen levels, urinary testosterone excretion, and sebum production in males with acne vulgaris. J. Clin. Endocrinol. 25 (1965) 1660.

9. Voigt W; Fernández EO; and Hsia SL (1970). Transformation of testosterone into 17 β - hydroxy - 5 alfa androstan - 3 - one by microsomal preparations of human skin. *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 5594 - 5599.
10. Hsia SL and Voigt W. Inhibition of DHT formation: an affective means of blocking androgen action in hamster sebaceous glands. *J. Invest. Dermatol.* 62 (1974) 224- 227.
11. Hodgins MB and Hay JG. Steroid metabolism in human skin. Steroid metabolism in human skin it's relation to sebaceous glands growth and acne vulgaris. *Bioch. Soc. Trans.* 4 :4 (1976) 605 - 609.
12. Liang T; Ramusson GH, Brooks JR. Biochemical and biological studies with 4-aza - steroidal 5 alfa reductase inhibitors. *J. Steroid Blochem.* 19 (1983) 385 - 390.
13. Mauvais - Jarvis P; Kutten F and Baudot N. Inhibition of testosterone conversion to DHT in men treated percutaneously by progesterone. *JCE & M* 38:1 (1974) 142 - 147.
14. Wright F; Kerchhoffer MO; Mauvais Jarvis P. Antagonist action of dihydrotestosterone on the formation of specific dihydrotestosterone cytoplasmic receptor complex in rat ventral prostate. *J. Steroid Blochem.* 10 (1979) 419 - 422.
15. Janne OA; Bardin CW. Androgen and anti-androgene receptor binding. *Ann. Rev. Physiol.* 46 (1984) 107 - 118.
16. Luderschmidt CHR; Jawny J; Eiermann W. Competitive inhibition of cyproterone acetate and 17 alfa propylmesterolone at the androgen receptor. *Arch. Dermatol. Res.* 275 (1983) 276.

17. Ferrari RA; Chakarabaty K; Beyler AL; Wilard J. Supression of sebaceous gland development in laboratory animals by 17 alfa propyltestosterone. J. Invest. Dermatol. 71 (1978) 320 - 323.
18. Brooks JR; Primka RL; Berman Ch; Krupa DA; Raynolds GF and Rasmusson GH. Topical anti - androgenicity of a new 4 - azasteroid in the hamster . Steroids 56 (1991) 428 - 433.
19. Kloosterber CA; Vank - Noordegraaf J and Turpijm EW. Selectivity in progesterone and androgen receptor binding of progestagens used in oral contraceptives. Contraception 38: 3 (1988) 326 - 333.
20. Cabeza M; Vargas E; García B. Obtención y efecto de un medicamento tópico antiacné a base de hormonas esteroides. Rev. Mex. Cien. Farm. 15:4 (1985) 29 - 36.
21. Cabeza M; Jaimes R. Acción antiandrogénica del levonorgestrel en el órgano del flanco del hámster hembra. Rev. Mex. Cien. Farm. 17 :2 (1986) 30 - 36.
22. Bouton MM; Lacaque D; Secchi J and Tournemine C. Effect of a new topically active antiandrogen (RU 3882) on the rat sebaceous gland: comparison with cyproterone acetate. J. Invest. Dermatol. 86:2 (1986) 163 - 168.
23. Bouton MM; Jaques J; Pierdent A: United States Patent n^o 4,446,971 (1984).
24. Morales - Alanís H; Brienne MJ; Jacques J; Bouton MM; Nédélic L; Torrelli V; Tournemine C. Antiandrogens activity of a series of des - A - steroid derivates. J. Med. Chem. 28 (1985) 1796 - 1803.

25. Luhuchet - Ceryac D; Weber - Buisset MJ; Saurat JH. Reduction de l' excretion sébacée et amelioration de l'acné chez des pstientes traitées par l'association acétate de cyproterone - ethynyl - estradiol. Ann. Dermatol. Venerol. (Paris) 108 (1981) 861 - 868.
26. Edgrin RA; Jones RC; Clancy DP and Nagra CL. The biological effects of norgestrel alone and in combination with ethinyl oestradiol. J. Reprod. Fert. Suppl. 5 (1968) 13 - 45.
27. Fotherby K. Metabolism of synthetic steroids by animals and man. Meet. of Pharm mod. to assess toxicity and side effects of fert. reg. agents. Geneva, 17 - 20. Sep. 1973.
28. Stanczyk FZ and Roy S. Metabolism of levonorgestrel norethindrone and structurally related contraceptive steroids. Contraception 42 :1 (1990) 67 - 96.
29. Barranco VP; Jones DD. Effect of oral contraceptive on acne. South. Med. J. 67: 6 (1974) 703 - 706.
30. Price VH. Testosterone metabolism in the skin. Arch Dermatol. 111 (1975) 1496 - 1502.
31. Hammerstein J. Use of cyproterone acetate (CPA) in the treatment of acne, hirsutism and virilism. J. Steroid Biochem. 6 (1975) 827 - 836.
32. Hamilton JB and Montagna W. The sebaceous glands of the hamster. Morphological effects of androgens on integumentary structures. Am. J. Anat. 86 (1950) 191 - 233.

33. Takayasu S and Adachi K. Hormonal control of metabolism in hamster contovertebral glands. *J. Invest. Dermatol.* 55:1 (1970) 13 - 19.
34. Adachi K. Receptor proteins for androgens in hamster sebaceous glands. *J. Invest. Dermatol.* 62 (1974) 217 - 223.
35. Goos CMAA; Wirtz P; Vermorken AJM; and Mauvais - Jarvis P. Androgenic effect of testosterone and some of its metabolites in relation to their in relation to their biotransformation in the skin. *Br. J. Dermatol.* 107 (1982) 549 - 557.
36. Frost P and Gómez EC Inhibition of sex hormones: Development of experiential models In: *Advances in Biology of Skin. Vol XII. Pharmacology and the skin* (ed. by Montagna W, Van Scott, E:J. and Stoughton R. B:J: Appleton - Century Crofts, New York (1972) 403 - 420.
37. Clanachan M; Devitt H; Foreman MI; Picton W. An alternative pharmacological approach to the detection of antiandrogenic drugs for acne therapy. *Br. J. Dermatol.* 112: 3 (1985) 329.
38. Voigt W and Hsia LS. The antiandrogenic action of 4 - androsten - 3 one - 17 β carboxilic acid and its methyl ester on hamster flank organ. *Endocrinology* 92 (1972 b) 1216.
39. Lemus AE; Vilchis F; Damsky R; Chávez BA; Grillesca I and Pérez Palacios G. Mechanism of action of levonorgestrel: *in vitro* metabolism and specific interactions with sterold receptors in target organs. *J. Steroid Blochem. and Molecular Biology.* 41 :3 -8 (1992)881 - 890.

40. Anderson S; Bishop RW, Russell DW. Expression cloning and regulation of steroid 5 alfa reductase, an enzyme essential for male sexual differentiation. *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 16249 - 16255.
41. Anderson S; Bergman DM; Jenkins EP; Russell DW. Deletion of steroid 5 alfa reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* 354 (1991) 159 - 161.
42. Jenkins EP; Anderson S; Imperato - Mc Ginley J; Wilson JD; Russell DW, Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5 alfa reductase. *J. Clin. Invest.* 89 (1992) 293 - 300.
43. Anderson S and Russell DW. Structural and Biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 alfa reductases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 3640 - 3644.
44. Jenkins EP; Hsieh CL; Melatovich A; Normington K; Berman DM; Francke U; Russell DW. Characterization and chromosomal mapping of human 5 alfa reductase gene and pseudogene and mapping of the mouse homologue. *Genomics* 11 (1991) 1102 - 1112.
45. Labrie F; Sugimoto Y; Luthe U; Simard J; Lachance J; Bachvarov D; Leblanc G; Durocher F and Paquet N. *Endocrinology* 13: 13 (1992) 1571 - 1573.
46. Jenkins EP; Anderson S; Imperato - Mc Ginley J; Wilson JD and Russell D. Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5 alfa reductase. *J. Clin. Invest.* 89 (1991) 293 - 300.

47. Brooks JR; Baptista EM; Berman C; Ham EA; Hichens M; Johnson DBR; Primka RL; Rasmusson GH; Reynolds GF; Schmitt SM & Arth GE. *Endocrinology* 109 (1981) 830 - 836.
48. Gaub MP; Bellard M; Scheuer I; Chamborn P and Sassone - Corsi P. Activation of the ovoalbumin gene by the estrogen receptor involves the Fos - Jun complex, *Cell* 63 (1990) 1267 - 1275.
49. Morgan JI and Curran T. Proto - oncogene transcription factors and epilepsy. *TIPS* 12 (1991) 343 - 349.
50. Diamond MI; Miner JN; Yoshinaga SK and Yamamoto KR. Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science* 249 (1990) 1266 - 1270.
51. Landers JP and Spelsberg TC. New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto oncogenes and cascade model for steroid regulation of gene expression. *Critical Reviews in eukaryotic gene expression* 2:1 (1992) 19 - 63.
52. Clark JH; Schrader WT; O'Malley BW. Mechanisms of steroid hormone action. In: *Textbook of Endocrinology* edited by Wilson and Foster 17a Ed. Pergamon Press. New York (1985) 33 - 75.
53. Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY. Acad. Sci.* 52 (1949) 660 - 672.
54. Chang YC and Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50

percent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmac.* 22 (1973) 3099 - 3108.

55. Campbell JA; Lyster SC; Duncan GW and Babacock JC. 7 alfa methyl - 19 - nor steroids: A new class of potent anabolic, androgenic hormones steroids . *Steroids* 1 (1963) 317 - 324.

56. Segaloff A. The enhanced local androgenic activity of 19 - nor steroids and stabilization of their structure by 7 alfa and 17 alfa methyl substituents to highly potent androgens by any route of administration. *Steroids* 1 (1963) 299 - 315.

57. Segaloff A. Alteration of hormonal balance in the treatment of mammary cancer. *Proc III Nat'l Cancer Conf.* (1957) 257 - 264.

58. Agarwal AK; Monder C. *In vitro* metabolism of 7 alfa methyl - 19 - nortestosterone by rat liver, prostate and epididymis. *Endocrinology* 123 (1988) 2187 - 21093.

59. Kumar N; Didolkar AK; Monder C; Bardin W and Sundaram K. The biological activity of 7 alfa methyl - 19 - nortestosterone. Is not amplified in male reproductive tract as is that of testosterone. *Endocrinology* 120 :6 (1992) 3677 - 3683.

60. Still AC; Kahan M and Mitra A : A rapid chromatographic technique for preparative separation with moderate resolution. *J. Org. Chemistry* 43 (1978) 2923 - 2925.

61. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochem.* 72 (1976): 248 - 254.

62. American Assoc. for lab Animal Science. Manual of laboratory animal techniques. USA. Dec. 1 (1979) 67 - 73.
63. Combetes C; Durand - Seme; Querleux D; Saint - Leger D; Leveque JL. Imaging the hamster flank organ by an ultrasonic technique: a new approach to animal test. Br. J. Dermatol. 121 (1989) 689 - 699.
64. García - Salnz A; Amador AG; Piña E and Chagoya de Sánchez V. Lipogenic action of cycloheximide on the rat epididymal fat pad. Biochem Pharmacol 24 (1975) 891 - 897.
65. Folch J and Lees MA. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem. 226 (1957) 497 - 509.
66. Cassidy DM; Lee MF; Laker MF; Kealey T. Lipogenesis In Isolated human sebaceous glands. FEBS LETT 1986; 200: 173 -176.
67. Vermorken AJM; Goos CMAA and Wirtz P. Evaluation of the hamster flank organ test for the screening of anti-androgens. Br. J. Dermatol. 106 (1982) 99 - 101.
68. Goos CMAA; Wirtz P; Vermorken AJM and Mauvais- Jarvis P. Androgenic effect of testosterone and some of its metabolites in relation to their biotransformation in the skin. Br. J. Dermatol. 107 (1982) 549- 557.
69. Xu X; De Pergola G and Bjorntorp P. The effect of androgens on the regulation of lipolysis in adipose precursor cells. Endocrinology 126 (1990) 1229 - 1233.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

70. Adachi K; Holperin KM; Takeda J; Nemoto O; Aoyagi T; Iizuka H; Yoshicawa K and Levine V. Epidermal surface receptors which link pharmacological mediators to the adenylate cyclase system. *Br. J. Dermatol.* 107 suppl 23 (1982) 111 - 118.

71. Wright F, Giacomoni M. and Kerchhoffer M.O. Antiandrogenic activity of progesterone in human skin. Percutaneous absorption of steroids. International Symposium, Paris, April 1979.

72. Imperato-McGinley J; Gautier T; Cai LI-Q; Yee B; Epstein J; Pochi P. The androgen control of sebum production. Studies of subjects with dihydrotestosterone deficiency and complete androgen insensitivity. *J. Clin. Endocrinol.* 72 (1992) 524-528.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

XXXXXXXXXXXXXXXXX FAX 525 5500048
CIUDAD UNIVERSITARIA
04510 MEXICO, D.F. TEL 525 6223850

Ciudad Universitaria, DF., a 29 de octubre de 1993

Maestra Marisa Cabeza S
Dr. Lino Diaz de León
Presente

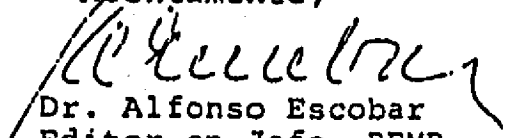
Estimados Colegas:

Me es grato informarles que su trabajo EVALUATION OF LEVONORGESTREL ACTION ON THE FLANK ORGAN AND SEBACEOUS GLAND LIPOGENESIS OF FEMALE HAMSTERS que nos enviaron en su versión corregida ha sido aceptado para publicación en el BOLETIN DE ESTUDIOS MEDICOS Y BIOLOGICOS.

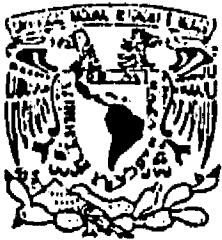
El árbitro designado recomienda, y ha hecho los señalamientos correspondientes, que el "Abstract" sea modificado y ordenado de acuerdo con la secuencia que él ha señalado. Asimismo, recomienda que el texto en Inglés sea revisado cuidadosamente para evitar las faltas como las que aparecen también señaladas en la introducción. Editorialmente se recomienda que las REFERENCIAS se modifiquen de acuerdo con las indicaciones que se han hecho y se corrijan las faltas y omisiones en algunas de ellas. Asimismo, se recomienda que la palabra TEST sea eliminada del título del trabajo ya que resulta innecesaria.

Quedo en espera de la versión modificada de su trabajo. Cualquier aclaración a estas recomendaciones favor de llamarme y les atenderé con gusto.

Atentamente,


Dr. Alfonso Escobar
Editor-en-Jefe, BEMB

c.c.p.: Dr. Librado Ortiz-Ortiz, Director, IIBM, UNAM



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

APARTADO POSTAL 70228
CIUDAD UNIVERSITARIA
04510 MEXICO, D.F.

Noviembre 9 de 1993


DR. ALFONSO ESCOBAR
EDITOR EN JEFE
BOLETIN DE ESTUDIOS
BIOMEDICOS Y BIOLOGICOS.
P R E S E N T E

En relación al trabajo intitulado "Evaluation of levonorgestrel action on the flank organ and sebaceous gland lipogenesis of female hamsters", que fue aceptado por la revista que Ud. edita y que nos fue remitido con diversas observaciones, me permito comunicar a usted que las correcciones fueron realizadas a fin de que el artículo sea de su entera satisfacción para ser publicado en el Boletín de estudios Biomédicos y Biológicos.

Junto con esta carta le estoy enviando el trabajo anterior así como la carta en donde se anotaron las correcciones a seguir .

Sin otro particular agradezco la atención que se sirva prestar a la presente.

ATENTAMENTE


DR. LINO DIAZ DE LEON HERNANDEZ
SECRETARIO ACADEMICO DEL INSTITUTO
DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

*Recibi Original
17/11/93
Alfonso*

EVALUATION OF LEVONORGESTREL ACTION ON THE FLANK ORGAN AND THE
SEBACEOUS GLAND LIPOGENESIS OF FEMALE HAMSTERS.

MARISA CABEZA, (1) LINO DIAZ DE LEON . (2)

(1) DEPARTMENT OF BIOLOGICAL SYSTEMS
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
(XOCHIMILCO), MEXICO CITY, MEXICO.

(2) DEPARTMENT OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY,
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
UNAM, MEXICO CITY, MEXICO.

CORRESPONDENCE TO:

MARISA CABEZA S, M. Sc.

DEPTO. DE SISTEMAS BIOLOGICOS.

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA. XOCHIMILCO.

CALZADA DEL HUESO # 1100.

COL. VILLA QUIETUD.

C.P. 04860.

MEXICO, D.F.

ABSTRACT.

The role of testosterone and levonorgestrel action on the flank organ by measuring sebaceous gland lipogenesis of female hamsters by the metabolic incorporation of ^{14}C glucose were investigated. Also, a partial characterization of the radiolabeled lipid fraction was obtained.

The effects of in vivo steroids administration were evaluated by ^{14}C -U-glucose metabolic incorporation into lipids by the female hamster flank organs in culture conditions, in the presence or absence of LNG and/or T in the incubation medium. The radioactive lipids were identified by thin layer chromatography.

Levonorgestrel alone or together with testosterone on female hamster flank organs decreased the organ weight and sebum content compared with T - treatment alone. In culture conditions, a rapid and significant increase of radiolabeled glucose was observed with T. By contrast when LNG was present in the incubation medium, no differences in ^{14}C -U- glucose incorporation were observed when compared with their controls. When T+LNG were added, a similar result to the obtained when using LNG alone was determined. Testosterone increased glycerides and free fatty acids but decreased polar lipids; whereas LNG did not have any effect in the relative proportions of ^{14}C -U glucose incorporated into the different classes of lipids, when it was compared with their controls.

The results indicated that LNG abolished the increasing effect of ^{14}C glucose incorporation caused by T and changed the lipid composition induced on female hamsters flank organs.

INTRODUCTION.

There is evidence about the ability of testosterone on the incorporation of radiolabeled metabolic precursors into lipids in the skin. For example, in the mouse prepuce testosterone (T) induces sebaceous glands lipogenesis from ^{14}C - glucose (1). Also, in some androgen dermatologic disorders like acne, an increased lipid synthesis has been determined from ^{14}C glucose in the skin in both, dermis and epidermis (2). In male hamster's flank organs, lipid synthesis from 1, ^{14}C acetate in vivo and in vitro, has been reported, with a decrease in its biosynthesis upon castration (3). These findings and others, resulted in the searching of molecules with antiandrogenic properties (4-9) to improve acne without colateral effects. In this sense, several reports showed that steroids with a ketone group in C_{17} or C_{20} positions are capable to reduce lipid synthesis from glucose in the skin (10 - 12). On the other side, it is known that the synthetic steroids, 17 alpha-methyl-beta nortestosterone (13) and D (1) - 13 beta ethyl - 17 beta hydroxygon - 4 -en -3 one, levonorgestrel (LNG) (14), also inhibit sebum production stimulated by androgen in animal and human skin (14, 15).

The flank organ test has been used for screening of compounds with antiandrogenic activity (16). Hamster flank organs are structures which consist of sebaceous tissue. The organs appear to the naked eye as circumscribed pigmented areas. Like the sebaceous glands in humans and other species, the flank organ is androgen dependent (17, 18) and is capable of lipogenesis from labeled acetate (3, 19) and glucose

(20). In this test , the diameter of the pigmented area is used to evaluate androgenic or antiandrogenic effects of an applied drug (21).

In the present study we have evaluated , the role of testosterone, levonorgestrel or both, on the flank organ by measuring sebaceous gland lipogenesis of female hamsters by the incorporation of ^{14}C -U-glucose. Also a partial characterization of the radiolabeled lipid fraction was obtained.

MATERIALS AND METHODS.

Steroids were kindly provided by Proquina de México. The substrate ^{14}C -U-glucose (340 mCi/mmol) was purchased from New England Nuclear Co. (distributed in Mexico by Acceso Lab). Reagents and solvents by Sigma and Merck (Mexico). Adult Syrian golden hamsters (130-150 g) were provided by Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco, México.

The steroid effect on the hamster's flank organs, was tested on 4 groups of 30- 40 animals chosen at random each one. The animals were kept in a room, maintained at constant temperature of 22° C, with light-dark periods of 12 h. and with food and water *ad libitum*.

FLANK ORGAN TEST .

Both flanks of the animal were shaved with electric clippers before starting the experiment and as needed thereafter. Steroid effects on the hamster right flank organs (treated) were measured following daily topical administration for 15 days (21). The left flank organs of the animals received 50 μl of steroids solvent (I,II,III) and were used as the solvent controls.

Topical applications on the right flank organ are detailed bellow:

- GROUP 1 received 5 μg of testosterone (T) (21).
- GROUP 2 received 5 μg of levonorgestrel (LNG) (15).
- GROUP 3 received 5 μg of T+ 5 μg of (LNG) (15).

A fourth group of animals was kept as an untreated control, receiving only the solvent on the right flank organ. At the end of the treatment, the animals of all groups, were anesthetized with ether and sacrificed. The diameter size of the spots of both glands was measured with a ruler, and then they were excised out and weighed on a balance (Ohaus GA 200).

IN VITRO INCORPORATION OF ^{14}C -U-GLUCOSE INTO LIPIDS.

In order to evaluate the effect of topical administration of steroids on the capacity of in vitro ^{14}C -U- glucose incorporation into hamster's flank organ lipids, glands obtained from animals of each group were divided in two subgroups: One subgroup of glands from 15-20 animals, hormone-treated (1,2,3) and solvent-treated (I, II, III) were separated in 5 sets and placed in Erlenmayer flasks (4 whole glands/flask) , and were incubated in the presence of 3 μCi of ^{14}C -U-glucose (sp. act. 340 mCi/mmol) and 33.34 μ moles of nonradioactive glucose (20, 22) for 2 hours at 37°C in Krebs-Ringer buffer (pH = 6), containing 150 mg of bovine serum albumin in a final volume of 3 ml, in a water bath shaking incubator.

Another subgroup comprised the glands of the remainder 15-20 animals, that were hormone (1,2,3), or solvent-treated (I, II, III). The tissues were incubated as described above, except that steroids were added to the incubation medium, in order to determine their effect over the in vitro ^{14}C -U-glucose incorporation into lipids.

A time course graphic of incorporation of ^{14}C -U- glucose into costovertebral gland lipids *in vitro* was obtained by incubating the right glands of 8 animals with 11.1 mM ^{14}C -U- glucose (20,22).

DETERMINATION OF INCORPORATED RADIOACTIVITY INTO LIPIDS.

Following incubation, the glands were placed (4 glands each) in a vial containing , 5 ml of Folch's solution (23) for 24 hours at room temperature, in a previously tared glass vial in order to extract the lipids . Immediately thereafter, the glands were recovered from the solvent medium. To remove free ^{14}C -glucose, 10 ml of water were added to the organic phase for 12 hours. The aqueous layer was removed by vacuum suction, and the extract was evaporated until dryness. The extracted lipids were weighed in the same extraction vial on a balance and the radioactivity incorporated into them, was determined by counting in a Packard Tri-carb 3390 liquid scintillation spectrometer, using toluene containing 4 g of 2,5-diphenyl-oxazole (PPO) and 50 mg of 1,4 bis- 2-(5-diphenyloxazolyl) benzene (POPOP). The specific activity of the isolated lipids was calculated and expressed as pmols/ mg of gland/hour (24).

IDENTIFICATION OF LIPID CLASSES BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY.

In order to determine the ^{14}C lipid composition of the extracts obtained on three different experiments, these were analyzed by thin layer chromatography according to the method reported by Cassidy et al (24). In short, the samples were processed as follows:

The dried sebaceous lipid extract was redissolved in 100 ul of chloroform/methanol/water (5:2:1, by vol.) and spotted to 20X20 cm, 0.2 cm of silica gel chromatography plates.

Chromatography was developed in solvent 1 (light petroleum 40-60 °C/diethyl ether /acetic acid , 50:50: 1 by vol.), solvent 2 (light petroleum 45-60 °C - benzene, 70:30 by vol) and solvent 3 (light petroleum 40 °C) successively in 3 different directions. The polar lipid separation was effected by cutting the plate 3.5 cm from the base and developing in solvent 4 (chloroform/methanol/acetic acid/water, 25:15: 4: 2 by vol). Each sebaceous gland extract test plate was developed concurrently with a lipid standard plate for comparison purposes.

Radioactive spots on the test plate were located using spark chamber and were cut out, transferred into vials and counted by external standard channels radio method, until 2000 counts per minute (cpm) were collected. Each area of radioactivity corresponded to a lipid standard spot as identified under UV light.

RESULTS*Flank organ test.*

The percentage of increase in the spot diameter, weight and lipid content following daily unilateral applications for 15 days of the steroids on the right gland of female hamsters, are shown in Table 1 and figures 1, 2 and 3. The left flank organs were taken as 100% for reference.

The χ^2 test showed that T-treated right flank organs had a statistically significant increase, in diameter spot size, weight and sebum content, when compared with solvent treated and untreated flank organs. However, no significant increase percentage in any of the three parameters was observed in LNG treated flank organs. By contrast, a decrease of 32% in tissue weight as well as 33% on lipid content was determined when compared with the control groups. The results obtained with the treatment of LNG together with T, demonstrated that the increase percentages in the evaluated parameters, were lower than those obtained with T-treatment alone.

With the purpose of determining whether the application of various steroid stimuli to one flank was local or some applied material could reach the other flank organ through circulation, the left flank organ's parameters and the ^{14}C -U-glucose incorporation into lipids was used as basal measurement values, taking for granted that both glands must have approximately the same weight. Thus, the amount of ^{14}C -U-glucose incorporated into lipids *in vitro* must be constant and any significant changes in these parameters could be attributed to the

in vivo steroid treatment or to the presence of hormone in the incubation medium.

IN VITRO ^{14}C -U-GLUCOSE INCORPORATION INTO LIPIDS BY FEMALE HAMSTER FLANK ORGANS.

The results showed that the optimal level of ^{14}C -U- glucose incorporation into lipids, was obtained after three hours of incubation (Figure 1). The ^{14}C -U- glucose incorporation into lipids, was found to be linear over three hours of incubation (Figure 1) at 0.50 pmol/ mg of gland/hour.

In vitro experiments demonstrated that the rate of ^{14}C -U-glucose incorporated into lipids was increased by T, when it was added to the incubation medium, in both, solvent-treated (Table 2), and hormone treated female hamster flank organs (Table 3). There was a significant difference ($P < 0.001$) when T was added into the incubation medium. However, the in vivo T-treatment did not result in an increase of the ^{14}C glucose uptake, as it would be expected. Nevertheless, there was a significant difference on the amounts of ^{14}C -U-glucose incorporated into lipids between groups I, II, III (Table 2). This result suggests that the effect of the in vivo T-treatment was local.

LNG in the incubation medium did not increase the rate of ^{14}C -U- glucose incorporated into lipids ($P > 0.025$) (Table 2). Whereas in vivo

LNG treatment augmented it (Table 3). The specific activities obtained from LNG-treated flank organs were higher when compared to the solvent-treated glands. The results obtained suggest that LNG increased the uptake of radioactive glucose incorporated into lipids.

Testosterone and levonorgestrel when added together in the incubation medium did not produce any effect in the radioactive glucose incorporation. LNG inhibited the T effect observed, when it was alone in the incubation medium (Table 2). However, the results obtained with the *in vivo* treatment with both steroids together over the *in vitro* $^{14}\text{C-U}$ - glucose incorporation into lipids, showed that it was increased. These results suggest that LNG was the responsible of this action.

Identification of lipid classes by thin layer chromatography.

Table 4 shows that T decreased polar lipids, whereas an increase in glycerids and fatty acids was determined, probably at polar lipid expenses. Also, LNG did not affect the lipid classes when compared with the control. The steroid combination (T + LNG) showed that LNG compensated the polar lipids affected by testosterone and decreased testosterone effect on glycerides.

DISCUSSION.

The finding that the daily topical application of 5 μ g of T increased the diameter size of the pigmented spot on female hamster flank organs, are in agreement with the results reported by Hsia & Voigt (21) and Goos et al. (25). Testosterone also increased the weight and the surface area of sebaceous structure (25), therefore, T administration increased lipid synthesis and content as demonstrated in this study.

According to the results obtained, the *in vivo* T applications did not result in an increase of ^{14}C - glucose uptake, as it would be expected. These results, could be explained by the fact that the *in vitro* experiments showed, a rapid increase of ^{14}C - glucose uptake and it was more pronounced during the first hour of incubation. Therefore, it may be possible that the increase in ^{14}C -U-glucose incorporation occurred immediately after the T treatment. The effect of T administration did not show long term activity, thus no changes in ^{14}C -U-glucose uptake could be determined after the incubation time assayed. This idea is supported by the findings of Bedord et al (3); in their paper it was reported that the castration of male hamsters resulted in an 80% decrease in lipogenesis measured by *in vivo* and *in vitro* techniques. The hamster flank organ incorporation of sodium 1- ^{14}C -acetate *in vivo* reached maximum levels 5 minutes after intraperitoneal injection and the total radioactivity in hamster flank organ lipids remained relatively constant between 40 minutes and 6 hours after the administration of 1- ^{14}C -acetate (3). Another important aspect to be considered, is the presence of progesterone in

the female hamster flank organs that could exert some influence on the results. It had been demonstrated that the simultaneous administration of testosterone and progesterone (P_4) inhibit the stimulatory effect of T on the size of the pigmented spot on female flank organs (16). Therefore, the presence of normal levels of progesterone during the estrus cycle, could inhibit the incorporation of radioactive glucose into lipids during *in vivo* experiments; but in the *in vitro* conditions, the isolated glands would only be influenced by the T-effect alone.

LNG did not present any effect on the studied parameters. These findings should be explained by the fact that this progestin binds progesterone receptors and has progestational actions (26). Thus, its inhibitory effect on weight and lipid content, could be due to a progestational action, whereas LNG applications increased the ^{14}C -U-glucose incorporation into lipids, since specific activity values were augmented in the experimental groups treated with LNG compared to those obtained in the T experiments. This suggests a possible androgenic action of LNG, because it has been demonstrated that LNG binds androgenic receptors too (26).

Another explanation to these findings could be attributed to NADPH-dependent metabolic changes of the LNG molecule occurring inside the cell. It has been reported that LNG is converted to 5 alpha LNG; 3 alpha, 5 alpha tetrahydro LNG and 3 beta, 5 alpha LNG in the nervous system and that this conversion is NADPH dependent (26). Among these metabolites, the 5 alpha LNG has a higher affinity for the androgen

receptor-like LNG molecule. This affinity could produce two effects on the female hamster flank organs: 1) an androgenic effect produced by the LNG molecule, which is reflected in a greater glucose incorporation into lipids than the produced by T. 2) On the other hand, the 5 alpha LNG could block the T effect on both, the sebum accumulation and glucose incorporation into lipids. Since the metabolism of LNG molecules requires the presence of NADPH, and this cofactor was not present in the incubation medium in our experiments, we were not able to determine the "blocking effect" on glucose incorporation into lipids, at the incubation times assayed.

The simultaneous effect of T and LNG application inhibited the stimulatory effect of T on the size of the pigmented spot, its weight and lipid content of female hamster flank organs, as well as the radioactive glucose incorporation into lipids. Both steroids when present in the incubation medium showed similar effects as determined in the *in vivo* experiments. These findings demonstrated that LNG effect occurs at 2 levels in female hamster glands: one that involves progesterone receptors, and another implying androgen receptors. Therefore, the mechanism of action of LNG on androgen receptors is the same as T, because no additive action was observed.

The identified lipids indicated that T action increased glycerides and free fatty acids but decreased polar lipids, whereas LNG did not have any effect in the relative proportions of radiolabeled glucose incorporated into the different classes of lipids. It is possible that LNG effect mainly affects the fatty acids composition, since it had

been reported that some steroids are capable to change the palmitic acid/stearic acid and oleic acid/stearic acid ratios in rat skin sebum (27).

REFERENCES

1. Sansone G , Davidson W , Cummins B , Reisner RM. Sebaceous lipid synthesis induced by testosterone early metabolic events. J. Invest. Dermatol. 1971; 57:144-148.
2. Shuster S, Cooper MF, Mc. Gibbon D , Wilson PD. Epidermal lipid biosynthesis in acne. Br. J. Dermatol. 1980; 103:127-131.
3. Bedord CJ, Ruddle DL , Wagner BM. Hamster costovertebral organolipogenesis *in vitro* and *in vivo* effects of cerulenin. Arch. Dermatol. 1986; 278:486- 490.
4. Ebling FJ. The action of anti-androgenic steroid, 17 alpha methyl-beta noretisterone, on sebum secretion in rats treated with testosterone. J. Endocrinol. 1967; 38:181-187.
5. Ebling FJ. The effects of cyproterone acetate and oestradiol upon testosterone stimulates sebaceous activity in the rat. Acta Endocrinol. 1963; 72:361-367.
6. Green MJ, Tiberi R, Draper RW, Carlon E, Neri RO, Kung TT, Mc Phail AT, Onan KD. Novel 17 alpha-chloro-17 beta sulfinil steroids as specific inhibitors of sebaceous gland activity. Potential antiacne agents. J. Med. Chem. 1983; 26:78-83.

7. Patel S, Noble WC. Analysis of human skin surface lipids during treatment with anti- androgens. *Br. J. Dermatol.* 1987; 117: 735 - 740.
8. Schorder HG, Ziegler KW, Kaufmann J, El Eterly M. Effects of topically applied antiandrogenic compounds on sebaceous glands of hamster ears and flank organs. *J. Invest. Dermatol.* 1988; 92:769-773.
9. Hammerstein J, Meckies I, Rossberg L, Moltz L, Zielske F. Use of cyproterone acetate (CPA) in the treatment of acne, hirsutism and virilism. *J. Steroid. Biochem.* 1975; 6: 827-836.
10. Ziboh VA, Dreiza MA, Hsia SL. Inhibition of lipid synthesis and glucose-6-phosphate dehydrogenase in rat skin by dehydroepiandrosterone. *J. Lipid. Res.* 1970; 11:346-354.
11. Marks PA, Banks J. Carbohydrate metabolic interrelations and control. *J. Natl. Acad. Sci. U.S.* 1960; 46: 447-452.
12. McKerns PA, Kaleita E. Carbohydrate metabolic regulation. *Biochem. Biophys. Research Commun.* 1960; 2: 344-348.
13. Strauss JS, Pochi PE, Sarda IR, Wotiz HH. Effect of oral and topical 17 alpha-methyl-beta nortestosterone on sebum production and plasma testosterone. *J. Invest. Dermatol.* 1969; 52:95-100.

14. Cabeza M, Vargas E, García B. Obtención y efecto de un medicamento tópico anti-acné a base de hormonas esteroides. Rev. Mex. Ciencias Farm. 1985; 15 :4:19-24.
15. Cabeza M, Jaimes R. Acción antiandrogénica del levonorgestrel en el órgano del flanco del hamster hembra. Rev. Mex. Ciencias Farm. 1986; 17:2:30-34.
16. Vermorken AJM; Goos CMAA, Roelofs HMJ. The antiandrogenic effect of progesterone on the hamster flank organ. Br. J. Dermatol. 1980a; 102: 455-460.
17. Takayasu S, Adachi K. The *in vivo* and *in vitro* conversion of testosterone to 17 - beta hydroxy - 5 - alpha - androstan- 3- one (dihydrotestosterone) by the sebaceous gland of hamsters. Endocrinology 1971; 90:73-80.
18. Takayasu S, Adachi K. Hormonal control of metabolism in hamster costovertebral glands. J. Invest. Dermatol. 1970; 55:1: 13-19.
19. Cabeza M, Rojas LM. Composición y síntesis *de novo* de lípidos de la glándula sebácea del hamster hembra. Bioquímica 1990; 15:59: 35-38.
20. Wheatley VR, Leonard T, Hodgins BS, Coon WM. Cutaneous lipogenesis. J. Invest. Dermatol. 1970; 54:4:288-297.

21. Hsia LS, Voight W. Inhibition of dihydrotestosterone formation: An effective means of blocking androgen action in hamster sebaceous gland. *J. Invest. Dermatol.* 1974; 62: 224-227.
22. Hsia LS, Dreize MA, Márquez MC. Lipid metabolism in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 1966; 47: 6: 443-448.
23. Folch J, Lees M, Stanley S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226: 497-509.
24. Cassidy DM, Lee MF, Laker MF, Kealey T. Lipogenesis in isolated human sebaceous glands. *FEBS LETT* 1986; 200 : 173-176.
25. Goos CMAA, Wirtz P, Vermorken AJM, Mauvais - Jarvis P. Androgenic effect of testosterone and some of its metabolites in relation to their biotransformation in the skin. *Br. J. Dermatol.* 1982; 107: 549 - 557.
26. Lemus AE, Vilchis F, Damsky R, Chávez BA, Grillesca I, Pérez Palacios G. Mechanism of action of levonorgestrel: *in vitro* metabolism and specific interactions with steroid receptors in target organs. *J. Steroid Biochem. Mol. Biology.* 1992; 41: 881-890.
27. Nugteren DH, Christ-Hazelhof E, Van der Beek H, Houstsmuller UMT. Metabolism of linoleic acid and other essential fatty acids in

Cabeza, M Levonorgestrel action on lipogenesis.

21

the epidermis on the rat. Biochim. Biophys. Acta 1985; 834: 429 -
434.

FIGURE 1. Flank organ of a 4 week old female hamster treated with testosterone : 5 μ g were applied daily to the right organ for 15 days, while the left organ received solvent alone.

FIGURE 2. Flank organ of a 4 week old female hamster treated with levonorgestrel: 5 μ g were applied daily to the right organ for 15 days, while the left organ received solvent alone.

FIGURE 3. Flank organ of a 4 week old female hamster treated with testosterone + levonorgestrel: 5 μ g of each steroid were applied daily to the right organ for 15 days, while the left organ received solvent alone.

FIGURE 4. A time course graphic of 14 C-U- glucose incorporation into costovertebral organ lipids *in vitro*. Determinations were performed by duplicate and were obtained from incubating the glands of 8 animals with 11.1 mM (3 μ Ci) 14 C-U glucose, as described under Materials and Methods.

TABLE 1. Percentage of increase in 3 different parameters of female hamster flank organs treated daily for 15 days with 5 μ g of steroids.

EXPERIMENTAL GROUPS	PERCENT OF <i>IN VIVO</i> INCREASE IN TREATED FEMALE FLANK ORGANS DIAMETER OF SPOT SIZE (mm)	TOTAL WEIGHT (mg)	LIPID WEIGHT IN THE DRIED EXTRACT
UNTREATED CONTROL	2.1 \pm 0.50 *	28.5 \pm 7.50 *	17.5 \pm 5.00 *
	100%	100%	100%
T	127%	35%	39%
LNG	—	-32%	-33%
T + LNG	4%	5%	13%

* The values obtained represent the control values \pm SD and were considered as 100% for comparison purposes.

TABLE 2.- In vitro effect of T, LNG and T + LNG on ¹⁴C-U-glucose incorporation in the left flank organs (solvent-treated) on different experiments.

IN VIVO EXPERIMENTAL GROUP. VEHICLE-TREATED LEFT GLANDS.	IN VITRO ADDED STEROID HORMONE (5 µg/ assay)	¹⁴ C GLUCOSE INCORPORATION INTO LIPIDS. pm/ mg of gland /h
I	- TESTOSTERONE	0.488 ± 0.07 0.766 ± 0.16
II	- LEVONORGESTREL	0.375 ± 0.09 0.369 ± 0.2
III	- TESTOSTERONE + LEVONORGESTREL	0.338 ± 0.06 0.398 ± 0.08

* The values express the mean of 5 experiments ± SD.

TABLE 3.- In vitro effect of T, LNG and T + LNG on ¹⁴C-U-glucose incorporation in the female hamster right flank organs (hormone treated) on different experiments.

IN VIVO EXPERIMENTAL GROUP. HORMONE TREATED RIGHT GLANDS.		IN VITRO ADDED STEROID HORMONE. (5 µg/ assay)	¹⁴ C-U-GLUCOSE INCORPORATION INTO LIPIDS (pm/mg of gland/h)
T	1	-	0.481 ± 0.14
		TESTOSTERONE	0.781 ± 0.11
LNG	2	-	0.516 ± 0.23
		LEVONORGESTREL	0.440 ± 0.22
T+LNG	3	-	0.496 ± 0.05
		TESTOSTERONE + LEVONORGESTREL	0.536 ± 0.03

* The values express the mean of 5 experiments ± SD.

TABLE 4.- Percentage of incorporated ^{14}C -U- glucose into different lipid classes of female hamster flank organ. a)

	CONTROL (Percent of lipids)	TESTOSTERONE (5.7 nM)	LNG (5.3 nM)	T + LNG (5.7 nM + 5.3 nM)
TOTAL LIPIDS	: 0.632 ± 0.03 ^{b)} (100%)	: 0.989 ± 0.068 (100%)	: 0.516 ± 0.59 (100%)	: 0.632 ± 0.078 (100%)
POLAR LIPIDS	: 50.6	: 3.7	: 45.0	: 23.0
CHOLESTEROL	: 0.5	: 0.5	: 0.5	: 0.5
GLYCERIDES	: 47.0	: 89.0	: 53.0	: 74.0
FACE FATTY ACIDS.	: 1.2	: 6.0	: 0.8	: 1.3
SQUALENE	: 0.2	: 0.1	: 0.3	: 0.2
CHOLESTEROL ESTERS	: 0.5	: 0.5	: 0.5	: 0.5

a) Incorporation of ^{14}C from ^{14}C -U- glucose was performed using 11.3 nM of labelled glucose as described under Methods.

b) Values are expressed as pmol of substrate incorporated per gland per hour and are means

November 18, 1993.

DR. J.R. PASQUALINI
EDITOR-IN-CHIEF OF THE
JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY
AND MOLECULAR BIOLOGY
EDITORIAL OFFICE FUNDATION
FOR HORMONE RESEARCH

Dear Dr. Pascualini:

I'm very pleased to submit the manuscript entitled "Molecular interactions of levonorgestrel and its 5 alpha reduced derivative with androgen receptors in hamster flank organs" in order to be considered for its publication in The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. Please find enclosed in addition to the manuscript 3 complete sets of copies including figures and tables, as well as a self-addressed card acknowledging receipt of this material

Thanking you in advance all your attentions to this matter and hoping to hear from you at your earliest convenience, I remain.

Sincerely



Marisa Cabeza Salinas, M.D.

Titular professor, Biological Systems.

IN VITRO METABOLISM AND MOLECULAR INTERACTIONS OF
LEVONORGESTREL AND ITS 5 Alpha REDUCED DERIVATE WITH THE
ANDROGEN RECEPTOR IN THE FLANK ORGAN.

Marisa Cabeza, Felipe Vilchis, Ana E. Lemus, Lino Díaz de León
and Gregorio Pérez Palacios.

Departments of Biological Systems, Metropolitan University-X,
Reproductive Biology, National Institute of Nutrition S. Zubirán and
UAM-I, Biomedical Institute of National University of México, México
City.

Running Page Headline: 5 Alpha REDUCTION OF LEVONORGESTREL AND
ANDROGENIC ACTIVITY.

Adress all Correspondance to:

Marisa Cabeza ,MD.
Biological Systems Department
Metropolitan University - X
Calzada del Hueso #1100. C.P 04890
Mexico City.
Phone: (52-5) 724.52.60
Telefax: (52-5) 724.52.372

ABSTRACT

The *in vitro* 5 Alpha reduction from levonorgestrel (LNG) as well as its binding capacity to the androgens receptors by the hamster flank organ was investigated. Furthermore the effect of LNG and its 5 Alpha reduced metabolite formed, on the flank organ test and -U-¹⁴C glucose incorporation into lipids by this tissue were determined.

Homogenates from female hamster flank organs were incubated in presence of NADPH at pH 7.4 . Isolation and radiochemical purity of radioactive LNG metabolites were determined by reverse isotope dilution technique. Binding sites for androgens in the male hamster flank organs cytosol, were saturated in presence of increasing concentrations (1-10 nM) of [³H]DMNT , permitting the calculation of affinity (K_d) . For competition experiments , tubes contained 1.4 nM [³H]DMNT (K_d) plus a range of increasing concentrations (20-200 nM) of the different unlabelled steroid hormones, sample processing was performed for saturation analysis. The flank organ test was realized as had been reported before and -U-¹⁴C glucose incorporation into lipids was determined in organ culture conditions to pH=7.4.

The 5 Alpha LNG metabolite formed from LNG, had binding capacity to androgen receptors (AR) in flank organs enhancing their affinity as compared with LNG. The flank organ test demonstrated that the 5 Alpha reduced metabolite activity was similar to that observed for LNG and T on gonadectomized male hamsters flank organs. The influence of

daily topical applications with LNG or its 5 alpha reduced metabolite increased the radiolabeled glucose incorporation into lipids in a similar way than T in this tissue. The overall data indicated that LNG and 5 alpha LNG presented androgenic activity over the lipid pathway on male flank organs.

INTRODUCTION

Progestins are synthetic steroids that can imitate, inhibit or potentiate the estrogenic, androgenic or progestogen activities of steroids (1-3). Levonorgestrel (LNG) is a synthetic progestin (4) that exerts different effects on target tissues (5). This molecule shows androgenic (6), antiandrogenic (7) and synandrogenic activities (8) as well as antigonadotrophic (9) and progestational (10) effects. However it lacks estrogen like activity (11). LNG molecule is metabolized *in vitro* to 5 alpha LNG which, as compared with LNG in target tissues, shows a low level of interaction with progesterone receptors (PR) and an enhanced binding affinity for androgens receptors (AR) (8). This findings indicate that 5 alpha reduction of LNG increases its affinity for AR.

It is known that when topically applied, LNG (5% w/v) improves acne (7) and decreases the oil drops in treated female hamster flank organs (12). In this study, we have analyzed the metabolic fate of LNG in the hamster flank organs and its interaction with AR in this tissues. Also, the effect of LNG and its 5 alpha reduced metabolite on the flank organ test (13) was determined, as well as their influence on the U- ^{14}C -glucose incorporation into lipids (14) in organ culture conditions.

EXPERIMENTAL.*Radioactive material and chemicals*

[15, 16 ³H] levonorgestrel ([³H] LNG), sp act.: 24.28 Ci/mmol and radioinert LNG was kindly provided by Schering AG (Berlin).

[17 alpha-methyl-³H] dimethyl 19 nortestosterone ([³H]DMNT), sp. act: 89 Ci/mmol and unlabelled DMNT were purchased from Amersham International Co. (Bucks; England). [-U-¹⁴C glucose], sp, act. 340 mCi/mmol was provided by New England Nuclear Co. (Boston Mass.) and unlabeled D(alpha) glucose with melting point of 146°C, was purchased from Merk of Mexico. Testosterone, progesterone, 5 alpha dihydrotestosterone and NADPH were supplied by Sigma Chemical Co. (ST. Louis MO.). 5 alpha dihydrolevonorgestrel (5 alpha LNG) was synthesized by lithium - ammonia reduction of LNG crystallized from ethyl acetate-hexane as it has been described previously (8) and was kindly supported by Drs. Gustavo Garcia and Ivonne Grillesca from School of Chemistry, National University of Mexico. The radiochemical purity of the labeled steroids was established by thin-layer chromatography and by repeated crystallizations up to constant sp. act. All reagents and solvents used were analytical grade.

Animals and tissues.

Adult male and female Syrian Golden hamsters (150-200g) were used. They were provided by the Metropolitan University - Xochimilco of Mexico. The animals were kept in a room, which had controlled

temperature (22 ° C) and light - dark periods of 12 h. Food and water were provided *ad libitum*.

Gonadectomies were performed under light ether anesthesia. Animals were sacrificed by decapitation. The flank organs were immediately removed, blotted and weighed and then submitted to different experimental procedures. Tissues used in metabolic and receptor experiments were homogenized with a polytron (Brinkman 4 X 15 sec. bursts).

In vitro metabolic studies

Homogenates from female hamster flank organs (3.3 mg protein) were prepared from adult female intact animals, using Krebs-Ringer-phosphate buffer solution pH 7.4. Tissue preparations were incubated by duplicate with 8 μ M of [³H LNG] in the presence of NADPH 431 μ M (8) in a Dubnoff metabolic incubator at 37.5 °C for 60 minutes, using air as the gas phase. The final incubation volume was 1 ml. In order to have a competitive substratum, a similar experiment was carried out, but in this case testosterone (10-fold excess), was added to the incubations medium. Tissue less incubations were used as controls. Incubation, was terminated by addition of ethyl acetate and [³H] steroids were extracted (4x) using 3 vol of ethyl acetate. The organic extract was partitioned between hexane and 10% aqueous methanol. Isolation and radiochemical purity of radioactive LNG metabolites were made by reverse isotope dilution technique, which included identical behavior to that of the steroid carriers in two different thin layer chromatographic systems (chloroform - acetone 9:1, and benzene - ethyl acetate, 2:1) as well as successive recrystallizations to obtain

constant sp. act. Radioactive conversion products were identified on chromatographic plates using a Packard radiochromatogram scanner, while nonradioactive steroid carriers were detected using phosphomolybdic acid reagent. Otherwise radioactivity was determined in a Packard Tri-Carb liquid scintillation spectrometer (Model 2660), using Instagel (Packard, Downers Grove, IL) as counting solution. Counting efficiency of ^3H was 45 %. Formation of 5 alpha LNG metabolite was calculated and expressed as pmol/mg/protein/h.

Cytosol preparations for steroid receptor studies .

Androgen receptors. Flank organs were obtained from adult male hamsters (150-200 g), which were castrated 72 h prior to the experiments. Tissue homogenization was performed as described above, using TEDAM (20 mM Tris-HCl, pH 7.4 at 4°C, 1.5 mM EDTA, 0.25 mM dithiothreitol and 10 mM sodium molybdate) containing 10% glycerol (v/v). The homogenate was centrifuged at 105,000 g for 1 h at 2°C in a SW 50.1 rotor (Beckman Instruments, Palo Alto, CA). Cytosol protein content was determined by the Bradford's dye binding method (15) using bovine serum albumin (BSA) as standard.

Androgen receptor binding assay.

Assays were performed essentially as described by Chávez et al (16).

Saturation curves and determination of the binding parameters. Binding sites were saturated in the presence of increasing concentrations (1-10 nM) of [^3H]DMNT . The results were analyzed according to the method

of Scatchard (17), allowing the calculation of affinity (K_d) and total number of sites (B_{max}) by linear regression.

Aliquots (150 μ l) of cytosol were incubated (by triplicate) for 18-20 h at 2-4 °C in test tubes containing 1-10 nM [3 H]DMNT. Parallel sets of tubes contained identical concentrations of [3 H]DMNT plus 100-fold excess of radioinert DMNT. 800 μ l of dextran-coated charcoal in TEDAM buffer was added and the mixture was incubated for 10 min at 4°C. The tubes were vortexed and immediately centrifuged at 800g for 10 minutes and appropriate aliquots (200 μ l) were submitted to radioactive counting. Specific binding was determined by subtracting the mean values of dpm in the presence of excess unlabeled DMNT from the mean values of dpm of the corresponding tubes containing only [3 H]DMNT.

Competition studies

For competition experiments, tubes contained 1.4 nM [3 H]DMNT plus a range of increasing concentrations (20-200 nM) of the following unlabelled steroid hormone agonists: DMNT, 5 α DHT, LNG, 5 α LNG and progesterone. Sample processing was performed as described above for saturation analysis. The inhibition constant (K_i) of each compound was calculated according to the procedures described by Cheng and Prusoff (18).

Flank organ test.

The flank organ test was accomplished as previously reported by Vermorken et al (13). The effect of steroids on the hamster's flank organs of gonadectomized males (7 days before the experiment), was determined on 5 groups of 4 animals/each that were selected at random. The animals were kept in a room, which had controlled temperature (22° C) and light-dark periods of 12 h. Food and water were provided *ad libitum*.

HORMONE - TREATMENT.

Both flanks of the animal were shaved before the experiments. Steroids were dissolved in 5 μ l ethanol and daily applied topically on the hamster's right flank organs (19). The applications were made with a Edp 2 pipette (model E₂ 100, Rainin Inst. Co.). After this time the organ diameter size, weight, lipid content and the *in vitro* -U-¹⁴ C-glucose incorporation into lipids, in culture conditions, were determined. The left flank organs of the animals received 5 μ l of ethanol, and served as controls. The effect of the solvent on these organs was also determined and the values obtained were subtracted from those obtained on the right flank.

Topical applications on the right flank organs were as follows:

GROUP 1 n=4, 5 μ g of testosterone (T) (12).

GROUP 2 n=4, 5 μ g of levonorgestrel (LNG) (12).

GROUP 3 n=4, 5 μ g of 5 alpha LNG.

GROUP 4 n=4, 5 μ g of T + 5 μ g of LNG .

GROUP 5 n=4, 5 μ g of T + 5 μ g of 5 alpha LNG

Another group of 4 animals was maintained as an untreated control. In these animals, the solvent was applied only on the right flank organ.

IN VITRO INCORPORATION OF U-¹⁴C-GLUCOSE INTO LIPIDS.

At the end of each treatment, the animals were anesthetized with ether and sacrificed. The size of both glands was measured with a ruler. Following this, they were dissected out around the pigmented spot (20) and weighed in a balance (Ohaus GA 200). To evaluate the effect of topical administration of steroids on the capacity of glucose incorporation into the hamster's flank organ lipids in culture conditions, glands of the animals of each group were divided in two subgroups: One subgroup of glands from 4 animals, hormone-treated and another subgroup of solvent-treated glands, were placed in Erlenmeyer flasks (4 whole glands/flask), and incubated on a water bath shaking incubator, in the presence of 3 μ Ci of U-¹⁴C-glucose (sp. act. 320 mCi/mmol) and 36 mg/100ml (2mM) of nonradioactive glucose (14,21) for 2 hours at 37°C in a final volume of 3 ml of Krebs-Ringer buffer (pH=7.4), containing 150 mg of bovine serum albumin.

DETERMINATION OF INCORPORATED RADIOACTIVITY INTO LIPIDS.

Following incubation, the glands were placed (4 glands each) in a vial containing 10 ml of Folch's solution (22) for 24 hours at room temperature. This was made in a previously tared glass vial in order to extract the lipids (submitted manuscript). Immediately thereafter, the glands were recovered from the solvent medium. To remove free

^{14}C -glucose, 1 ml of water was added to the organic phase for one hour. The aqueous layer was removed by vacuum suction, and the extract was heated until dryness. The extracted lipids were weighed in the same extraction vial on a balance, and the radioactivity incorporated into them, was determined by counting in a Packard Tri-carb 3390 liquid scintillation spectrometer, using Instagel (Packard Downers Grove, IL) as counting solution. Counting efficiency for ^{14}C was 87%. The specific activity of the lipids isolated was calculated and expressed as pmols/ gland/hour (23).

RESULTS.

In vitro metabolism of LNG.

Formation of 5 alpha LNG. Following partition between aqueous methanol and hexane of the female hamster flank organs incubation extracts, 95 % of the radioactive material was recovered in the polar fraction. When methanolic extracts were submitted to thin layer chromatography, two radioactive zones were identified (Rf: 0.55 and 0.65). The less polar compound, had a chromatographic behavior identical to that of the 5 alpha LNG carrier. After elution, a representative aliquot was mixed with additional radioinert 5 alpha LNG and recrystallized to a constant sp act. as shown in Table 1. The second zone was identified as unchanged LNG. Unmodified [³H] LNG was recovered from control tissue-less incubations.

When the metabolism of [³H] LNG in the female's hamster flank organs was studied in presence of testosterone in the incubation medium, a decrease of 5 alpha LNG metabolite formation was determined (Figure 1). The recrystallization data of 5 alpha LNG, obtained after elution from the thin layer chromatography fraction and mixed with additional radioinert 5 alpha LNG, are presented in Table 1.

Saturation Curve.

Figure 2a represents a typical saturation curve, analyzed according to the method of Scatchard, presented in Figure 2b. The levels of non-specific bound hormone increased progressively with the augment of radiolabeled compound concentration.

Competition of LNG and its metabolite for AR.

The effects of increasing concentrations of non radioactive natural and synthetic steroids upon the [³H]DMNT binding to AR from the male's hamster flank organs are shown in Figure 3. The order of the affinity for AR was: DMNT > 5 alpha DHT > 5 alpha LNG > LNG with values for K_i = 5.7, 6.6, 18.4, 20.4 respectively.

Flank organ test.

After 3 weeks of male hamster gonadectomies, the flank organs look like that of females. Testosterone topical applications restored the characteristics of male flank organs, loosing upon castration. The effect of daily topic applications for 15 days of T, LNG, 5 alpha LNG, T+LNG and T+5 alpha LNG on the diameter of the pigmented spot and lipids content of gonadectomized male hamster flank organs are shown in Table 2. No significant differences, as compared with the untreated control, were observed in the contralateral organ that was used as a systemic positive control . This suggests that any systemic absorption was carried out in this period of time.

LNG and 5 alpha LNG had less androgenic effect than T on the diameter of the spot and lipids content . Also, the combined treatments had androgenic effect upon this parameter . However, no additive effect was observed, by treatment with both steroids together. These results confirm that the molecular mechanism of action of LNG, is similar than that observed for T when it was applied topically.

In vitro U-¹⁴C- glucose incorporation into lipids.

The incorporation of radioactive glucose into lipids by intact and gonadectomized male hamster flank organs is shown in Figure 4. The overall data showed that radioactive glucose incorporation into lipids, decreased upon castration. However, topically-administration of T, restored it (Fig. 4).

Levonorgestrel and 5 alpha LNG applications on gonadectomized male hamster flank organs show similar activities than testosterone, on labeled glucose incorporation in organ culture conditions . These compounds increased the metabolic pathway until the values reached normal levels. Similar results were obtained with the combined treatments. These data suggest than progestins play an androgenic role on U-¹⁴C glucose incorporation into lipids in males hamster flank organs.

DISCUSSION.

The objective of these experiments was to determine, the role of LNG on the flank organ of hamsters. According to the results obtained, the molecule of LNG was reduced to 5 alpha LNG flank organs. This progestin competes with testosterone for binding to 5 alpha reductase enzyme which is present in this tissue (24,25). On the other hand, it is known that the *in vitro* conversion from T to DHT in female hamster flank organs is inhibited by progesterone (26) and that 5 alpha dihydroprogesterone, which is formed from progesterone in the human skin, interacts with DHT receptor but neither dihydroprogesterone nor progesterone have any androgenic activity (27). However, progesterone completely prevents the androgenic action of testosterone on the diameter of the pigmented spot of hamster flank organs (26). In this study we have confirmed that LNG interacts with cytosolic androgen receptors in male flank organs with a $K_d=1.38$ nM (28). Radioinert DMNT, as well as DHT in increasing concentrations were able to inhibit the binding of [3 H] DMNT to AR which are present in the cytosolic fraction, as shown by the respective K_i values of 5.7 and 6.6 respectively. Furthermore, radioinert 5alpha LNG and LNG also inhibited the binding of [3 H] DMNT to AR, as indicated by the respective K_i values of 18.4 and 20.4. However, progesterone did not have any inhibitory effect on the binding of [3 H] DMNT to cytosolic AR like it was expected. The overall results obtained showed that in males' flank organs, 5 alpha reduction of LNG enhanced its competitive potency for AR. Similar observations have been reported in hypothalamic and pituitary tissues (8).

The flank organ test indicated that castration reduced the diameter of the pigmented spot and the lipids content of male flank organs. Also the glands resembled female structures. However, the male glands appearance was restored by T topical applications. These results were consistent with others, previously reported (29). On the other hand, LNG and 5 alpha LNG, had less androgenic activity than that observed for T administration in gonadectomized male hamster flank organs. Nevertheless, the effect of LNG in female hamster flank organs was not as clear as that observed in males (unpublished data). Thus, in that case when treated with LNG both, the pigmented spot and lipids content were lower than in the glands of control females. These results may be related with recent observations on changes in lipids content of the female hamster flank organs during the estrus cycle (30). Determinations performed during female estrus period, showed similar changes to that observed for gonadectomized and LNG-treated male flank organs, but different results were obtained when the females employed had been chosen at random. These observations support the notion that there is an intrinsic relationship between hormones and lipids content in sebaceous glands.

In human skin, acne is improved following topical applications of LNG at 5 % (7). This effect could be due to the fact that LNG changes the fatty acid composition of sebum, by increasing the levels of palmitic and linoleic acids, like it had been observed in female flank organs (31). Previous reports indicated that the levels of linoleic acid were decreased in the sebum of patients with acne (32). Furthermore, LNG showed progestational activity in some tissues (10) and it could be the same for human skin, maybe by regulating the androgen receptor expression (27).

Male gonadectomies decreased the incorporation of radioactive glucose into lipids in the flank organs, but normal levels were restored by T topic treatment for 15 days . LNG and 5 alpha LNG had similar activity to T on radioactive glucose incorporation into lipids in gonadectomized male hamster flank organs. The results obtained with T are in agreement with those reported by Kealey et al.(23). Similar data as those obtained by T - treatment, were found with the combined treatment. However, in females choosen at random , LNG treatment did not increase the radioactive glucose incorporation as compared with the controls in organ culture conditions (unpublishing data) whereas, T in the same conditions increased radioactive glucose incorporation. These effects of LNG on the studied parameters on females could be the results of hormonal influences during the estrus cycle.

REFERENCES.

1. Pérez - Palacios G., Chávez B., Vilchis F., Escobar N., Larrea F. and Pérez A.E.: Interaction of medroxyprogesterone acetate with cytosol and androgen receptors in rat hypothalamus and pituitary. *J. Steroid Biochem.* 19 (1983) 1735 - 1739.
2. Pérez - Palacios G., Fernández - Aparicio M.A., Medina M., Villareal J. and Ulloa - Aguirre A.: On the mechanism of actions of progestins. *Acta endocrinol. (Copenh)* 97 (1981) 320 - 329.
3. Larrea F., Moctezuma O. and Pérez - Palacios G.: Estrogen - like effects on norethisterone on the hypothalamic - pituitary unit of ovariectomized rats. *J. Steroid Biochem.* 20 (1989) 841 - 847.
4. Stanczic F.Z. and Roy S.: Metabolism of levonorgestrel, norethindrone and structurally related contraceptive steroids. *Contraception* 42:1 (1990) 67 - 96.
5. Kloosterber C.A., Vank - Noordergraaf J. and Turpijm E.W.: Selectivity in progesterone and androgen receptor binding of progestagens used in oral contraceptives. *Contraception* 38:3 (1988) 326 - 333.

6. Barranco V.P., Jones D.D.: Effect of oral contraceptive on acne. South. Med. J. 67: 6 (1974) 703 - 706.
7. Cabeza M., Vargas E., García B.: Obtención y efecto de un medicamento tópico antiacné a base de hormonas esteroides. Rev. Mex. Cien. Farm. 15:4 (1985) 29 - 36.
8. Lemus A.E., Vilchis F., Damsky R., Chávez B.A., Grillesca I. and Pérez Palacios G.: Mechanism of action of levonorgestrel: *in vitro* metabolism and specific interactions with steroid receptors in target organs. J. Steroid Biochem. and Molecular Biology. 41 :3 -8 (1992)881 - 890.
9. Rastula K.: Clinical performance of a levonorgestrel releasing intracervical contraceptive device during the first two years of use. Contraception 39 (1989) 187-193
10. Brenner P.F.: The pharmacology of progestagens. J. Reprod. Med. (suppl) 27 (1982) 490 - 497.
11. Edgrin R.A., Jones R.C., Clancy D.P. and Nagra C.L.: The biological effects of norgestrel alone and in combination with ethinyl oestradiol. J. Reprod. Fert.(suppl) 5 (1968) 13 - 45.

12. Cabeza M., Jaimes R.: Acción antiandrogénica del levonorgestrel en el órgano del flanco del hamster hembra. Rev. Mex. Cien. Farm. 17 :2 (1986) 30 - 36.

13. Vermorken A.J.M, Goos C.M.A.A. and Wirtz P.: Evaluation of the hamster flank organ test for the screening of anti-androgens. Br. J. Dermatol. 106 (1982) 99 - 101.

14. Wheatley V.R., Leonard T., Hodgins B.S. and Coon W.M.: Cutaneous lipogenesis. J. Invest. Dermatol. 54:4 (1970) 288 - 297.

15. Bradford M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochem. 72 (1976): 248 - 254.

16. Chávez B.A., Vilchis F., Pérez A.E., García G.A., Grillesca I. and Pérez - Palacios G.: Stereospecificity of intracellular binding of norethisterone and its A - ring reduced metabolites. J. Steroid Biochem. 22 (1985) 121 - 126.

17. Scatchard G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. NY. Acad. Sci. 52 (1949) 660 - 672.

18. Chang Y.C. and Prusoff W.H.: Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50

percent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmac.* 22 (1973) 3099 - 3108.

19. Voigt W. and Hsia L.S.: The antiandrogenic action of 4 - androsten - 3 one - 17 β carboxylic acid and its methyl ester on hamster flank organ. *Endocrinology* 92 (1972) 1216 - 1219.

20. Combettes C., Durand-Seme V., Querleux B., Saint-Leger D. and Leveque J.L.: Imaging the flank organ by an ultrasonic technique: a new approach to animal tests. *Br. J. Dermatol.* 121 (1989) 689 - 699.

21. García - Sainz A., Amador A.G., Piña E. and Chagoya de Sánchez V.: Lipogenic action of cycloheximide on the rat epididymal fat pad. *Biochem. Pharmacol.* 24 (1975) 891 - 897.

22. Folch J. and Lees M.A.: A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497 - 509..

23. Kealey T. and Ridden J.: Isotretinoin and testosterone regulate the *in vitro* lipogenesis of human sebaceous glands isolated by shearing. *Br. J. Dermatol.* 121 (suppl) (1989) 30.

24. Takayasu S., Adachi K.: The *in vivo* and *in vitro* conversion of testosterone to 17 β - hydroxy - 5 alpha androstan - 3 - one (DHT) by the sebaceous gland of hamsters. *Endocrinology* 90 (1972) 73 - 80.

25. Goos C.M.A.A, Wirtz P., Vermorcken A.J.M. and Mauvais - Jarvis P.: Androgenic effect of testosterone and some of its metabolites in relation to their in relation to their biotransformation in the skin. Br. J. Dermatol. 107 (1982) 549 - 557.

26. Vermorcken A.J.M., Goos C.M.A.A. and Roelofs H.M.J.: The antiandrogenic effect of progesterone on the hamster flank organ. Br. J. Dermatol. 102 (1980) 455 - 460.

27. Wright F., Giacomoni M. and Kerchhoffer M.O.: Antiandrogenic activity of progesterone in human skin. Percutaneous absorption of steroids. International Symposium, Paris, April 1979.

28. Adachi K.: Receptor proteins for androgens in hamster sebaceous glands. J. Invest. Dermatol. 62 (1974) 217 - 223.

29. Bedord C.J., Ruddle D.L. and Wagner M. : Hamster costovertebral organ lipogenesis *in vitro* and *in vivo*: effects of cerulenin. Arch. Dermatol. 278 (1986) 486 - 489.

30. Serrano E. y Cabeza M. : El papel de la testosterona y el efecto del levonorgestrel en el metabolismo de lípidos de las glándulas sebáceas. Bioquímica 73 (in press)

31. Cabeza M. y García B. : Cambios producidos por el levonorgestrel sobre el patrón de secreción de lípidos inducidos por la testosterona en el órgano del flanco del hámster hembra. Rev. Mex. Cien. Farm. (in press).

32. Downing D.F., Stewart M.E., Wetz P.W., Strauss J.S.: Essential fatty acids and acne. J. Am. Acad. Dermatol.14 (1986) 221-225.

PRECURSOR	SUCCESSIONAL RECRYSTALLIZATIONS	SP. ACT. [³ H]dpm/mg
[³ H] LNG	C ₁	462
	C ₂	269
	C ₃	200
	AL ₃	274
[³ H] LNG + T	C ₁	310
	C ₂	302
	C ₃	273
	AL ₃	430

TABLE 1. Recrystallization data of isolated 5 alpha LNG from female hamster flank organs after *in vitro* incubations with [³H] LNG in presence of 10 fold excess or absence of T in the incubation medium.

TREATMENT	DIAMETER OF THE SPOT IN mm	TOTAL LIPIDS EXTRACTED IN mg/gland
INTACT n=6	5.20 ± 1.30	13.80 ± 2.80
CASTRATED n=12	2.55 ± 0.15	4.70 ± 1.20
T n=4	5.60 ± 1.50	12.45 ± 0.50
LNG n=4	4.25 ± 0.50	10.30 ± 1.50
5 alpha LNG n=4	3.50 ± 0.25	7.60 ± 2.80
T + LNG n=4	4.40 ± 0.73	11.00 ± 1.50
T + 5 alpha LNG n=4	4.60 ± 0.73	10.30 ± 2.00

TABLA 2. Diameter of the spot of male hamster flank organs, as well as lipid content in the Folchps extract. Experiments were doing in duplicate and n represents the different times repeat it. The results show the standard deviations (±)

Figure 1. *In vitro* metabolism of [³H] LNG in the flank organs of adult female hamsters. Incubations of homogenate preparations were carried out in duplicate at 37°C for 1 h , in presence or absence of 10 fold - excess of testosterone in the incubation medium.

Figure 2. Saturation (a) and Scatchard (b) plots of specific [³H] DMNT binding to cytosolic fractions of gonadectomized male hamster flank organs. Each point represents the mean of 3 experiments.

Figure 3. Specificity of binding. Cytosolic fraction of gonadectomized male hamster flank organs were incubated for 18 - 20 hours at 4°C in the presence of 1.38 nM [³H] DMNT and increasing concentrations of radioinert steroids. Each point represents the mean of 3 experiments

Figure 4. ¹⁴C glucose incorporation into lipids by the male hamster flank organs of intact (I) or castrated (C) animals organ in culture conditions . Male gonadectomized flank organs were treated with different steroids for 15 days. The values are given in pmol/gland/hour ± standard deviations.

