

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Farmacia

**RECEPTORES ANDROGENICOS DE CELULAS PROSTATICAS  
 HUMANAS SEGUN EDAD Y LOCALIZACION GLANDULAR.  
 CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA PATOGENIA DE LA  
 HIPERPLASIA BENIGNA PROSTATICA Y DEL CANCER.**

Realizada en el Instituto Universitario de Investigación Gerontológica y  
 Metabólica. Universidad Autónoma de Madrid

Dirigida por el Profesor. Dr. Antonio Ruiz Torres.

Tutora: Profesora Dra. Blanca Feijoo.

Tesis doctoral

Gustavo Sánchez Visconti

Madrid 1992

*Blanca Feijoo*  
*Mariano Barrio*  
*Manuel de la Fuente*  
*Ramón*  
*Francisco Barbero*  
*Carla Martínez*

TRIBUNAL

***A Angeles.***

Agradezco al Prof. Dr. Antonio Ruiz-Torres su gran interés, trabajo y dedicación en la dirección de esta Tesis Doctoral, así como su esfuerzo para que este periodo fuese realmente de formación en la investigación.

Quiero agradecer a la Profesora. Dra. Blanca Feijoo su gran colaboración y apoyo en la presentación de este trabajo.

Deseo agradecer al Dr. D. Andrés Sánchez Salvador, por quien siento un especial cariño, sus expertos consejos y sabias enseñanzas en el campo urológico, así como su apoyo en la iniciación de este trabajo. Al Dr. Ignacio Pereira, Jefe del Servicio de Urología del Hospital de la Princesa, y al resto de los médicos del Servicio, los Dres.: Lorenzo Herrero, Mariano Rabadán, Francisco Melón, Ramón Arellano, Javier Sanz, José Moyano y Andrés Sempere, deseo expresar mi reconocimiento y gratitud por su valiosa colaboración, lo que ha permitido llevar a cabo este estudio. Quiero expresar mi gratitud hacia Elena de la Peña, secretaria del Servicio, por su importante cooperación en todo momento.

Agradezco al Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FIS) la concesión de la beca personal de Iniciación a la Investigación, vinculada al proyecto 89/0222, lo que fué decisivo para el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Así mismo, agradezco al Dr. Javier Izaguirre su apoyo en la realización del proyecto

mencionado.

No quiero olvidar mi profunda gratitud a mis antiguos compañeros Carmen Jimenez y José Abad, con los que me inicié en el campo de los receptores. También agradezco la disponibilidad mostrada en el laboratorio por Carmen Lopez y M<sup>a</sup> del Mar Gonzalez García-Parreño. A los Dres. David Vicent y Angeles Rodriguez les agradezco sus consejos y ayuda en las últimas etapas de este trabajo.

Expreso mi gratitud a todo el personal de enfermería y auxiliar del quirófano, especialmente a Marta Pastor y a Encarnación de Dios, por facilitarme algo tan importante como es la correcta recogida del material de estudio. También agradezco a Cristina Casal su participación en las fotografías microscópicas, así como a los Servicios de Bioquímica por su colaboración, y de Anatomía Patológica por los diagnósticos histológicos para este trabajo.

Finalmente quiero expresar de forma muy especial mi profundo agradecimiento a mi mujer, Angeles, por su contínuo estímulo y apoyo durante todos estos años que ha durado este estudio, así como a mis padres, por haberme enseñado a superar las dificultades, lo cual me ha sido de gran ayuda para poder llegar a realizar esta Tesis.

---

## ÍNDICE

---

INTRODUCCIÓN . . . . .	3
1.- RECEPTORES ANDROGÉNICOS: GENERALIDADES . . . . .	4
2.- LOCALIZACIÓN DE RECEPTORES ANDROGÉNICOS . . . . .	17
3.- MÉTODOS DE DETERMINACIÓN . . . . .	21
4.- RECEPTORES ANDROGÉNICOS Y PRÓSTATA . .	28
OBJETIVOS . . . . .	55
MATERIAL Y MÉTODOS . . . . .	58
MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE RECEPTORES POR HOMOGENEIZACIÓN DE LOS TEJIDOS. . . . . .	61
OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN CITOSÓLICA. . . .	63
OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN NUCLEAR. . . . .	66
DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE RECEPTORES. .	69
MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE RECEPTORES EN CÉLULAS INTACTAS. . . . .	72
DETERMINACIÓN DE RECEPTORES TOTALES. . . .	72
DETERMINACIÓN DE LOS RECEPTORES NUCLEARES	77

CARACTERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES NUCLEARES EN CÉLULAS INTACTAS. . .	79
CALCULO DE LOS RESULTADOS. . . . .	80
EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS . . . . .	90
REACTIVOS Y LIGANDOS UTILIZADOS. . . . .	94
CARACTERIZACIÓN HORMONOMETABÓLICA DEL MATERIAL DE ENFERMOS ESTUDIADOS. . . . .	95
DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN PROSTÁTICO. . .	96
DIAGNOSTICO HISTOLÓGICO. . . . .	97
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS. .	98
 RESULTADOS . . . . .	 100
 DISCUSIÓN . . . . .	 124
 CONCLUSIONES . . . . .	 144
 RESUMEN . . . . .	 149
 BIBLIOGRAFÍA . . . . .	 156

# **INTRODUCCIÓN**

---

## 1.- RECEPTORES ANDROGÉNICOS: GENERALIDADES

---

Es bien conocido que los andrógenos son necesarios para la diferenciación sexual en el feto, el desarrollo sexual durante la pubertad y el mantenimiento de la función sexual y fertilidad en el adulto. Adicionalmente contribuyen al crecimiento de la próstata.

La testosterona y su metabolito dihidrotestosterona (DHT) son los andrógenos con mayor actividad biológica. La testosterona se sintetiza en las células de Leydig del testículo y su tasa de síntesis es controlada por la hormona luteinizante (LH). Esta hormona es secretada por la glándula pituitaria, siendo su liberación controlada por la hormona liberadora de LH (LHRH).

Aproximadamente el 97 % de la testosterona circula por el torrente sanguíneo unida a una globulina, la globulina transportadora de hormona sexual (SHBG), y sólo la fracción de testosterona no unida a esta proteína puede difundir hacia el

interior de su célula diana (Berkovitz y col., 1983). Algunos tejidos como la próstata, por medio de la enzima  $5\alpha$  reductasa, transforman la testosterona a DHT, metabolito de mayor androgenicidad que la testosterona. La DHT posteriormente se metaboliza a androstenodiol, también con un marcado efecto androgénico (Farnsworth y Brown, 1963; Prout y col., 1976). Esta enzima utiliza como cofactor el NADPH y se localiza en el retículo endoplásmico y en la membrana nuclear (Wilson, 1972).

El andrógeno debe actuar unido a su receptor para ejercer su efecto en la célula diana. Una célula diana contiene aproximadamente 10.000 receptores (Alberts y col., 1983). El mecanismo de acción generalmente aceptado es el de "dos pasos", mediante el cual el esteroide penetra en la célula y se une a un receptor citosólico libre. El complejo esteroide-receptor que inicialmente presentaba un coeficiente de sedimentación de 9 S (en forma dimérica), se transforma en un complejo de 5 S. Este paso es temperatura dependiente entre  $25^{\circ}$  C y  $30^{\circ}$  C, pero no a  $0^{\circ}$  C. El complejo 5 S tiene capacidad para translocarse hacia el núcleo y unirse a él, no ocurriendo así con la forma 9 S. La unión del

complejo 5 S a la cromatina nuclear (concretamente a sitios aceptores específicos) sólo ocurre con receptores ocupados y produce la activación de la transcripción, aumentando la síntesis de ARN mensajero y estimulando la actividad de ARN polimerasas de manera que el efecto final es la síntesis de proteínas (Jensen y De Sombre, 1973).

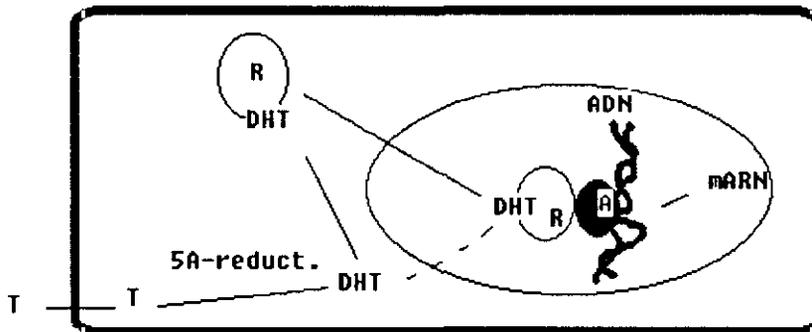


FIGURA 1

En el proceso de traslocación los microtúbulos podrían participar activamente, ya que el tratamiento con Colchicina inhibe este proceso (Parikh y col., 1987). La interacción de los complejos esteroide-receptor con los sitios aceptores nucleares se realiza en la matriz nuclear. La matriz nuclear está involucrada en los procesos de organización y replicación del ADN, en la transcripción genética y en el procesamiento de ARN mensajero (Barrack, 1987). Es una estructura consistente en elementos residuales de la membrana nuclear, con un complejo de poros, un entramado interno fibrogranular con ribonucleoproteínas, y un nucléolo residual (Barrack y Coffey, 1980). Según estos autores los receptores se localizan dentro de la matriz, preferentemente en la estructura reticular interna ribonucleoprotéica. Los receptores asociados a esta estructura están fuertemente ligados, no pudiéndose separar por tratamientos con ADNasa y altas concentraciones iónicas, siendo los sitios aceptores específicos para los receptores los responsables de esa fuerte unión.

Después de caracterizar los sitios aceptores, Barrack (1987) propone que éstos están asociados a genes activos. Puesto que los sitios aceptores son resistentes a ADNasa, el autor supone que la unión del complejo hormona-receptor a su aceptor, protege de la digestión enzimática a las secuencias donde está unido. Tras el aislamiento y la purificación de los sitios aceptores, el 20 % de los receptores se halla en contacto directo con secuencias de ADN, y el resto está unido a proteínas no histonas adyacentes (Rennie y col., 1987). Tratando células diana con un anticuerpo monoclonal contra ciertas proteínas nucleocápidicas, de bajo peso molecular e hidrofóbicas, se observó que la unión del receptor al núcleo no se producía. Si el ADN de estas células era sustituido por el de otras especies, aparecía el mismo resultado, demostrando que la naturaleza de los sitios aceptores es proteica, estando también implicadas ciertas secuencias de ADN (Spelsberg y col., 1987a). Estos autores indican que las proteínas aceptoras se hallan contiguas a secuencias reguladoras de ADN, y la unión del receptor a las proteínas aceptores promueve la acción de los genes reguladores sobre los procesos de transcripción genética.

Alternativamente a este modelo de dos pasos, Sheridan y col. (1979) propusieron un modelo de "equilibrio", según el cual el receptor no ocupado por la hormona se encuentra en equilibrio entre el citosol y el núcleo, según su volumen acuoso. Al penetrar la hormona en la célula, ésta se une tanto al receptor citosólico como al nuclear. El complejo esteroide-receptor nuclear se une a la cromatina, quedando el núcleo sin receptores. Los receptores citosólicos unidos a su hormona van hacia el núcleo para restablecer el equilibrio inicial (proceso de traslocación). Estos autores consideran que la extracción de receptores citosólicos es debida a que se favorece el volumen acuoso del citosol por los tampones empleados para la homogeneización. Esta hipótesis a sido confirmada por estudios autorradiográficos y utilizando tampones no acuosos para la homogeneización (Martin y Sheridan, 1982), así como mediante el empleo de anticuerpos monoclonales antirreceptor (Parikh y col., 1987) que determinan en el núcleo receptores tanto ocupados como libres (King y Greene, 1984). Además mediante el tratamiento de células con citocalasina B, por el cual se obtiene un citoplasto por un lado, y por otro un nucleoplasto, se determinan receptores libres casi

exclusivamente en el núcleo, por lo que se concluye que los receptores citosólicos son un artefacto aislado en el citosol en la homogeneización de tejidos (Welshons y col., 1984). Adicionalmente, se ha propuesto que los receptores citosólicos son receptores no funcionales, los cuales poseen capacidad de unirse al esteroide, pero son incapaces de unirse a los sitios aceptores nucleares, promoviendo la transcripción genética (Spelsberg y col. 1987b) .

Cuando los receptores androgénicos se aíslan en el citosol de células prostáticas, en condiciones de baja salinidad, se observa que se encuentran en una forma multimérica, con un coeficiente de sedimentación de 9 S, un radio de Stokes de 73 Å y un peso molecular de 300.000. Cuando la extracción de receptores se realiza bajo condiciones de alta concentración iónica, la forma macromolecular se disocia a dos monómeros con un coeficiente de sedimentación de 4,4 S cada uno, un radio de Stokes de 54 Å y un peso molecular entre 60.000 y 120.000 (Rowley y Tindall, 1986). Estos dos monómeros poseen puntos isoeléctricos de 7,2 y 5,7 (Razel y col., 1985). Existe una tercera forma, resultante de una

agregación de monómeros y ribonucleoproteínas, de 7 S. Esta macromolécula es sensible a ribonucleasas, no es estabilizada por molibdato y se une a ADN, a diferencia de la forma 9 S (Rowley y Tindall, 1986). Si el receptor citosólico se une al andrógeno "in vivo", presenta un coeficiente de sedimentación de 4,6 S (Traish y col., 1984). También se ha encontrado una proteína receptora en la fracción microsomal de próstata de rata (Steinsapir y col., 1985). La estructura del receptor de andrógenos se esquematiza en la figura 2. Está compuesto por 910 aminoácidos (aa) y posee tres dominios: un dominio de unión al ADN (70 aa), que se halla entre el dominio de unión al andrógeno (250 aa) y el dominio N-terminal (538 aa) (Trapman y Brinkmann, 1990).

Se ha observado que, al menos en el caso de los receptores de estrógenos en útero de rata, a medida que aumenta la unión del estrógeno a la fracción nuclear, decae la de la citosólica. Al principio del estímulo hormonal los receptores citosólicos aumentan, y después se hacen constantes según aumentan los nucleares (Williams y Gorski, 1972). Según estos autores, la proteína receptora está en equilibrio entre dos estados. En un estado el

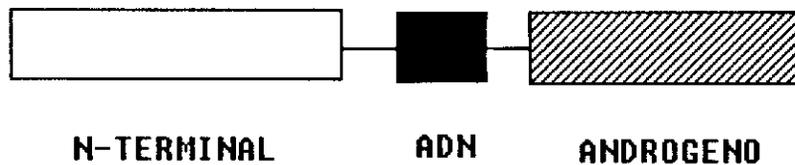


FIGURA 2

receptor se halla en forma libre, o débilmente unido al núcleo, pudiendo ser extraído en la fracción citosólica. En el segundo estado el receptor está fuertemente unido al núcleo o, bajo ciertas condiciones, posee la capacidad de ligar al esteroide. En ausencia de hormona, el primer estado es el que predomina, mientras que la formación del complejo hormona-receptor da lugar al segundo. Por otra parte, Boesel y col. (1980) observaron en

próstata de ratas, que a las 24 horas de la castración, los receptores se hallaban predominantemente en la fracción citosólica. Al administrar una dosis de testosterona, aumenta el número de receptores nucleares, sin una disminución aparente de los citosólicos. El número de receptores disminuye cuando se aplica cicloheximida, un compuesto que inhibe la síntesis de proteínas, sugiriendo este hecho que la unión de la hormona a su receptor promueve, además de los efectos generales, la síntesis "de novo" del propio receptor (Blondeau y col., 1982; Steinsapir y col., 1985)

La afinidad de unión del esteroide a su receptor es crucial para que la hormona ejerza su efecto. Muchos esteroides son moléculas flexibles cuyos grupos funcionales pueden abarcar áreas considerables, por tanto pueden efectuar diversos contactos con uno o más puntos del receptor. La rigidez del anillo A, así como la orientación del grupo 3-ceto, son factores críticos para la unión del esteroide a su receptor. Las posiciones específicas de los grupos funcionales dentro de la molécula del esteroide son importantes para esta unión. Así, para andrógenos, el contacto con su receptor es en C3, C10

y C17 $\beta$  y más débilmente en C2, C11 y C17 $\alpha$ . En C10 la ausencia del grupo 10 $\beta$ -metil aumenta la afinidad por el receptor. Es imprescindible una estructura 17 $\beta$ -hidroxi-3-ona para una unión efectiva al receptor, ya que la modificación o eliminación de estos grupos reduce las afinidades relativas de unión.

La introducción de un doble enlace en la testosterona disminuye la unión en un 50 % si está en posición 1, y en un 75 % si está en posición 5. En esta última posición, la conformación cristalina de la testosterona (prenortestosterona) es similar a la del estradiol. Sin embargo, esta molécula difiere del estradiol por la naturaleza del oxígeno en posición 3, y las propiedades electrónicas del anillo A, y consecuentemente no se une al receptor estrogénico. Esto demuestra la importancia de un donante de hidrógeno en C3 para la unión al receptor estrogénico y de un aceptor de hidrógeno en esta posición para la unión al receptor de andrógenos. La presencia de dobles enlaces en posiciones 4 y 9 de la testosterona disminuye la unión al receptor de andrógenos, sin embargo dobles enlaces conjugados en 4, 9 y 11 la aumentan. La introducción de un grupo 17 $\alpha$ -metil en

testosterona o 5 $\alpha$ -DHT disminuye algo la unión al receptor de andrógenos. La combinación de una sustitución 17 $\alpha$ -metil e insaturación confiere al compuesto una alta afinidad, tanto para receptores androgénicos como de progesterona, en el orden: trieno > monoeno > dieno. En cuanto a sustituciones en el anillo A, la configuración 5 $\alpha$  aumenta la unión de la testosterona a su receptor. Un  $\beta$ -metil en C2 disminuye la unión a receptores de andrógenos y un dimetil aún más. Un metilo en C4 actúa de la misma forma, pero no tanto como en C2. Un dimetil en C6 disminuye la unión a receptores de progesterona y glucocorticoides más marcadamente que al receptor androgénico. Un metil en 7 $\alpha$  mantiene la unión al receptor androgénico. Por último, el metilo en 1 $\alpha$  de la DHT tiene sólo la mitad de afinidad que la 5 $\alpha$ -DHT, y si el metilo es en 1 $\beta$ , el 15 % (Ojasoo y col., 1987).

Como se ha mencionado, la variación de los grupos funcionales de los andrógenos modifica de forma sustancial la afinidad de éstos por su receptor. pero además, cambios estructurales como metilación o desmetilación de la testosterona, altera también la afinidad por su proteína transportadora

(SHBG). Así, eliminando el metilo, en posición 19, de la testosterona, la afinidad de ésta por la SHBG se reduce 19 veces. Un metilo en 17 actúa de la misma forma, pero con menor magnitud (Saartok y col., 1984).

La unión del andrógeno a su receptor sigue una cinética de primer orden. Esta unión es sensible al pH, siendo el pH óptimo 7, aunque la unión puede tener lugar en un intervalo más amplio (5-10), perdiéndose en los extremos ácidos y alcalinos. El calor y la exposición a enzimas proteolíticas destruyen la actividad de unión. La unión depende de puentes disulfuro o grupos tioles, evidenciándose esto por el hecho de que reactivos tiólics, como ditiotreitol, monotioglicerol o mercaptoetanol estabilizan la unión (Rowley y Tindall, 1986).

---

## 2.- LOCALIZACION DE RECEPTORES ANDROGENICOS

---

Se han determinado receptores androgénicos en diversos tejidos de distintas especies. Se ha demostrado la existencia de receptores de andrógenos en distintos órganos de varios animales, como riñón, testículo, epidídimo y vesículas seminales de rata, ratón y cobaya. En órganos sexuales y accesorios, existen receptores para DHT. En riñón los receptores parecen ser predominantemente nucleares, tanto para testosterona como para DHT. También se ha observado que en seres procarióticos, no existen receptores para los andrógenos. En cuanto a la actividad de la  $5\alpha$  reductasa, está elevada en próstata, fundamentalmente, apareciendo también en riñón y testículo. Sin embargo, en conejos esta actividad es baja en casi todos los órganos de esta especie (Mainwaring y Mangan, 1973) . En músculo esquelético de rata se han hallado receptores citosólicos para la testosterona (Michel y Balieu, 1980; Max, 1981; Saartok y col., 1984), observándose un mayor número

de receptores en machos que en hembras (Michel y Balieu, 1980), que la actividad de la enzima 5 $\alpha$  reductasa es baja (Mainwaring y Mangan, 1973) y que el metabolismo de la DHT está aumentado en el músculo (Saartok y col., 1984). También se han cuantificado receptores citosólicos en músculo rectal y en próstata de humanos con HBP, hallándose que el número de receptores era significativamente mayor en próstata, así como la cantidad de testosterona y DHT (Krieg y col. 1977). Por último, receptores citosólicos para testosterona, fueron caracterizados en músculo esquelético de oveja (Sinnott-Smith y col., 1987).

En cultivos de fibroblastos de genitales se observó que, tras la incubación de éstos con una concentración saturante de [ $^3\text{H}$ ]miboleronona, había un aumento del número de receptores totales (de 917 a 2979 mol. $\cdot 10^{-18}$ / $\mu\text{g}$  ADN). Esta respuesta era temperatura dependiente y bloqueada por inhibidores de proteínas y de ARN (Evans y Hughes, 1985). También se halló una disminución significativa del número de receptores androgénicos totales con la edad, sin cambios aparentes en la afinidad, utilizando cultivos de fibroblastos obtenidos por biopsias de pubis ( $5770 \pm$

1020 sitios/célula,  $KD = 0,56 \pm 0,23$  nM,  $31,4 \pm 8,8$  años;  $2820 \pm 970$  sitios/célula,  $KD = 0,5 \pm 0,28$  Nm,  $72,4 \pm 7,4$  años) (Ono y col., 1988).

Se han identificado receptores androgénicos en piel de prepucio, obtenida de individuos que fueron circuncisos (Razel y col., 1985; Fichman y col., 1981), de localización principalmente citosólica, en individuos prepuberales, y predominantemente nuclear en recién nacidos, en la pubertad y en adultos, aunque ambos tipos de receptores, en conjunto, no sufran grandes variaciones en todas las edades (Fichman y col., 1981).

Receptores androgénicos citosólicos se han hallado también en útero de rata (Giannopoulos, 1971), así como en tumores de vejiga, tanto en hombres como en mujeres, siendo el número de receptores mayor en estos tumores que en mucosa de vejiga normal (Laor y col., 1985). También se han identificado receptores para DHT en timo de ratones y ratas. Mientras que la afinidad no variaba entre diferentes especies, edades o sexo, el número de receptores era significativamente mayor en machos, tanto para ratones como para ratas, y en ratones, los

de más edad presentaban un aumento de receptores significativamente más alto que los jóvenes (Pearce y col., 1981).

Otro órgano donde se ha demostrado la existencia de receptores de andrógenos es el hígado. En hígado de rata se han encontrado receptores citosólicos para DHT, y se ha relacionado la existencia de receptores androgénicos con la producción de una proteína llamada  $\alpha_{2u}$  globulina, la cual se encuentra en orina en altas cantidades (Roy y col., 1974). También se ha demostrado la existencia de receptores citosólicos androgénicos y estrogénicos en pulmón de rata. La afinidad del receptor de andrógenos era similar tanto para testosterona como para DHT, aunque se halló a la DHT como andrógeno predominante en la fracción nuclear. Además, el número de receptores androgénicos en este órgano disminuía con la edad del animal (Morishige y Uetake, 1978).

---

### 3.- MÉTODOS DE DETERMINACIÓN

---

Los métodos que se han utilizado para la determinación de receptores esteroidéos difieren en alguno de los pasos seguidos para caracterizar y cuantificar los receptores; desde la forma en la que se halla el receptor (purificado o en el interior de la célula) hasta el aislamiento del complejo hormona-receptor, incluso por el tipo de ligando utilizado. Todos los métodos buscan determinar los distintos parámetros que definen al receptor, eliminando la interferencia de la unión de la hormona a proteínas no específicas.

En la próstata el andrógeno natural que se une al receptor es la DHT. Esta hormona, por medio de la enzima  $3\alpha$ -hidroxiesteroide reductasa, cuyo coenzima es el NADP+, se metaboliza a androstenodiol. Si la DHT se utiliza para la determinación de receptores, puede sufrir este tipo de metabolismo durante los largos períodos de incubación que se requieren.

Además, la DHT se une a la SHBG, la cual tiene una afinidad similar a la del receptor. Para evitar estos inconvenientes, se desarrolló un método que evitaba el metabolismo, añadiendo NAD+asa. Además, por medio de la electroforésis se diferenciaba la unión de esta hormona al receptor, de la unión a la SHBG (Moeller y col., 1983).

Otro ligando utilizado es la R1881 o metiltrienolona ( $17\beta$ -hidroxi- $17\alpha$  metil 4,9,11-estratrien-3-ona). Este compuesto de síntesis ha sido utilizado para determinar sólo receptores citosólicos (Ghanadian y col., 1978; Zava y col., 1979) o citosólicos y nucleares (Hicks y Walsh, 1979), en próstata con HBP, por tener mayor afinidad por el receptor que la DHT, no unirse a la SHBG, y no ser metabolizado. Posteriormente se ha usado otro compuesto de síntesis, la mibolerona ( $7\alpha,17\alpha$ -dimetil-19-nortestosterona), de características similares a la anterior, con la cual se obtiene mayor afinidad (Murthy y col., 1986) y mayor unión (Traish y col., 1986) que con la R1881. Los dos compuestos presentan un inconveniente, y es que poseen alta afinidad por los receptores androgénicos y de progesterona, los cuales están presentes en la próstata (Tilley y col., 1980). Esta

afinidad por los dos tipos de receptores mencionados es debida a que tienen en posición  $17\alpha$  un metilo, como anteriormente se ha visto. No obstante, la unión de estos compuestos a receptores de progesterona se inhibe adicionando acetónido de triamcinolona (en un exceso de 500 veces), sin ejercer ningún efecto sobre los receptores de andrógenos (Zava y col., 1979). Más recientemente, para determinar receptores androgénicos, se ha empleado un ligando de afinidad ( $17\beta$ -dihidrotestosterona bromoacetato), el cual se une covalentemente al receptor. La unión se produce en 10 min en frío, y determina receptores en  $0,2 \mu\text{g}$  de proteína (Anthony y col., 1989).

Un método que disocia en un 80 % el andrógeno endógeno unido al receptor, utiliza un agente mercurial ("mersalil acid"). Este compuesto compite con la hormona ligada al receptor (tanto citosólico como nuclear), uniéndose a los restos de cisteína del receptor. El desplazamiento se realiza con  $0,2 \text{ mM}$  del compuesto, a  $0^\circ\text{C}$  en 30 minutos. El bloqueo del receptor se restaura por adición de compuestos tiólicos, como el monotíoglicerol ( $25 \text{ mM}$ ), no hallándose cambios en la afinidad del receptor con este tratamiento (Traish y col., 1981).

La mayoría de los trabajos sobre receptores de esteroides se realizan mediante un procedimiento de separación común: el método del carbón activo recubierto de dextrano. Este método y los que siguen a continuación, pretenden eliminar la hormona no unida al receptor. A modo de ejemplo, se cita el trabajo de Leake y Habib (1987), según el cual, los receptores se extraen por homogeneización de tejidos, en un tampón de pH 7, cuyos componentes estabilizan al receptor. La fracción citosólica se determina en el sobrenadante resultante de una centrifugación a bajas revoluciones, centrifugando posteriormente a 105.000xg, durante 1 hora. Los receptores nucleares solubles se extraen del sedimento de la primera centrifugación con tampones de alta fuerza iónica, determinándose en el sobrenadante de una segunda centrifugación a 800xg, cuantificándose además en el sedimento, los receptores nucleares insolubles. Tras la incubación de cada fracción con un andrógeno tritiado, a 4°C durante 18 horas, la hormona no unida se elimina del medio por adsorción a carbón activo recubierto de dextrano.

Otro método de separación del complejo hormona-receptor del esteroide no unido es el de Floridi (1981), que elimina el estrógeno libre mediante la unión a anticuerpos específicos unidos covalentemente a esferas de poliacrilamida. Este procedimiento está basado en que la constante de asociación del receptor es dos o tres veces mayor que la del anticuerpo, evitándose así la disociación del estrógeno unido al receptor. Posteriormente a una centrifugación, el receptor unido al estrógeno es aislado en el sobrenadante.

Hay procedimientos que consiguen, además de la separación de la hormona no unida, la eliminación directa de unión no específica. Se han determinado receptores citosólicos en próstata de rata y en riñón de ratón, por precipitación del complejo hormona-receptor con sulfato amónico. Simultáneamente se mide el coeficiente de sedimentación (S) por centrifugación en gradiente de sacarosa. El receptor se aísla con un 35% de sulfato amónico, y se elimina la hormona libre y la unión a proteínas no específicas, añadiendo al medio de suspensión albúmina. Con este sistema se precipita el 60% del receptor, apareciendo éste en la región 8 - 10 S del

gradiente. Por este procedimiento se observa que en próstata, tras períodos largos de incubación, la unión de DHT al receptor es más estable que la unión de testosterona, siendo más variables los resultados en riñón, y que el receptor no ocupado por hormona es más inestable que el unido (Verhoeven y col., 1975).

Otro procedimiento para determinar los receptores androgénicos citosólicos y nucleares, es mediante el método de precipitación con sulfato de protamina y el de gradiente de sacarosa. Aunque la precipitación sólo es selectiva para el receptor no es del todo completa (Menon y col., 1977). Se obtienen mejores resultados si se precipita el receptor antes de la incubación (Zava y col., 1979). Cuando el gradiente es empleado, se separan perfectamente la SHBG del receptor, por medio de dos picos bien definidos (Menon y col., 1977; Wilbert y col., 1983).

También se han determinado receptores citosólicos por isoelectroenfoque en gel de agarosa, observándose que la resolución de la técnica es mayor si se utiliza tejido fresco en vez de congelado, e inhibidores de proteasas (Razel y col., 1985). En gel de poliacrilamida se han determinado receptores

androgénicos citosólicos y nucleares, ambos con un punto isoeléctrico de 6 (Auf y Ghanadian, 1981).

El método que separa la fracción unida de la libre por medio de la filtración en gel (Sephadex G-25 o G-100) del incubado ha sido empleado para determinar receptores de estrógenos citosólicos, y separa claramente la unión específica de la no específica, utilizando 100 a 300 mg de tejido. La disociación del esteroide, por unión al gel, se evita trabajando con una cantidad de gel no superior a 3 mg (Godefroi y Brooks, 1973). Otro tipo de filtración en columna, desarrollado por Bowman y col. (1985), supone la retención de receptores androgénicos citosólicos en esferas de vidrio, con un tamaño y diámetro de poro controlado. Con este sistema se obtiene un coeficiente de variación intraensayo e interensayo del 6,8 % y 25,8 %, respectivamente.

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) se ha utilizado para determinar receptores de estrógenos citosólicos (Kirdani y col., 1982), y receptores estrogénicos y de progesterona, tanto citosólicos como nucleares, empleando un tampón fosfato salino (PBS) a pH 7,4, el cual reduce las interacciones entre el receptor y la columna (Pavlik y col., 1982).

Todos estos métodos tienen en común que el tipo de muestra usada para la determinación de receptores es homogeneizada, realizando las incubaciones con la hormona radio-marcada y el receptor, previamente extraído. Otro tipo de métodos determinan los receptores incubando la hormona con los receptores, dentro de la propia célula. Uno de ellos es el desarrollado para la determinación de receptores androgénicos totales, en cultivos de células de perro, obtenidos por aislamiento celular de próstatas de animales adultos. Con este método se determinan  $6624 \pm 4577$  sitios/célula (o  $2075 \pm 1434$  fmol/mg ADN), con una KD de  $2 \pm 0,2$  Nm (Turcotte y col., 1988).

---

#### **4.- RECEPTORES ANDROGENICOS Y PROSTATA**

---

En el adulto, la próstata es un órgano glandular fibromuscular y elástico, situado debajo de la vejiga, rodeando la uretra posterior (uretra prostática), la cual atraviesa excéntricamente de arriba a abajo. Tiene forma de cono truncado,

achatada en el sentido anteroposterior. Dos conductos eyaculadores atraviesan la próstata, desembocando en el verumontanum (en la porción apical de la uretra prostática). La cara anterior está en contacto con la sínfisis del pubis y la posterior con la cara anterior del recto (García de la Peña, 1981).

La función de la próstata es producir el líquido prostático, el cual constituye el 26 % del semen. Este líquido está compuesto por fosfatasa ácida, antígeno prostático específico (PSA), lactato deshidrogenasa (LDH), transferrina, inmunoglobulinas, Cinc, entre otros componentes. (Daniels y Grayhack, 1991).

La glándula prostática está compuesta por elementos glandulares y un estroma. Está recubierta de una cápsula tensa, compuesta por tejido fibroso y músculo liso, que se continúa con el tejido muscular de la vejiga y de la uretra. Esta cápsula envuelve al parénquima glandular y al estroma, constituido por tejidos conjuntivo y elástico y células musculares lisas. Las glándulas prostáticas están incluidas en el estroma, y desembocan en unos conductos excretores que penetran en la zona distal de la uretra

prostática. La próstata está constituida por una serie de lóbulos: anterior, laterales, medio, posterior, subcervical y subtrigonal, aunque algunos autores no reconocen esta disposición lobular de la próstata. El lóbulo posterior deriva del endodermo y el resto de la próstata del mesodermo (García de la Peña, 1981). Según Gil Vernet (1953) la próstata se dividiría en glándula caudal (constituida por los lóbulos posterolaterales), glándula craneal (formada por las glándulas submucosas y extraesfinterianas y por el lóbulo medio preespermático) y glándula intermedia. En la zona craneal se desarrolla la Hiperplasia Benigna Prostática (HBP) y en la craneal el carcinoma. Sin embargo, para McNeal (1972) la próstata está formada por dos zonas: una central y otra periférica. La zona central corresponde a un tercio de la masa total de la glándula y constituye la base de la próstata. Posee un estroma fibromuscular denso. La zona periférica forma el vértice de la próstata. Estas dos zonas poseen componentes glandulares funcionalmente activos. Además existen una zona de transición y glándulas periuretrales, rodeando la uretra proximal, funcionalmente no activa.

Se puede considerar que la zona central y la glándula craneal, y la zona periférica y la glándula caudal son homólogos (Blacklock, 1991).

La próstata crece a lo largo de la vida del individuo por un estímulo androgénico. Desde el nacimiento hasta la pubertad, la próstata se desarrolla más en la zona central, mostrando un aumento de los acini. Esto hace suponer que esta zona es menos dependiente al estímulo androgénico. La próstata crece hasta unos 20 g, aproximadamente, en la pubertad, y el desarrollo acinar es uniforme en las zonas central y periférica, siendo esta última zona más andrógenodependiente. En la quinta década se aprecian cambios atróficos en el epitelio prostático. Con el envejecimiento, los cambios atróficos se producen sobre todo en la zona periférica (Blacklock, 1991).

Como se ha visto anteriormente en el mecanismo general de acción de los esteroides, el estímulo androgénico sobre la próstata se ejerce vía receptores específicos. Mainwaring (1969) caracterizó un receptor específico para DHT en el citosol obtenido de próstatas de ratas. Posteriormente se

determinaron, en próstata ventral de rata, receptores androgénicos citosólicos y nucleares, tanto ocupados como libres (Davies y col., 1977; Boesel y col., 1980). Se ha observado que el número de receptores citosólicos y nucleares era menor en ratas viejas que en jóvenes, por estudios realizados in vivo e in vitro. El número de receptores citosólicos disminuía significativamente según la edad del animal, siendo el número de sitios/célula para ratas de 185 días de edad:  $9600 \pm 1000$ ; 552 días de edad:  $4165 \pm 440$  y 884 días de edad  $1365 \pm 335$  (Shain y col., 1975). Estos resultados fueron confirmados por otros estudios, los cuales obtuvieron diferencias significativas en el número de receptores androgénicos, entre animales de distinta edad:  $7770 \pm 3830$  y  $2330 \pm 495$  sitios/célula para receptores citosólicos y nucleares, respectivamente en ratas viejas (730 días) y  $15940 \pm 3900$  y  $3750 \pm 960$  sitios/célula para receptores citosólicos y nucleares, respectivamente en jóvenes (170 días) (Boesel y col., 1980). Adicionalmente las próstatas ventrales de ratas de mayor edad presentaban menor peso que las jóvenes, así como una disminución en el contenido protéico y de ADN en la fracción citosólica, no observándose variaciones en el núcleo. Si a estas ratas se las administraba 2,5

mg de propionato de testosterona, el número de receptores citosólicos y nucleares aumentaba a valores similares a los de las ratas jóvenes, y este aumento era significativo con respecto a las no tratadas de la misma edad. Además, el peso de la próstata aumentaba significativamente en todas las edades con respecto a las no tratadas, siendo mayor el aumento en las ratas más viejas. También aumentaba el contenido protéico en el citosol, sin cambios en el contenido de ADN. Al igual que en el grupo no tratado, tampoco se observaron cambios en la fracción nuclear (Boesel y col., 1980). Sin embargo, otros estudios no han hallado un aumento en el peso de la próstata con la edad (Motta y col., 1986), e incluso ni siquiera se han detectado receptores citosólicos en ratas viejas, siendo éstos medibles en animales jóvenes (Greenstein, 1979).

Es un hecho bien conocido que la frecuencia del desarrollo de la Hiperplasia Benigna Prostática es mayor según avanza la edad. Este crecimiento de la próstata característico sólo se produce naturalmente en el hombre y en el perro (Wilson, 1980; Horton, 1984), posiblemente debido a que estas dos especies son las únicas donde los conductos deferentes van

hacia la uretra atravesando la próstata, y puesto que a estos conductos acompaña siempre la vena deferente (cuya concentración de esteroides es similar a la de la vena testicular), la próstata se halla bajo un alto y continuo estímulo androgénico (Griffiths y col., 1991). En el hombre el crecimiento del tejido produce obstrucción urinaria, mientras que en el perro la obstrucción es rectal (Karr y col., 1984). En la HBP humana aparecen nódulos de crecimiento que comienzan a desarrollarse en la zona de transición, con la participación de las glándulas submucosas que rodean la uretra y del estroma fibromuscular del esfínter preprostático (McNeal, 1972; Jones y col., 1990). Este estroma presenta una hiperproducción de colágeno tipos I y III (Bartsch y col., 1991). El aumento progresivo de estos nódulos produce una separación de las fibras del esfínter preprostático, y a veces conduce a su desintegración. El tejido hiperplásico invade la uretra y desplaza la zona periférica (Blacklock, 1991). En el perro, la hiperplasia es debida a un aumento del tamaño y del número de los acini glandulares. En próstatas hiperplásicas de perro se han aislado tres tipos de células: secretoras, no secretoras y fibroblastos, siendo las secretoras las encontradas en mayor

proporción. Por otra parte, no se ha hallado una correlación entre la relación de células secretoras/no secretoras y el tamaño de la glándula (Chevalieur y col., 1980).

Según Wilson (1980), el desarrollo de HBP es el resultado de la acumulación de DHT en el interior de la próstata. Esta hipótesis es consecutiva a la inducción experimental de HBP en animales y al hallazgo de altos niveles de DHT dentro de la glándula prostática hiperplásica. Además, los estrógenos actuarían sinérgicamente con los andrógenos.

Estudios en monos hallaron un aumento del peso y volumen prostático, tras la aplicación de testosterona. Este aumento era mayor en el lóbulo caudal, aunque el craneal también aumentaba, y era debido a una hiperplasia glandular y estromal junto con el desarrollo de una fibrosis (Karr y col., 1984). Jacobi y col. (1978) indujeron en perros castrados una hiperplasia de próstata administrándoles  $3\alpha$ -androstenediol. También, por el mismo tratamiento, restablecieron el tamaño original de próstatas hiperplásicas, cuyo tamaño había

disminuido tras la castración. Este metabolito tiene una marcada androgenicidad y puede ser oxidado a DHT (Farnsworth y Brown, 1963).

El  $3\beta$ -androstenediol no tiene influencia sobre el crecimiento de la próstata. Sin embargo la DHT puede mantener el tamaño de la glándula al ser administrada a perros castrados, que inicialmente presentaban hiperplasia. Además se ha comprobado en animales castrados una disminución de la actividad enzimática de la  $3\alpha$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa, la cual es recuperada tras la aplicación de  $3\alpha$ -androstenediol. Si los animales eran tratados con  $3\alpha$ -androstenediol junto con  $17\beta$ -estradiol, el aumento de la próstata era mayor que con el andrógeno sólo. Sin embargo el  $17\beta$ -estradiol junto con DHT no producía ningún efecto sobre el tamaño prostático (Farnsworth y Brown, 1963).

Moore y col. (1979) desarrollaron una hiperplasia en perros por tratamiento con  $3\alpha$ -androstenediol, con DHT y  $17\beta$ -estradiol o con altas dosis de DHT. Así mismo encontraron que en todas las próstatas, tanto normales como hiperplásicas naturales o inducidas por

3 $\alpha$ -androstenediol, el andrógeno predominante era la DHT. La concentración intraprostática de DHT se correlacionaba con el peso de la glándula, mientras que ésto no ocurría con el 3 $\alpha$ -androstenediol. También se hallaron en próstatas hiperplásicas de humanos una mayor concentración de DHT que de 3 $\alpha$ -androstenediol, siendo al revés en próstatas normales. La DHT estaba localizada fundamentalmente en el núcleo de próstatas normales y con HBP, mientras que el 3 $\alpha$ -androstenediol no se detectaba en las últimas. Además el contenido de DHT era menor en próstatas normales que en HBP, y en éstas últimas la hormona estaba más concentrada en el estroma que en el epitelio (Bartsch y col., 1982; Krieg y col., 1983).

El contenido de ADN es mayor en el estroma de próstatas hiperplásicas, mientras que en el epitelio la cantidad de ADN es similar en próstatas normales y con HBP (Bartsch y col., 1982). Sin embargo, en otros estudios no se halló diferencias en cuanto al contenido de DHT entre próstatas normales e hiperplásicas (Walsh y col., 1983). También se ha observado que la DHT está más concentrada en próstatas con HBP que en plasma. Sin embargo en el caso de la testosterona ocurre todo lo contrario (Krieg y col., 1977).

Los niveles de DHT acumulados en la próstata dependen de:

- La entrada de testosterona en la célula.
- La tasa de reducción de testosterona a DHT.
- La cantidad de receptor disponible para unir a la DHT.
- La cantidad de aceptores nucleares para la unión del complejo receptor-DHT.
- La tasa de degradación de DHT a metabolitos inactivos.

Por tanto, para favorecer el efecto androgénico debe haber una adecuada oferta e internalización de testosterona, actividad normal de la enzima 5 $\alpha$  reductasa, presencia de receptores citosólicos y/o nucleares, así como la existencia de aceptores nucleares, y una disminución de la actividad de la enzima 3-hidroxiesteroide dehidrogenasa (Geller y col., 1976).

La entrada de testosterona en la célula depende en parte de los niveles séricos de la hormona. La testosterona libre es la que actúa sobre los órganos diana, y disminuye con la edad significativamente a partir de los 50 años (Vermeulen y col., 1971). Esta

disminución de la testosterona con la edad, también ha sido observada en ratas (Motta y col., 1986). Además existe un aumento significativo entre los niveles de SHBG y la edad, hallándose mayor SHBG en pacientes con cáncer de próstata, que inicialmente habían sido castrados. Este aumento de la SHBG con la edad también ha sido observado por otros autores (Horst y col., 1974; Bartsch y col., 1977; Dennis y col., 1977), siendo mayor la unión a esta proteína para la DHT que para la testosterona (Horst y col., 1974; Krieg y col., 1977). Tanto en pacientes con HBP como los afectados de cáncer de próstata, previamente tratados con estrógenos, se observa mayor unión de estos andrógenos a la SHBG que en individuos controles (42 - 67 años), aunque ésta mayor unión pudiera relacionarse con la mayor edad de estos grupos (62 - 85 y 49 - 82 años, respectivamente), pudiéndose deducir de los resultados de estos autores y de los anteriormente citados, que tanto el aumento de los estrógenos como la disminución de los andrógenos estimulan la síntesis de SHBG. Este hecho a sido confirmado por otros autores (Bartsch y col., 1977; Dennis y col., 1977) al observar un aumento en la capacidad de unión de la SHBG al tratar con estrógenos a individuos previamente castrados,

habiendo comprobado anteriormente que la SHBG en pacientes con cáncer, sin tratar, no difiere respecto a pacientes con HBP. Puesto que existe una correlación entre la SHBG plasmática y la localizada en el citosol de próstatas hiperplásicas, se puede deducir que la aparición de esta proteína en la próstata puede ser de origen plasmático, y no por síntesis de la propia glándula (Krieg y col., 1977).

La unión del andrógeno a la SHBG influye sobre la captación de DHT por parte del tejido. La influencia que ejerce esta unión de DHT sobre la captación, conversión y acción de la hormona, por parte de la próstata de rata, fue observada por Lasnitzki y Franklin (1975) utilizando explantes. La captación de DHT por parte del tejido, disminuye según aumenta su concentración en el suero (utilizando sueros de animales, de mujeres gestantes y de hombres), aunque con suero de mujer gestante esta captación es significativamente más baja. Esto es debido a que en el suero de mujeres embarazadas los niveles altos de estrógenos aumentan esta  $\beta$  globulina con respecto al hombre, lo que hace que la unión de DHT sea mayor, aparte de que los estrógenos compitan con la DHT por la unión a la SHBG. Por

tanto, sólo la forma libre es la disponible para ser acumulada en la próstata y el grado de unión a proteínas regula la acción biológica del esteroide. La captación de testosterona por parte de la próstata hiperplásica es similar a la de la próstata carcinomatosa, pero la conversión de testosterona a DHT es significativamente mayor en HBP (61,7 %) que en cáncer (13 %) (Prout y col., 1976).

La actividad de la enzima  $5\alpha$  reductasa es mayor en el estroma que en el epitelio de próstatas con HBP. Esta mayor actividad favorece la formación de DHT, en el estroma (Krieg y col., 1981). En ratas, se observa que con la edad disminuye significativamente la formación de DHT y dioles, aumentando sin embargo la formación de androstenodiona, deduciéndose que la actividad de la  $5\alpha$  reductasa disminuye con la edad en estos animales, y es por ello por lo que las ratas no desarrollan una HBP naturalmente (Motta y col., 1986).

La existencia de receptores para los andrógenos en HBP también puede influir en la acumulación de DHT dentro de la próstata, y el papel de los estrógenos debe ser tenido en cuenta. Se han caracterizado

receptores androgénicos en el citosol (Hansson y col., 1971; Mainwaring y Milroy, 1973; Murthy y col., 1984) y el núcleo (Hansson y col., 1971) de próstatas humanas con HBP. Estos receptores poseen mayor afinidad por la DHT que por la testosterona en próstatas hiperplásicas (Wilbert y col., 1983). También se han caracterizado receptores citosólicos y nucleares ocupados y libres, observándose que los receptores citosólicos ocupados están unas cinco veces más concentrados que los libres (Shain y col., 1978). Además, se ha obtenido una correlación negativa entre receptores citosólicos en próstatas con HBP y la cantidad de testosterona y DHT intratisular. Por otra parte, no se ha hallado una correlación entre el número de receptores y la concentración plasmática de estos andrógenos (Krieg y col., 1977).

En estudios con monos se encontró un mayor número de receptores citosólicos y nucleares en el lóbulo caudal de la próstata. Si a estos animales se les trataba con testosterona, los receptores citosólicos eran mayores en el lóbulo caudal, mientras que los nucleares lo eran en el craneal (Karr y col., 1984) También se han identificado

receptores de andrógenos y estrógenos citosólicos en células epiteliales de próstata de perro, teniendo las células no secretoras un mayor número de receptores androgénicos que las secretoras, mientras que no existe diferencias en el número de receptores estrogénicos en ambos tipos de células (Lamarre y col., 1985). En humanos, sin embargo, los receptores androgénicos citosólicos se hallan distribuidos por igual en el estroma y en el epitelio de próstatas con HBP, mientras que los estrogénicos se hallaban en mayor proporción en el estroma (Krieg y col., 1981). Por el contrario, en otros estudios se observó que la distribución de receptores androgénicos citosólicos era mayor en zonas glandulares que en el estroma, hallándose una correlación entre el número de receptores y la proporción de componentes glandulares (Bowman y col., 1986). En este estudio, utilizando homogenados de tejidos, se detectó un aumento significativo en el número de receptores androgénicos citosólicos en la zona periférica, con respecto a la zona periuretral, tanto en muestras de HBP como en las de cáncer, no hallándose receptores de estrógenos en ninguna zona. Esta distribución de receptores ha sido confirmada por otros autores (Kiprianou y Davies, 1986), así como por estudios

autorradiográficos, hallándose una localización de receptores androgénicos significativamente mayor en el epitelio que en el estroma (exclusivamente nuclear), de próstatas humanas con HBP (Peters y Barrack, 1987; Hulka y col., 1987; Lasnitzki y col., 1989). Otros trabajos, sin embargo, no encuentran diferencias en el número de receptores citosólicos y nucleares en ambas zonas (Trachtenberg y col., 1982).

El número de receptores androgénicos es menor en próstatas normales que en hiperplásicas (Lieskovsky y Bruchovsky, 1979; Barrack y col., 1983; Grimaldo y Meikle, 1984; Donnelly y col., 1984), aunque otros estudios no hallan diferencia alguna en cuanto al número de receptores en los dos tipos de próstatas (Trachtenberg y col., 1982). También se han determinado receptores de progesterona (Ekman y col., 1979; Tilley y col., 1980) y de estrógenos (Tilley y col., 1980) en próstatas con HBP. Ekman y col. (1979) vieron que el número de receptores de progesterona era significativamente menor que el de andrógenos, y no hallaron ninguna correlación entre la edad del paciente o el peso del adenoma y la cantidad de cualquiera de los dos tipos de receptores. Sin embargo, en otros estudios se observó que existía una

correlación entre el número de receptores estrogénicos o de progesterona y la edad, aunque no había relación con el peso del tejido (Tilley y col., 1980).

En estudios en perros con HBP, se ha visto que el número de receptores nucleares aumenta con la edad, no ocurriendo así con los citosólicos. Además, el tratamiento a perros castrados con estradiol y androstenodiol produce, aparte del desarrollo de HBP, un aumento significativo de los receptores androgénicos con respecto a los animales tratados sólo con androstenodiol, y una reducción en el número de receptores estrogénicos nucleares (Trachtemberg y col., 1980). Un estudio realizado en 41 hombres con HBP (55 - 83 años), mostró una correlación positiva entre la concentración sérica de estradiol y la proporción de tejido fibromuscular de próstata, así como un aumento significativo de excreción estrogénica urinaria y la proporción de estroma en las muestras estudiadas (Seppelt, 1978). Por otra parte, otros autores no han hallado una correlación entre el número de receptores androgénicos citosólicos y la edad de los pacientes con HBP, ni tampoco con el peso del adenoma (Ekman y col., 1979);

Corrales y col., 1983). En perros tampoco se ha observado una correlación entre el peso de la glándula y el número de receptores (Lamarre y col., 1985).

La enzima 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa se localiza preferentemente en el epitelio de próstatas con HBP (Krieg y col., 1983; Tunn y col., 1987). Con la edad del paciente la actividad de esta enzima está disminuida tanto en el epitelio como en el estroma, deduciéndose que según avanza la edad, la metabolización de la DHT disminuye (Tunn y col., 1987). Sin embargo, en ratas la actividad de esta enzima aumenta con la edad (Motta y col., 1986).

Aparte de la DHT, también se ha propuesto que otros factores pueden ser importantes en la patogenia de la HBP. Los factores de crecimiento, incluidos el epidérmico, somatomedinas e insulina, han sido hallados en próstatas de animales y humanas (Griffiths y col., 1991), y se han llegado a correlacionar los receptores para el factor de crecimiento epidérmico con los receptores androgénicos (totales y nucleares) (Frydenberg y col., 1991).

Los tratamientos contra la HBP han sido dirigidos contra todos los mecanismos que favorecen la acumulación de DHT dentro de la próstata. Varios de estos tratamientos se muestran en la tabla I.

Como es bien sabido, el cáncer de próstata representa un modelo de neoplasma en la vejez, siendo la enfermedad más frecuente en los hombres mayores de 70 años. Factores pronósticos son, hasta el momento, el estradiol, dimensión del tumor primario, niveles de fosfatasa ácida sérica, número de metástasis, grado de obstrucción uretral y edad del paciente. Ultimamente también se ha aplicado la determinación sérica del antígeno prostático específico (PSA) como método de diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata. La especificidad de este antígeno, es alta, y su utilidad como marcador tumoral es objeto de controversias (Killian y Chu, 1990; Ferro y col., 1987; Morote y col., 1986; Stamey y col., 1987). No obstante, el tratamiento de las metástasis requiere la exclusión del efecto androgénico. Actualmente, en lugar de la orquiectomía y los estrógenos, los análogos de la LHRH tienen actualmente gran difusión (Balducci y col., 1989).

El promedio de supervivencia, a partir del momento del diagnóstico, es de 21,2 meses, siendo la mediana un año y el intervalo desde algo menos de un mes hasta 15 años (Whitmore, 1984). Estas grandes diferencias pronósticas están lógicamente relacionadas con el potencial de malignidad del tumor, lo que es una consecuencia de su biología, si bien la caracterización biomolecular todavía no ha sido llevada a cabo. No obstante, desde hace algún tiempo se espera, de la determinación del número de receptores androgénicos en tejido prostático, una ayuda para el tratamiento del cáncer de próstata, de la misma forma que se realiza para el cáncer de mama con los receptores estrogénicos y de progesterona. De cualquier forma hay una absoluta necesidad de nuevos marcadores para su detección precoz, ya que los hasta ahora conocidos no cumplen con este cometido (Klein, 1979). Una recopilación de los estudios realizados en cáncer de próstata, y su relación con los receptores androgénicos, se muestra en la tabla II.

La patogenia del cáncer de próstata es motivo de discusión desde hace décadas. Harper y col., 1987 estudian 197 enfermos clasificados según la escala de Gleason, y no encuentran una relación clara entre los

niveles de testosterona total, LH, FSH y prolactina con los grados de la escala mencionada. En cambio, llama la atención niveles moderadamente elevados de hormona de crecimiento y el grado de Gleason (desde 3,3  $\mu\text{U/ml}$  en grado 3A, hasta 5,2  $\mu\text{U/ml}$  en grado 5B). Por otro lado, Buttyan y Olsson (1984) revisan su propio material y la bibliografía, y llegan a la conclusión que no se puede relacionar una determinada situación bioquímica del enfermo con el pronóstico del cáncer prostático. Los distintos tratamientos del cáncer de próstata, y su efecto sobre los niveles de receptores de andrógenos se sumarizan en la tabla III.

TABLA I

INFLUENCIA DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS SOBRE EL CONTENIDO DE RECEPTORES DE ANDROGENOS DE LA PROSTATA HIPERPLASICA.

AUTORES	RANGO DE EDAD	TIPO DE RECEPT	DURACION DEL TRATAM.	NUMERO RECEPT. ANTES	NUMERO RECEPT. DESPUES	TIPO DE TRATAMIENTO	COMENTARIO
Forti y col. (1989)	64 - 80	cit. nucKCl nuc(m)	3 meses	8,3±1,5 152-549 29 - 96	18,5-43 2 - 70 5 - 59	Agonistas de GnRH	Comparan tratados con controles (no tratados) Cit = fmol/mg proteína núcleo = fmol/mg ADN m=matriz, KCl=extraible
Albert y col. (1984)	---	cit. nucleo	10 días	346±130 257± 62 fm/ADN	257±79 103±70 fm/ADN	antiestrógeno (Tamoxifén)	Comparan tratados con controles (no tratados)
Petrangeli col. (1988)	---	cit. núcleo	25 - 30 días	65-13,4 208-19 fm/ADN	105±10* 36 - 7ç 0	Tamoxifen+ACP (acet.ciprot) y Flutamida (antiandróg.)	Comparan tratados con controles (no tratados) * con ACP; ç con Flutamida
Carilla y col. (1984)	---	cit.	---	82 - 14 fmol/p.	Inhibe unión	Extract lipid esteróico	Estudio en ratas. El lipid de Serenoa Repens

TABLA II

RECEPTORES ANDROGENICOS EN EL CANCER DE PROSTATA SEGUN ESTUDIOS DE DISTINTOS AUTORES.

AUTORES	RANGO DE EDAD	TIPO DE RECEPTOR	RECEPTORES	COMENTARIOS
Barrack y col. (1983)	---	citosólico nuclear total	364 ± 26 fmol/DNA 355 ± 23 fmol/DNA 719 ± 34 fmol/DNA	Sin diferencias en el número de receptores citosólicos en HBP y cáncer. Menor número de recep nucleares y totales en cáncer que en HBP.
Shain y col. (1983)	---	citosólico nuclear	750 ± 95 fmol/DNA 350 ± 30 fmol/DNA	Sin diferencias en el número de receptores entre HBP y cáncer
Krieg y col. (1978)	---	citosólico	6 - 93,5 fmol/prot	En cáncer, recept. de androg. < signif. que recept. de estrog. Cáncer > nº recept. y SHBG que en HBP. Correlación entre SHBG citosólica con SHBG de plasma. Diferencias en metabolismo de andrógenos entre HBP y cáncer.
Ghanadian y col (1978)	---	citosólico	52 - 525 fmol/prot	En cáncer > nº de recept. que en HBP. Disminución del nº de recept. totales, aunque aumenta el nº de libres.
Rio y Offner (1982)	57 - 84	citosólico	22 - 183 fmol/prot	Sin diferencias en el nº de recep. androg. y estrog. en HBP y cáncer. En HBP > nº de recep. de progesterona que en cáncer. No hay correlación con la edad.

AUTORES	RANGO DE EDAD	TIPO DE RECEPTOR	RECEPTORES	COMENTARIOS
Ekman y col. (1979)	62 - 86	citósólico	0 - 318 fmol/prot	Correlación entre nº de recept. y respuesta al tratamiento.
Shain y col. (1980)	58 - 73	totales	648 ± 340 fmol/DNA	Sin diferencias en el número de receptores entre HBP y cáncer. El nº de recep. es > en tejido sin cáncer que en cáncer, para la misma muestra
Trachtemberg y Walsh (1982)	52 - 79	citósólico nuclear totales	0 - 515 fmol/DNA 28 - 625 fmol/DNA 59 - 925 fmol/DNA	No hay correlación en el nº de receptores totales y citosol. y grado del tumor, ni con la respuesta o supervivencia, aunque sí con los nucleares.
Lieskovsky y Bruchovsky, 1979	52 - 77	nucleares	1900 ± 200 molec. núcleo	Menor nº de receptores en HBP y próstata normal que en cáncer.
Wagner y Schulze (1978)	59 - 79	citósólico	0 - 300 fmol/g tej	Sin correlación con respuesta.
Castellanos, col (1984)	---	citósólico	2 - 190 fmol/prot	Sin diferencias entre cáncer tratado y no tratado, ni con HBP. Hay correlación con la respuesta.
Krieg y col. (1978)	63 - 76	citósólico	6 - 93,5 fmol/prot	En cáncer > nº de receptores y SHBG y menor metabolismo de andrógenos que en HBP.
Gorelic (1987)	---	nuclear citósólico	106 fmol/DNA 304 fmol/DNA	No hay correlación con la supervivencia. Hay variaciones

		totales	453 fmol/DNA	regionales en el nº de receptor
AUTORES	RANGO DE EDAD	TIPO DE RECEPTOR	RECEPTORES	COMENTARIOS
Benson y col. (1985)	---	citosólico nuclear	17 ± 4,5 fmol/prot 47 ± 13 fmol/prot	En cáncer > nº de receptores que en HBP. Hay correlación con el estado del tumor. (* ) cáncer sin regresión.
		citosólico * nuclear *	188 ± 87 fmol/prot 53 ± 12 fmol/prot	
Habib y col. (1986)	---	citosólico nuclear	0 - 230 fmol/g tej 0 - 211 fmol/g tej	Sin diferencias en el número de receptores entre HBP y cáncer. Correlación entre receptores citosólicos y nucleares, en HBP y en cáncer. Mayor nº de recept en pacientes con metástasis.
Emtage y col. (1989)	49 - 87	citosólico nuclear	5 - 189 fmol/prot 6 - 186 fmol/prot	Sin diferencias en el número de receptores entre HBP y cáncer. En cáncer > nº de receptores de estrógenos que en HBP. E = receptores de estrógenos.
		citosólico E nuclear E	5 - 101 fmol/prot 3 - 113 fmol/prot	

TABLA III  
RECEPTORES ANDROGENICOS EN EL CANCER DE PROSTATA Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO ENDOCRINO.

AUTORES	RANGO DE EDAD	TIPO DE RECEPT	DURACION DEL TRATAM.	NUMERO RECEPT ANTES	NUMERO RECEPT. DESPUES	TIPO DE TRATAMIENTO	COMENTARIO
Wagner y Schulze (1978)	59 - 79	cit.	6 - 32 m	0-300 fmol/g tejido	---	dietestilbes.	
Castellanos y col(1984)	---	cit.	6m-3años	2-190 fmol/p	10-132 fmol/p.	orquiectomía + estrógenos	Comparan tratados con controles (no tratados)
Fentie y col (1986)	---	nucleo	22 meses	---	729±471 (vivos) 478±156 muertos	orquiectomía ó dietilestil	Receptores en fmol/g de tejido
Ghanadian y col (1978)	---	cit.	---	52-525 fmol/p	18-466 fmol/p.	orquiectomía + estrógeno ó acetatociprot	Comparan tratados con controles (no tratados)
Gustafsson col. (1982)	66 -86	cit.	---	0-218 fm/ADN	---	orquiectomía + estrógenos	
Trachtember Walsh, 1982	52 - 79	total cit. nucleo	13-38 m.	59-925 0-515 28-625	--- --- ---	orquiectomía + estrógenos	
Ekman y col (1978)	62 - 86	cit.	1-12 mes	0-318 fm/ADN	---	estrógenos	
Galán y col	---	cit.	6m-3años	2-190	10-132	orquiectomía	Comparan tratados con

## **OBJETIVOS**

La finalidad fundamental de este trabajo es estudiar el efecto de la edad sobre el comportamiento de los receptores de andrógenos en la próstata humana, considerando básicamente la circunstancia que, tanto la hiperplasia benigna de esta glándula como la degeneración carcinomatosa, son procesos cuya prevalencia aumenta a medida que avanza la edad.

Un objetivo primordial en el que se ha fundamentado este estudio es obtener resultados de andrógeno dependencia a través de una posible edad-dependiente modulación de receptores, que permitan llegar a interpretaciones de interés clínico, ya sea de aplicación terapéutica como para el seguimiento de los enfermos.

Entre los objetivos más específicos que se cumplen, cuando se obtienen resultados de una muestra de enfermos más o menos representativa, se encuentra la finalidad de objetivar interacciones o correlaciones entre el dato molecular de la próstata y las concentraciones sanguíneas de los distintos parámetros medidos, así como el grado de hiperplasia glandular.

Finalmente, se ha pretendido desarrollar una técnica que, en lógica consecuencia con lo anteriormente mencionado, permitiese un control estrecho en la evolución de la enfermedad, así como abrir una puerta hacia posibles medidas diagnósticas o preventivas

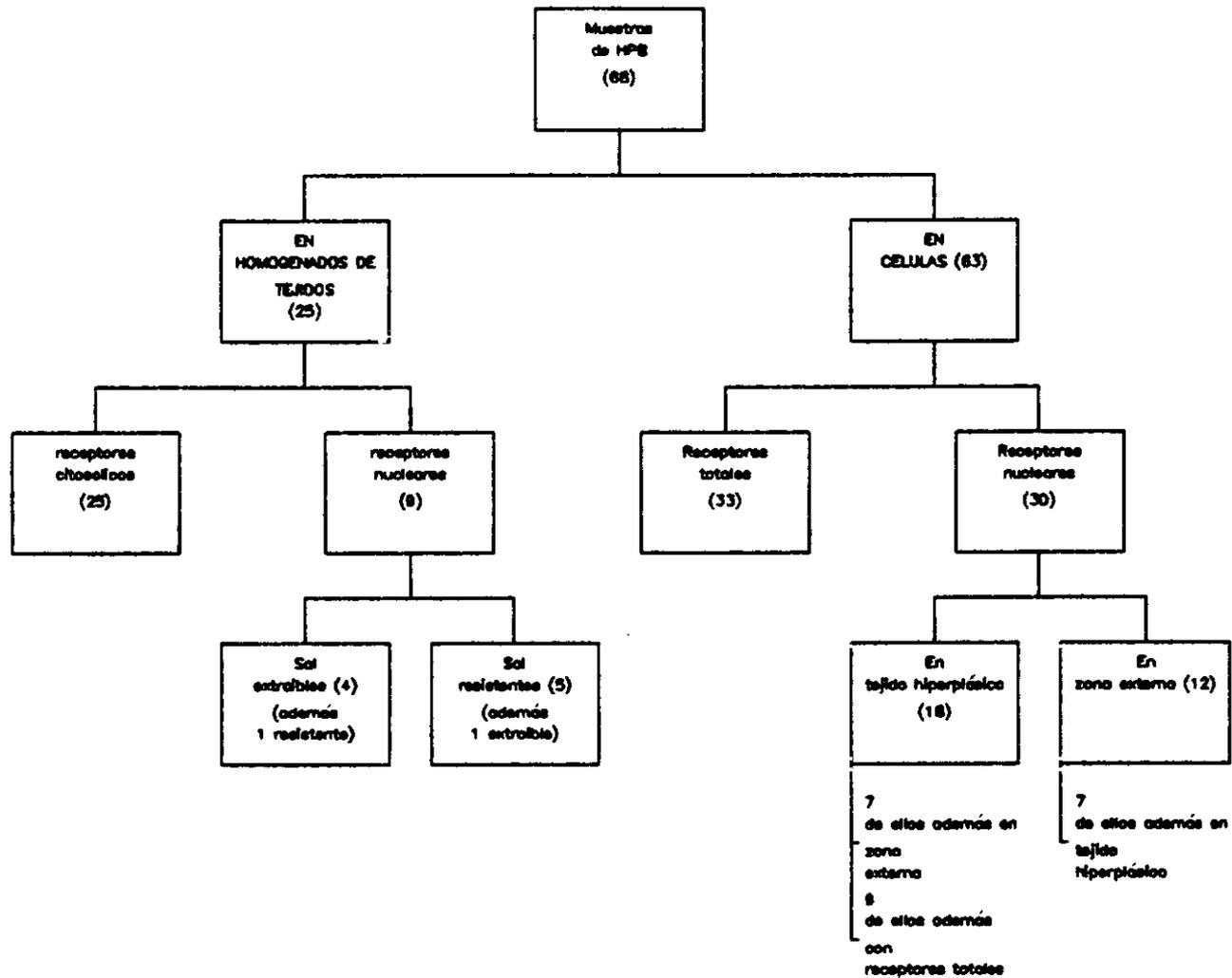
## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se han determinado 77 muestras de próstata humana. 68 de ellas corresponden a pacientes con Hiperplasia Benigna Prostática, con un intervalo de edad de 51 - 86 años, y 9 a pacientes con adenocarcinoma de próstata, con un intervalo de edad de 53 - 83 años.

De las muestras de próstatas con HBP, 13 de ellas fueron extraídas por resección transuretral y 63 por enucleación transvesical de la zona hiperplásica, y 12 por biopsia transrectal de la zona correspondiente al ápex de la próstata externa. La sistemática de trabajo empleada se muestra en el organigrama de la figura 3.

En los 9 pacientes afectados de cáncer, a 6, cuyo tejido se extrajo por medio de biopsia transrectal, se les determinó el número de receptores nucleares, según el método de las células dispersas. En los otros 3 se cuantificó el número de receptores totales en muestras obtenidas por resección transuretral, por el mismo método de dispersión celular.

# ORGANIGRAMA DE LA SISTEMATICA DE TRABAJO EMPLEADA



60

FIGURA 3

---

**MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE RECEPTORES POR  
HOMOGENEIZACIÓN DE LOS TEJIDOS.**

---

Tras la extracción quirúrgica, el tejido (0,245 - 2,3 g) se sumerge inmediatamente en nitrógeno líquido, y de esta forma es transportado al laboratorio para su proceso. Así se preservan los receptores, los cuales son muy termolábiles, y se facilita la pulverización del tejido. Todos los pasos seguidos a continuación se realizan en frío.

De los numerosos estudios sobre receptores esteroidéos, se ha llegado a una estandarización de los diferentes pasos seguidos para la cuantificación de receptores, como son: el tipo de muestra, la composición de los tampones, el almacenamiento, la temperatura de incubación, la expresión de los resultados, y todos los demás pasos seguidos para la determinación de receptores de esteroides (E.O.R.T.C. Breast Co-operative Group, 1980; Wagner y Jungblut, 1980; Trachtenberg y col., 1981; Shain y col., 1982;

Smith y col., 1983; Hechter y col., 1983). El trabajo de Leake y Habib (1987) describe todas estas condiciones con todo detalle.

Siguiendo el protocolo de Leake y Habib (1987) el tejido congelado se pulveriza para disgregar el tejido y facilitar la homogeneización. El pulverizador utilizado es de diseño propio y consiste en un cubo de acero inoxidable, de 8 cm de lado, con una cavidad cilíndrica torneada en una de sus caras, de 4 cm de profundidad y 4 cm de diámetro. Sobre esta cavidad encaja otro cilindro del mismo material de 8 cm de altura y 3,5 cm de diámetro. La muestra, previamente pesada se introduce en la cavidad cilíndrica del pulverizador, la cual contiene nitrógeno líquido, y golpeando el cilindro se consigue pulverizar el tejido. Este pulverizado se mezcla con un tampón de homogeneización en la proporción de 1 ml/100 mg de tejido, el cual está compuesto por:

- Tris.HCl 10 mM, a Ph 7,5.
- EDTA disódico 1,5 mM.
- Glicerol 10 % (v/v).
- PMSF (fluoruro de fenil-metil sulfonilo) 1 mM, disuelto en n-propanol, y actúa como inhibidor de proteasas.

El PMSF, por su acción antiproteasas estabiliza al receptor (Trachtenberg y col., 1981).

La homogeneización del tejido se realiza con un homogeneizador Ultraturrax T25 a máxima velocidad, en tres veces (de 5 segundos de duración cada vez), dejando enfriar el homogenado al menos durante 30 segundos cada vez. La homogeneización finaliza con un homogeneizador vidrio/vidrio. Del homogenado se toma una alícuota (500  $\mu$ l) para determinar ADN. El homogenado se centrifuga a 800xg, a 4° C durante 10 minutos. En el sobrenadante obtendremos la fracción citosólica y en el sedimento la nuclear.

---

#### OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN CITOSOLICA.

---

A la fracción citosólica se le añade molibdato sódico (10 mM) y DTT (ditiotreitol, 1 mM). El empleo del molibdato estabiliza el receptor, incluso a temperatura ambiente, previene la disociación del complejo esteroide-receptor, actúa como inhibidor de fosfatasas e impide la disociación a monómeros (Noma

y col., 1980; Gaubert y col., 1980; Smith y col., 1983 b; Carrol y col., 1984). La acción estabilizante del DTT es debida a su unión (por puentes disulfuro) con agentes que bloquean los grupos SH del receptor (Cleland, 1964). Ambos compuestos sólo se añaden a la fracción citosólica, ya que se ha descrito que el molibdato extrae receptores nucleares hacia el citosol (Trachtenberg y col., 1981; Barrack y col., 1983), y el DTT extrae receptores nucleares de la matriz celular, apareciendo éstos como receptores solubles (Barrack y col., 1983). Esta fracción se centrifuga a 105.000xg, 63 minutos a 4° C, en tubos de policarbonato, con una ultracentrifugadora Beckman, modelo L5-50B y un rotor 50Ti. El sobrenadante de esta centrifugación corresponde a la FRACCIÓN CITOSOLICA.

El cálculo de las revoluciones por minuto (RPM) y del tiempo de centrifugación (t) se realizó por la fórmula:

---


$$RPM = \frac{(RCF)^{1/2} \cdot 1000}{w/g \cdot r \cdot med^{1/2}}$$

siendo RCF el campo centrífugo relativo, o la "g" que hay que aplicar a la muestra; "g" la aceleración de

la gravedad; "w" la velocidad angular por segundo y rmed el radio medio o la distancia que existe desde el centro del rotor hasta la mitad del tubo (para este rotor el valor es de 64). En este cálculo, 105.000xg corresponden a 44.000 RPM.

Estas RPM se aplican durante 63 minutos, hallando t por la fórmula  $t = k/s$ , siendo k el factor de aclaración y s el coeficiente de sedimentación. k mide la eficacia relativa de cada rotor y se halla por:

$$k = \frac{\ln r_{\max}/r_{\min}}{w^2} \cdot \frac{10^{13}}{3600}$$

El valor de k es de 52, siendo un valor específico de cada rotor. s tomaría un valor de 49,52, consiguiendo sedimentar partículas subcelulares (microsomas, restos de membranas, ribosomas...) y obteniendo así sólo proteínas solubles en el sobrenadante, entre las que se hallan los receptores citosólicos.

---

## OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN NUCLEAR.

---

En el núcleo se extraen dos tipos de receptores, debido a su diferente fuerza de unión a la cromatina nuclear. Un tipo de receptores son los extraíbles con altas concentraciones iónicas, puesto que estarían unidos al núcleo por fuerzas electrostáticas. El otro tipo permanecería unido a la matriz nuclear, estando unidos a ella por enlaces hidrofóbicos (Barrack y Coffey, 1980). Al sedimento de la primera centrifugación (800xg) se le añade un tampón, cuya composición es la siguiente:

- Tris.HCl 10 mM, a pH 7,5.
- Sacarosa 0,25 M.
- Sulfato magnésico 5 mM.
- Triton X-100 al 0,1 % (v/v).
- PMSF (fluoruro de fenil-metil sulfonilo) 1 mM.

El empleo del Triton X-100, un detergente no iónico, elimina los fosfolípidos de membrana, facilitando la extracción de los receptores (Kline y col., 1981). Se deja actuar este tampón durante 10 minutos (en hielo) con agitación constante. Al cabo de este tiempo, se centrifuga a 800xg, 10 minutos a 4° C, desechando el sobrenadante. Se vuelve a repetir todo el proceso para obtener un sedimento que contiene los núcleos.

Este sedimento se resuspende en un tampón compuesto por:

- Tris.HCl 10 mM, a pH 7,5.
- ADNasa tipo I, 100 KU/ml.

Se deja actuar a la enzima durante una hora (en hielo), con agitación frecuente (cada 10 minutos), consiguiendo así disgregar la cromatina, para poder extraer más fácilmente los receptores. Después de este tiempo, se centrifuga a 800xg, 10 minutos a 4° C, eliminando el sobrenadante. El sedimento obtenido se resuspende en un tampón, cuya composición es:

- Tris.HCl 10 mM, a pH 7,5.
- Cloruro potásico 0,6 M.
- Cloruro magnésico 0,2 mM.

El cloruro magnésico en baja concentración solubiliza la cromatina, y previene la formación de un sedimento gelatinoso (Barrack y Coffey, 1980). El KCl extrae los receptores débilmente unidos al núcleo. Se deja actuar este tampón durante 30 minutos (en hielo), y al cabo de este tiempo se ultracentrifuga a 15.000xg, 15 minutos a 4° C. Se guarda el sobrenadante, y se repite otra vez todo el proceso con el sedimento restante. Se juntan los dos sobrenadantes, los cuales corresponden a la FRACCIÓN NUCLEAR SOLUBLE. El sedimento se resuspende en tampón Tris.HCl (10 mM, pH 7,5) - EDTA disódico (1,5 mM) y se homogeneiza en el Ultraturrax T25. Esta fracción corresponde a la FRACCIÓN NUCLEAR ASOCIADA A MATRIZ.

---

## DETERMINACIÓN DEL NUMERO DE RECEPTORES.

---

Para cuantificar los receptores se incuban 150  $\mu$ l de cada fracción (citoplasmática y nuclear: extraíble y asociada a matriz nuclear), por duplicado, con 50  $\mu$ l de distintas concentraciones (0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 3,5; 5 y 10 nM) de [3H]Mibolerona [3H](7 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -dimetil-19-nortestosterona), la cual tiene una actividad de 70 Ci/mmol y una pureza del 99,5 %. Paralelamente se incubaba la misma cantidad de cada fracción (150  $\mu$ l), también por duplicado, con las tres concentraciones mayores de [3H]Mibolerona, las cuales contienen un exceso de 200 veces Mibolerona no radioactiva (fría) (3,5nM [3H]Mib + 700nM Mib; 5nM [3H]Mib + 1000nM Mib y 10 nM [3H]Mib + 2000 Mib], para determinar las uniones del andrógeno, no específicas (UNE), según Chamness y McGuire (1975). Este compuesto de síntesis se une a los receptores de andrógenos con la misma afinidad que a los receptores de progesterona (Traish y col., 1986; Murthy y col., 1986), los cuales están

presentes en la próstata (Tilley y col., 1980; Rio y Offner, 1982), siendo por tanto necesario bloquear los receptores de progesterona, añadiendo a cada tubo de incubación Acetónido de Triamcinolona ( $1 \mu\text{M}$ ). Una ventaja que posee la Mibolerona es que no se une a la SHBG (Traish y col., 1986; Murthy y col., 1986). La incubación se realiza a  $4^\circ \text{C}$  durante 18 horas. Bajo estas condiciones, se determinan todos los receptores libres, y la mayoría de los ocupados (Hicks y Walsh, 1979; Trachtenberg y col., 1982). Una vez concluida la incubación, se separa la hormona no unida al receptor citosólico y al extracto nuclear soluble (tras tratamiento con KCl) por tratamiento con una suspensión de carbón activo recubierto de dextrano (0,25 % de carbón activo Norit A y 0,025 % de dextrano T-70) en tampón (Tris.HCl 10 mM y EDTA disódico 1,5 mM, a pH 7,5). Se añaden 500  $\mu\text{l}$  de esta suspensión a cada fracción, se mezcla y tras una centrifugación a 1200xg, durante 10 minutos, se recoge el sobrenadante para determinar la radiactividad asociada a la fracción. La radiactividad asociada a la fracción unida a la matriz nuclear, se extrae por tratamiento de ésta con etanol absoluto durante 30 minutos. Después de una centrifugación a 800xg, 10 minutos, el sobrenadante

alcohólico se recoge para determinar la radiactividad.

Todos los sobrenadantes anteriores (alcohólico y el resultante tras el tratamiento con el carbón) se decantan en un vial de centelleo, y se añaden 10 ml de líquido de centelleo (NE-265, Amersham), determinando las cuentas por minuto (cpm) en un espectrofotómetro Beckman LS 7000, durante un minuto. Las cpm se convierten a desintegraciones por minuto (dpm) según:  $dpm = cpm \times \% \text{ de rendimiento} \times 100$ . El porcentaje de rendimiento se calcula por el método del patrón interno, es decir añadimos a la muestra una cantidad de dpm conocidas, y se determina el tanto por ciento de dpm que determina el espectrofotómetro, por las cpm obtenidas, según la fórmula anterior. En este caso el porcentaje de rendimiento corresponde al 35,02 %

---

## **MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE RECEPTORES EN CÉLULAS INTACTAS.**

---

En este método se determina el número de receptores totales y nucleares en células aisladas de las muestras de próstatas extraídas quirúrgicamente y por medio de biopsias, las cuales se mantienen viables durante todo el desarrollo del método. Este método es una adaptación del trabajo de Colvard y col., (1988), por el cual estos autores determinan receptores estrogénicos en biopsias de tumores de mama.

---

### **DETERMINACIÓN DE RECEPTORES TOTALES.**

---

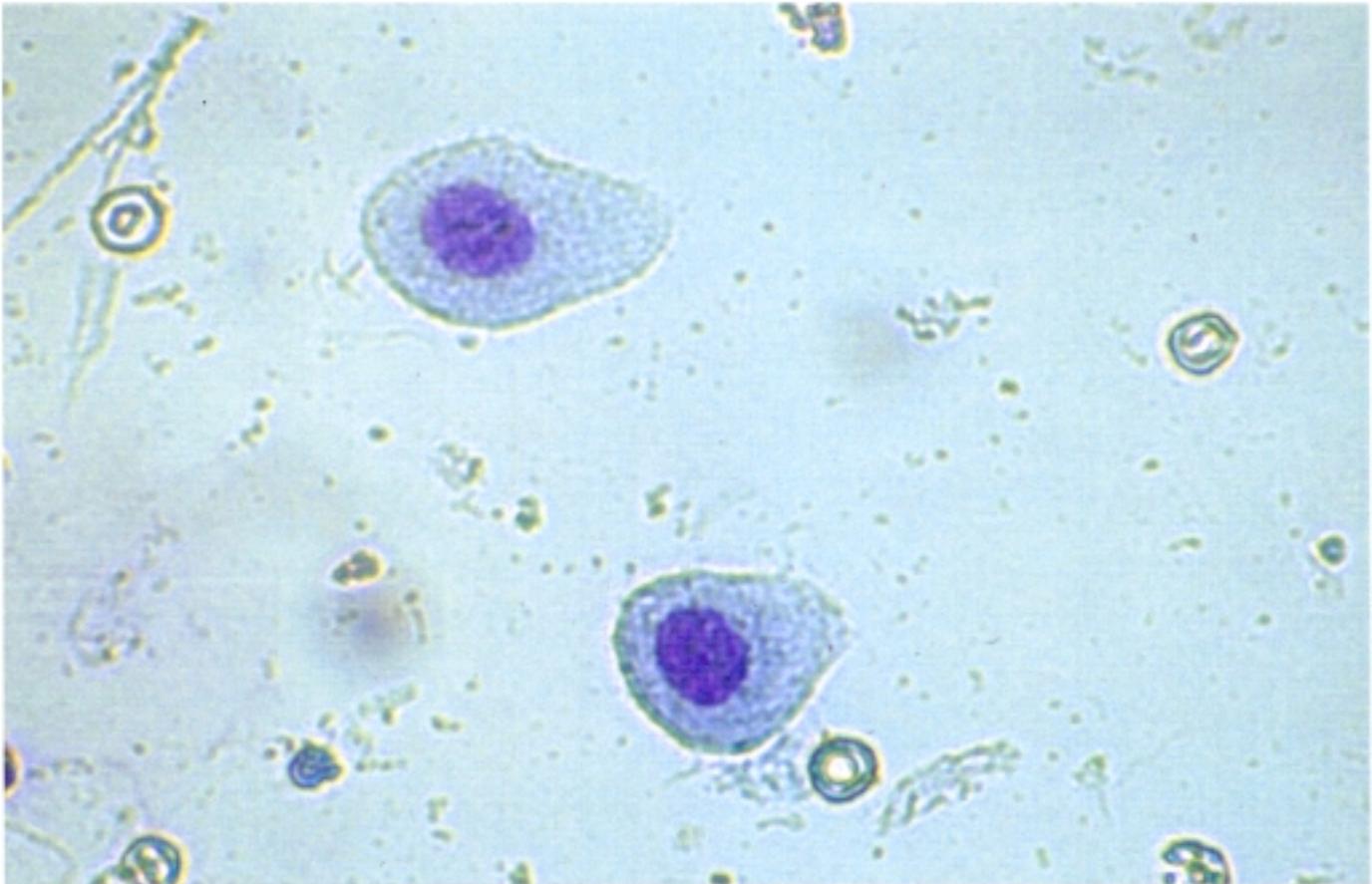
Las muestras de próstatas hiperplásicas ( $1,290 \pm 1,021$  g) o las biopsias ( $0,095 \pm 0,085$  g en HBP y  $0,051 \pm 0,012$  g en cáncer), una vez extraídas se introducen en un tubo de vidrio estéril (inmerso en hielo) que contiene medio de cultivo HAM'S F-12, y se

transportan de esta forma al laboratorio. El tejido se pesa y se corta con un bisturí, en una placa de Petri, la cual contiene el mismo medio de cultivo (sobre hielo), en fragmentos de unos 2 mm<sup>3</sup>, aproximadamente. Estos fragmentos se pasan a un tubo de vidrio que contiene 2 unidades de colagenasa tipo I por miligramo de tejido (1 g de colagenasa/litro de medio de cultivo), y se introduce en un baño de agitación a 37° C durante 60 minutos. Para facilitar la disgregación del tejido, se aspira éste con una pipeta Pasteur de vidrio, cada 15 minutos. Al cabo de los 60 minutos, se filtra la suspensión a través de una malla de acero inoxidable de 0,38 x 0,38 mm de luz, y se añade al filtrado el mismo volumen de medio de cultivo empleado para la disgregación, con un 4 % de albúmina bovina (p/v), para inactivar la colagenasa. El filtrado se guarda en nevera, y con los fragmentos que no han sido disgregados se realiza una nueva digestión con una solución nueva de colagenasa. Se juntan los dos filtrados, y se centrifugan en tubos cónicos de 12 ml a 600xg, 5 minutos. Tras un lavado del sedimento con 5 ml de medio de cultivo, para eliminar la colagenasa y restos de células rotas, se resuspenden las células en medio de cultivo, para determinar la integridad

celular y para la unión con [3H]Mibolerona. La integridad o viabilidad celular se realiza diluyendo una alícuota de la suspensión celular, 5 o 10 veces, con azul tripan (al 0,4 % en PBS (tampón fosfato salino), pH 7,2) (Adams, 1980). Las células cuyos núcleos no estén teñidos de azul, serán células viables. El número de células viables se cuenta en una cámara de Neubauer. Se toma una alícuota (200  $\mu$ l) para determinar ADN.

Alícuotas (150  $\mu$ l) de la suspensión celular se incuban, por duplicado, con 50  $\mu$ l de distintas concentraciones (0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 3,5; 5 y 10 nM) de [3H]Mibolerona, o con 50  $\mu$ l de una concentración saturante (5 nM) de [3H]Mibolerona, en biopsias o en aquellas muestras donde la cantidad de tejido obtenido (menos de 200 mg) es mínima. Para determinar las UNE, se incuba paralelamente la misma cantidad de la suspensión celular (150  $\mu$ l), por duplicado, con las tres concentraciones mayores de [3H]Mibolerona, las cuales contienen un exceso de 200 veces Mibolerona fría. En el caso de la incubación con una única concentración saturante de hormona (5 nM), se realiza una incubación paralela con un exceso de 200 veces hormona fría. Estas incubaciones se

realizan en un baño de agitación a 37° C, durante 60 minutos. Con estas condiciones se determinan los receptores libres y ocupados (Clark y Peck, 1978; Murthy y col., 1984), ya que, a la temperatura y tiempo empleados, prácticamente se obtiene un intercambio completo entre la [3H]Mibolerona con la hormona endógena (Clark y Peck, 1978; Spelsberg y col., 1987b). Al cabo de este tiempo, se para la incubación y se elimina la hormona no unida por adición de 5 ml de PBS (pH 7,2) frío, y tras una centrifugación a 1000xg, durante 5 minutos, se obtiene un sedimento celular. Con este procedimiento se obtienen células epiteliales aisladas, como se puede observar en la fotografía.



Células epiteliales de la próstata humana. Frotis realizado tras preparación mediante el método de dispersión celular, como se explica en el texto. Tinción de May-Grünwald Giemsa (x 100 aumentos)

---

## DETERMINACIÓN DE LOS RECEPTORES NUCLEARES

---

Los receptores nucleares se determinan realizando una incubación paralela con la misma suspensión celular que la empleada para los receptores totales. Todos los pasos seguidos son los mismos, hasta la obtención del sedimento celular. Este sedimento celular se resuspende en 1 ml de un tampón compuesto por:

- Tris.HCl 50 mM.
- KCl 10 mM.
- Glicerol 10 % (v/v).
- Triton X-100 1 %. (v/v).
- Albúmina bovina 1%. (p/v).

Se homogeneiza en Ultraturrax T25, a baja velocidad, y se vierte el homogenado sobre 0,5 ml de otro tampón (en un tubo Eppendorf de 1,5 ml), compuesto por el 1,4 M de sacarosa disuelta en el tampón anterior. Se centrifuga a 2500xg, 20 minutos, a 4° C. Con este procedimiento se obtienen, en el

sedimento, núcleos purificados, al eliminar contaminaciones debidas al citoplasma, membranas de vesículas, mitocondrias y lípidos (Donelly y col., 1984).

Los sedimentos celulares y nucleares obtenidos se tratan con 500  $\mu$ l de un disolvente de tejidos (Solvable, Dupont) para liberar la radiactividad retenida por las células enteras o por los núcleos. Se decantan estos 500  $\mu$ l en un vial de centelleo, y se añaden 4 ml de líquido de centelleo (Formula, Dupont), determinándose las cpm, durante 1 minuto, en un espectrofotómetro Beckman LS 7000. El cálculo de las dpm es igual que en el caso del método por homogeneización de tejidos. El porcentaje de rendimiento para este método es del 27,78 %.

---

**CARACTERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES NUCLEARES EN  
CÉLULAS INTACTAS.**

---

Para comprobar la especificidad del receptor por los andrógenos, se realizaron estudios de competición con distintos esteroides. El método de obtención celular y de determinación de la unión es el ya descrito. Se realizaron incubaciones paralelas con [3H]Mibolerona sólo o con [3H]Mibolerona más un exceso de 200 veces: Mibolerona, Testosterona, DHT, Estradiol u ORG 2058 frías, por triplicado. De la radiactividad asociada a las células se calculó el porcentaje de competición, tomando como el 100 % de competición la unión de la [3H]Mibolerona, obteniendo a partir de este dato el porcentaje de competición de los demás esteroides.

ESTEROIDES	% DE COMPETICION
Mibolerona sólo	100
+ Mibolerona	46.4
+ Testosterona	33
+ DHT	33
+ Estradiol	25
+ ORG 2058	12

Se observa que el esteroide que presenta mayor competición por el receptor es la Mibolerona, seguido por la DHT y testosterona, estradiol y ORG 2058 (progesterona de síntesis), evidenciándose que los andrógenos son los que presentan el mayor porcentaje de competición, lo que demuestra la especificidad del receptor para los mismos.

---

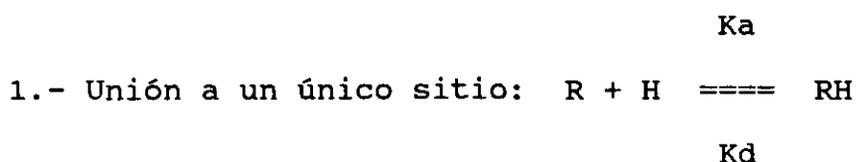
#### CALCULO DE LOS RESULTADOS.

---

El cálculo del número de receptores es el mismo para los receptores citosólicos y nucleares que para los totales y nucleares en células intactas. Los receptores esteroideos se caracterizan por una

elevada afinidad para sus respectivas hormonas. La unión específica es la resultante de fuertes interacciones con un limitado número de sitios, a diferencia de la unión no específica. La especificidad de unión debe ser un fenómeno saturable, es decir, la curva de saturación debe tener una forma hiperbólica y los receptores deben ser saturados dentro del intervalo de concentración fisiológica de la hormona ( $10^{-10}$  -  $10^{-8}$  M). Esto significa que el receptor posee una constante de afinidad ( $K_a$ ) alta, o lo que es lo mismo una constante de disociación ( $K_d$ ) baja, tomando un valor dentro del intervalo de saturación (Clark y Peck, 1978).

En la unión proteína ligando, como es el caso de la unión del andrógeno a su receptor, el ligando se une a uno o varios sitios específicos. Las ecuaciones que definen esta unión (Clark y Peck, 1978; Buller y col., 1976; Blondeau y Robel, 1975; Baxter y Funder, 1979; Braunsberg y Hammond, 1980) son:



La velocidad de asociación:  $V_a = K_a(R)(H)$

" " " disociación:  $V_d = K_d(RH)$

En el equilibrio:  $V_a = V_d$ ;  $K_a(R)(H) = K_d(RH)$

La constante de afinidad  $K_{af} = \frac{K_a}{K_d} = \frac{(RH)}{(R)(H)}$   
en concentración  $^{-1}$ .

La constante de afinidad mide la fuerza con que se establece la ligadura, por tanto a mayor  $K_{af}$ , mayor afinidad. La constante de disociación  $K_D$  es la inversa a la de afinidad.

$$K_D = 1/K_{af}; K_D = \frac{(R)(H)}{(RH)} \text{ (concentración)} \quad (1)$$

La  $K_D$  define la cantidad de esteroide libre que se halla en equilibrio con los receptores ocupados.

Según la ecuación (1), a concentraciones saturantes, la concentración de receptores libres (R) es 0, ó prácticamente 0. La concentración de receptores unidos es (RS) y la de esteroide libre, (S).

$$\text{Cuando } (R) = 0, K_D = \frac{(S)}{(RS)}$$

2.- Unión a más de un sitio: La concentración total de sitios de unión  $(RT) = (RH) + (R)$ ;  $(R) = (RT) - (RH)$ .

Sustituyendo en KD:

$$KD = \frac{[(RT) - (RH)](H)}{(RH)}; \quad \begin{aligned} KD(RH) &= [(RT) - (RH)](H); \\ KD(RH) &= (RT)(H) - (RT)(H); \end{aligned}$$

$$KD(RH) + (RH)(H) = (RT)(H); \quad (RT)(KD+(H)) = (RT)(H).$$

$$(RT) = \frac{(RT)(H)}{KD+(H)} \quad (2) \quad \text{Ecuación análoga a la de Michaelis-Menten.}$$

$$v = \frac{V \cdot s}{K_m + s}$$

Representando RH frente a H obtenemos una gráfica de tipo Michaeliano, donde:

$(RH)$  es la fracción unida (B en la literatura sajona).

$(H)$  la concentración de hormona no unida (F).

$(RT)$  la unión máxima ó número de receptores.

Por lo que la ecuación (2) toma la forma:

$$B = \frac{B_{max} \cdot F}{KD + F}$$

Este tipo de gráficas tienen el inconveniente de la imprecisión, al tener que determinar la KD y el número de receptores en una curva. Para paliar este

problema se han propuesto distintos métodos de cálculo para linealizar este tipo de gráficas Michaelianas (Rodbard y col., 1980; Eisenthal y Cornish-Bowden, 1973; Woosley Y Muldoon, 1976 a; Barsano y Bauman, 1989), siendo todos ellos comparados entre sí, en algunos casos (Braunsberg y Hammond, 1979; Woosley y Muldoon, 1976 b). Sin embargo, de todos los métodos descritos, el más mencionado en la bibliografía sobre receptores es el método de Scatchard (1949), y todos los resultados son referidos por este sistema de determinación de receptores.

El método de Scatchard linealiza la gráfica de Michaelis-Menten. De la ecuación:

$$B = \frac{B_{\max} \cdot F}{K_D + F}$$

tenemos:

$$B_{\max} \cdot F = B K_D + B F; \quad B K_D = B_{\max} \cdot F - B \cdot F; \quad B K_D = F \cdot (B_{\max} - B);$$

$$K_D = 1/K_{af}, \text{ luego } B \cdot 1/K_{af} = F \cdot (B_{\max} - B);$$

$$B/F = K_{af} \cdot B_{\max} - K_{af} \cdot B;$$

$$\begin{aligned} B/F &= -K_{af} \cdot b + K_{af} \cdot B_{\max} \\ y &= -ax + b \end{aligned}$$

ecuación de una recta, donde la ordenada en el origen es  $K_{af} \cdot B_{\max}$ , y la pendiente  $K_{af}$ .

Representando B/F frente a F, obtenemos Bmax en el punto de corte con el eje de abcisas (extrapolado), es decir el número de receptores, ya que en este caso  $B/F = 0$ , y la ecuación toma la forma:  $0 = -Kaf.B + Kaf.Bmax$ ;  
 $Kaf.B = Kaf.Bmax$ , luego en este punto  $B = Bmax$ .

Por último, queda por decir que la eliminación, por cálculo, de las UNE se realiza por el método de Chamness y McGuire (1975), que es equivalente al método gráfico de Rosenthal (1967). <Estos métodos suponen que las UNE se determinan en las concentraciones más altas de hormona añadida. Si se utilizan los tres puntos de máxima concentración con un exceso de hormona fría, se obtiene un promedio de  $B(UNE)/F$ . Multiplicando este cociente por F de cada punto, se obtiene un valor de UNE para cada punto de la curva, el cual restándolo a la unión total determinada, da los valores de unión específica correspondientes.

Este método presenta un coeficiente de variación interensayo del 2,61 %, dato obtenido de la determinación de receptores citosólicos, de la misma muestra, en tres días consecutivos. En la figura 4 se

representa un ejemplo de las gráficas de saturación (4A) y de Scatchard (4B) de receptores citosólicos. También en la figura 5 se observan estas mismas gráficas para receptores nucleares, en las células intactas.

En el caso de la biopsias (donde la cantidad de tejido obtenido es muy pequeña) y en algunas muestras, el cálculo del número de receptores se realiza utilizando en la incubación un único punto de una concentración saturante (5 nM) de [3H]Mibolerona, puesto que ha sido descrito que utilizando una concentración no superior a 5 nM de hormona, los valores obtenidos por este método son equiparables a los obtenidos por la gráfica de Scatchard (Smith y col., 1983a; E.O.R.T.C. Breast Co-operative Group, 1980; Shimazaki y col., 1981; Rio y Offner, 1982). Las UNE se determinan con un único punto que contiene [3H]Mibolerona con un exceso de 200 veces Mibolerona fría. Restando las dpm obtenidas del punto donde se determinan las UNE del que contiene sólo [3H]Mibolerona, se calculan las dpm correspondientes a la unión específica.

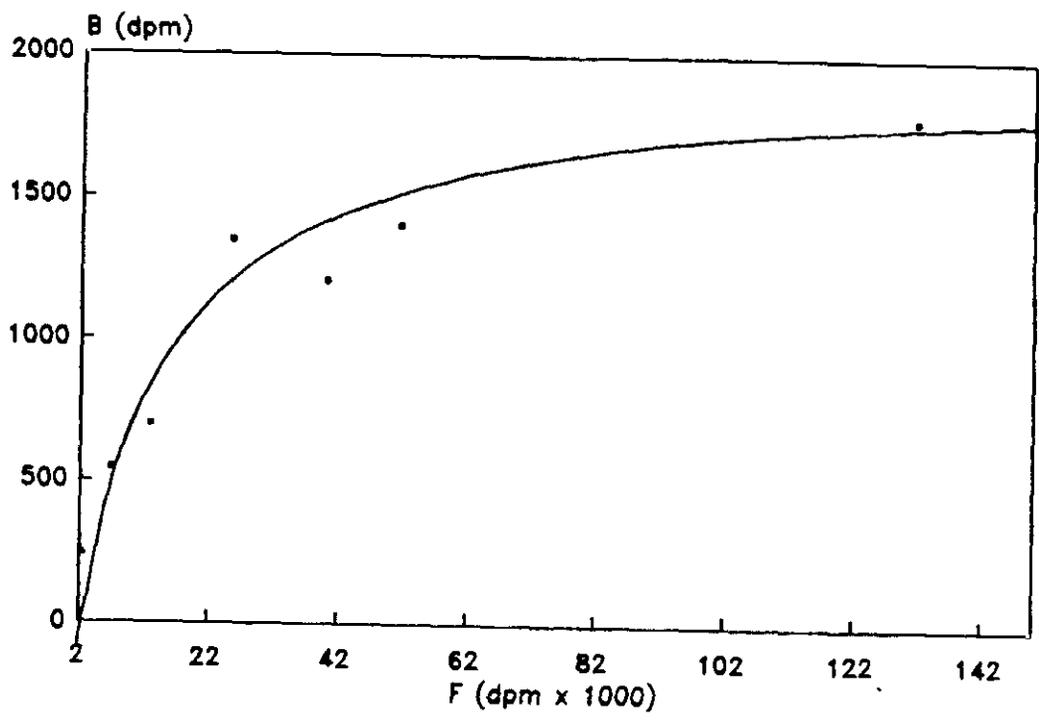


FIGURA 4A

Curva de Saturación  
(receptores citosólicos)

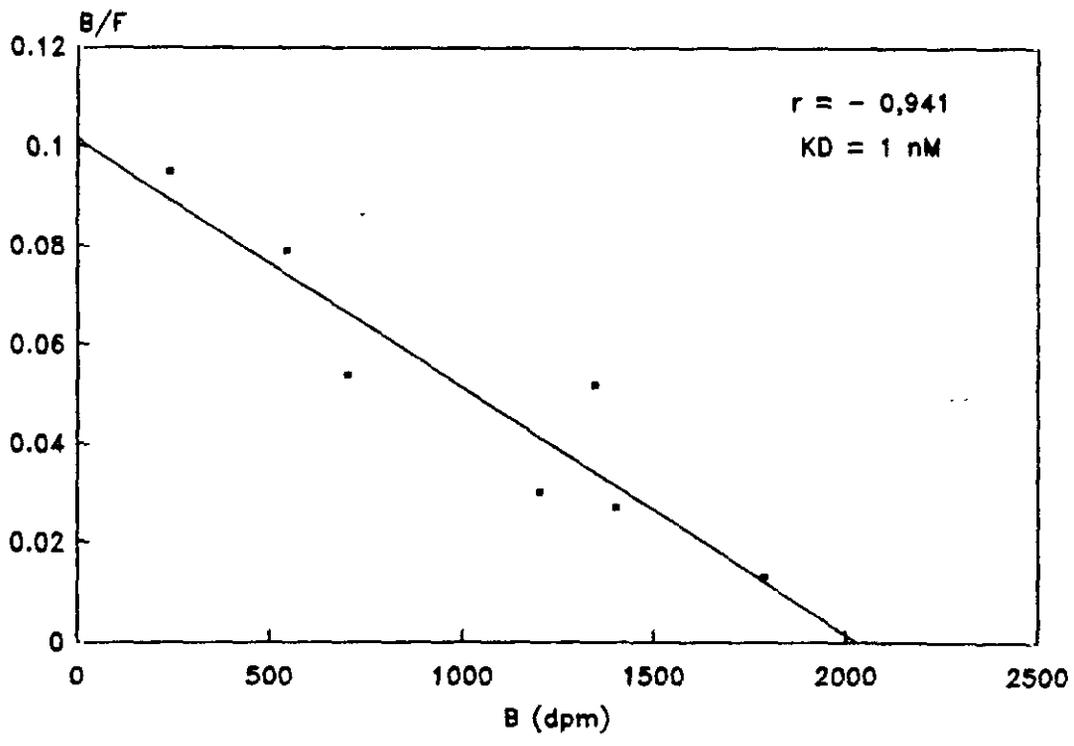


FIGURA 4B

Scatchard (receptores citosólicos)

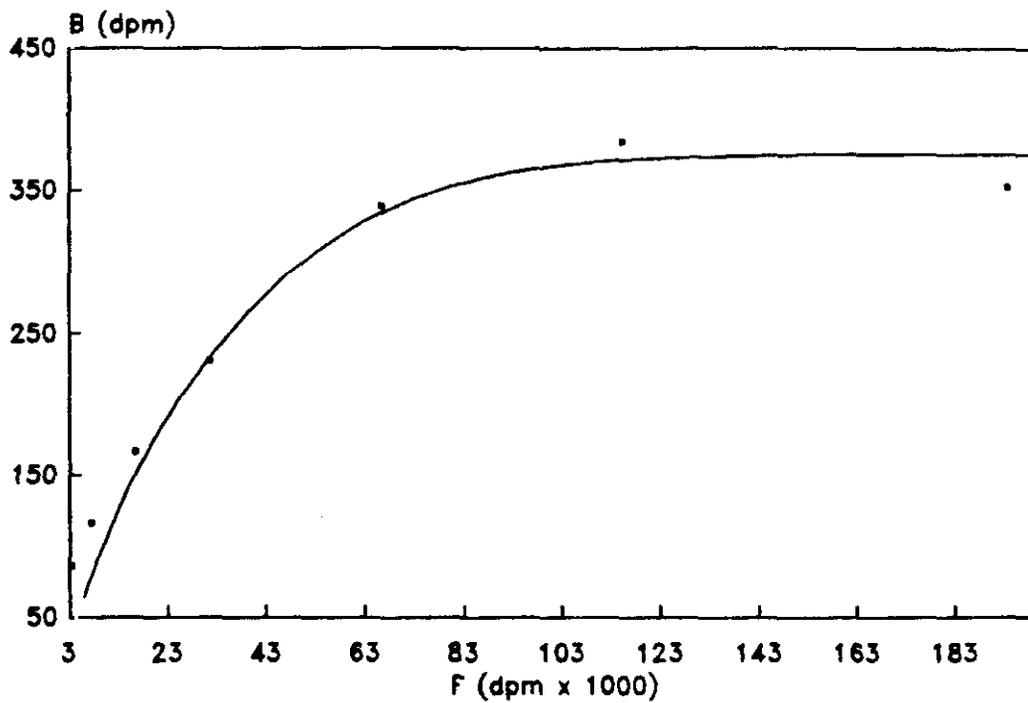


FIGURA 5A

Curva de saturación (receptores nucleares en células intactas)

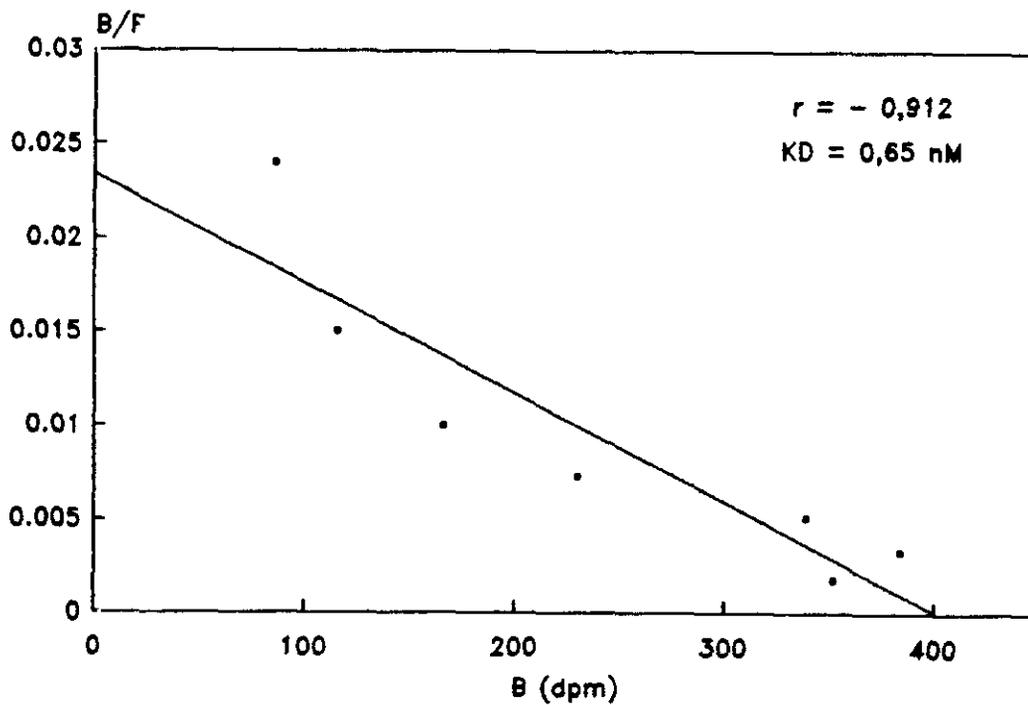


FIGURA 5B

Scatchard (receptores nucleares en células aisladas de próstata)

El coeficiente de variación entre el método de Scatchard y el del único punto saturante, para la misma muestra, es del 3,05 %. Este resultado es similar al de Bowman y col. (1985), los cuales obtienen un 3 % de variación, e inferior al de Hicks y Walsh (1979) con un 5 % en receptores nucleares y un 8,1 % en citosólicos.

Tanto por el procedimiento de cálculo mediante el método de Scatchard, como por el método del único punto saturante, los fmoles unidos por ml se hallan por:

$$\text{fmol/ml} = \frac{1000}{2,22 \cdot 10^{-12} \times 150 \times \text{actividad}}$$

-  $2,22 \cdot 10^{-12}$  es el factor de conversión de dpm a Ci (curios).

- 150 son los  $\mu\text{l}$  de citosol, fracciones nucleares o suspensión celular que se añaden al incubado.

- actividad es la que tiene la [3H]Mibolerona (70 Ci/mmol). Esta actividad debe ser corregida según transcurre el tiempo desde el marcaje de la hormona, por:

$$\text{Actividad actual} = \text{actividad inicial} \cdot e^{-T}$$

siendo  $T = \frac{0,693 \cdot t}{t^{1/2}}$

$t^{1/2}$  = período de semidesintegración del tritio (12,3 años).  $t$  = tiempo transcurrido desde el marcaje (en años).

---

### EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

---

Los receptores citosólicos se expresan como fmoles unidos/mg de proteína ó mg de ADN. Los nucleares (por el método de homogeneización) como fmoles unidos/mg de ADN. Además, los receptores nucleares y los totales determinados en las células intactas se expresan como fmoles unidos/mg de ADN o en sitios/célula. Los resultados se obtienen dividiendo los fmoles/ml unidos por los mg de proteínas/ml ó de ADN/ml. Esta referencia de los datos obtenidos es fundamental, ya que, además del tipo de expresión, permiten correcciones. Tal es el caso de las proteínas, donde se observa una correlación positiva entre los fmoles/ml unidos (en los 25 citosoles) con los mg de proteínas/ml ( $r = 0,442$ ;  $P < 0.05$ ), lo cual quiere decir que el contenido

de proteínas nos condiciona la concentración de los receptores, siendo evidente que este hecho debe ser corregido. Lo mismo ocurre al expresar los resultados en sitios/célula, donde es lógico pensar que a mayor número de células, mayor número de receptores. En este caso esta relación también es significativamente estadística ( $r = 0.376$ ;  $P < 0.05$ ;  $n = 42$ ).

Para el cálculo de sitios de unión por célula, se multiplican los fmoles/ml obtenidos por el número de Avogadro. Así se obtienen moléculas (sitios de unión) por ml. Dividiendo este valor por el número de células por ml, se obtienen los sitios/célula. El número de células obtenido es de  $5,15 \cdot 10^6 \pm 3,53 \cdot 10^5$  células/ml en tejido hiperplásico;  $1,7 \cdot 10^6 \pm 1,1 \cdot 10^6$  y  $1 \cdot 10^6 \pm 3,9 \cdot 10^5$  células/ml en la zona externa de próstatas con HBP y cáncer, respectivamente.

Los mg de proteínas/ml de la fracción citosólica se determinan por el método de Bradford (1976). Según el método, el reactivo para la determinación de proteínas se compone de:

- Azul brillante de Coomassie G 250 (100 mg) en 50 ml de etanol (96°).
- Acido fosfórico al 85 % (100 ml).
- c.s.p. 1 litro, con agua destilada.

Se prepara una curva estándar de albúmina bovina, de 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{g/ml}$ , en el mismo tampón donde se extraen los receptores citosólicos. A 100  $\mu\text{l}$  de cada estándar se les añaden 5 ml de reactivo filtrado, apareciendo un color azul, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de proteínas. Se determina la absorción de luz a 595 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 de doble haz, calibrando el aparato con el reactivo y 100  $\mu\text{l}$  del tampón donde se halla disuelta la albúmina, ya que los compuestos que forman el tampón (sobre todo el molibdato y el DTT) absorben luz (Raam y Teixeira, 1985). Representando absorción de luz frente a concentración de albúmina de cada estándar, se obtiene una curva. Si 100  $\mu\text{l}$  del citosol se trata con el reactivo de Bradford, se obtiene un color, cuya absorción al ser llevada a la gráfica dará automáticamente la concentración de proteínas. La cantidad de proteínas determinada en los 25 citosoles es de  $2,8 \pm 1 \text{ mg/ml}$ .

La determinación de ADN se realiza según la modificación por Colvard y col. (1988) del método de Burton (1956), con mínimas variaciones. Se prepara una curva estándar de ADN bovino, grado V, diluyendo 1 mg de ADN por ml de una solución de cloruro sódico (15 mM) y citrato sódico (1,5 mM). De esta solución se obtienen los estándares de 50, 100, 200 y 300  $\mu\text{g/ml}$  disueltos en medio de cultivo HAM'S F 12. A 200  $\mu\text{l}$  de cada estándar y de la suspensión celular se le añaden 200  $\mu\text{l}$  de ácido perclórico 1 M (para conseguir una solución de ácido perclórico 0,5 M), y se calienta a 90° C, 15 minutos. A esta mezcla se le añaden 800  $\mu\text{l}$  del reactivo de difenilamina, compuesto por:

- Difenilamina 15 g.
- Solución de acetaldehído 5 ml (al 2 % v/v en agua destilada, y almacenado a 4° C).
- Solución sulfúrica-acética 1 L (15 de ácido sulfúrico en 1 L de ácido acético glacial).

Se mezcla esta solución con los estándares y las muestras, haciendo un blanco con el medio de cultivo, y se deja incubar en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 18 horas. Se determina la densidad

óptica a 600 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160. Representando densidades ópticas frente a la concentración de cada estándar, obtenemos una curva donde automáticamente hallaremos la concentración de ADN de cada suspensión celular. La cantidad de ADN determinada en los homogenados de tejidos es de  $524,5 \pm 246,4 \mu\text{g/ml}$ , y en las células dispersas de  $178,8 \pm 153,7 \mu\text{g/ml}$ .

---

#### REACTIVOS Y LIGANDOS UTILIZADOS.

---

- [ <sup>3</sup> H ] M i b o l e r o n a  
( $7\alpha, 17\alpha$ -dimetil( $17\alpha$ -metil-<sup>3</sup>H)-19-nortestosterona) (70 Ci/mmol), Amersham International.
- M i b o l e r o n a ,  
( $7\alpha, 17\alpha$ -dimetil( $17\alpha$ -metil)-19-nortestosterona),  
Amersham International.
- O R G 2 0 5 8  
( $16\alpha$ -etil-21-hidroxi-19-norpregn-4-eno-3,20-diona),  
Amersham International.
- Acetónido de Triamcinolona, Amersham  
International.

- Testosterona, estradiol y DHT (dihidrotestosterona), Merck Darmstadt.
- HAM'S F-12, colagenasa tipo I y todos los componentes de los tampones, SIGMA (St. Louis, M.O.).

---

**CARACTERIZACIÓN HORMONOMETABOLICA DEL MATERIAL DE ENFERMOS ESTUDIADOS.**

---

Antes de la operación o biopsia se extrajeron muestras de sangre para las siguientes determinaciones en suero:

- Testosterona total (n = 63), por RIA.
- Estradiol (n = 63), por RIA.
- Hormona Luteneizante (LH) (n = 63), por enzimoimmoanálisis.
- Hormona Folículoestimulante (FSH) (n = 63), por enzimoimmoanálisis.
- Fosfatasa alcalina (n = 68), por cinética enzimática.
- Fosfatasa ácida (n = 63) y su fracción prostática (n = 60), por cinética enzimática.

- Antígeno prostático específico (PSA) ( n = 26), por enzimoimmunoanálisis.

---

#### **DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN PROSTÁTICO.**

---

El tamaño de la próstata fue objetivado mediante ecografía suprapúbica, mediante un ecógrafo SONOLAYER 279 (Toshiba) obteniéndose así el volumen de la glándula mencionada. Los resultados fueron expresados en cc.

Todas las determinaciones fueron realizadas inmediatamente antes de cirugía y por tanto previamente a la determinación de receptores. El promedio del volumen prostático así medido en 42 enfermos de HBP es  $171.55 \pm 106.9$  cc, siendo el volumen medio de la próstata normal de 21,87 cc (Tanagho, 1986).

---

## DIAGNOSTICO HISTOLÓGICO.

---

En el caso de biopsias se tomaba simultáneamente, de la misma zona en la que se determinaron los receptores androgénicos, material para estudio anatomopatológico. Igualmente se procedía cuando se realizaba una extirpación, por lo que el resultado de receptores obtenido correspondía a la misma zona que la del diagnóstico histológico. Todos los estudios anatomopatológicos, así como la identificación de las células epiteliales prostáticas, fueron realizados en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de la Princesa, por el equipo del Dr. Mariano Zomeño.

---

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

---

El análisis estadístico de los resultados obtenidos, se ha realizado mediante el paquete de estadística Statgraphics, versión 2.6, en un ordenador personal Amstrad PC2086/30.

Los parámetros estadísticos de la distribución utilizados han sido:

X: Media aritmética, como parámetro central de la distribución de cada variable.

DE: Desviación estándar, como parámetro de dispersión absoluta de los valores con respecto a la media.

EEM: Error estándar de la media, como parámetro de dispersión de la media, aplicado en las representaciones gráficas.

CV: Coeficiente de variación, como medida de dispersión relativa, en porcentaje, empleado para comparar la dispersión de variables diferentes.

La homogeneidad entre dos muestras independientes se ha estimado mediante el test de la "t" de Student (diferencia entre medias), asumiendo una distribución normal.

Para comprobar la asociación de las variables estudiadas, se ha realizado la representación gráfica de las dos variables asociadas, y se ha aplicado el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ).

En los casos en los que el diagrama de dispersión mostró una asociación lineal, se aplicó el modelo correspondiente de regresión. En caso que la linealidad fuese rechazada, se utilizó una transformación exponencial de este modelo.

En aquellos casos en los que la correlación entre dos variables podía estar condicionada por la asociación de ambas con una tercera (edad, por ejemplo), se calculó el coeficiente de correlación parcial entre ellas.

## **RESULTADOS**

El número de receptores citosólicos (expresados como fmoles/mg de ADN) presenta una tendencia a aumentar con la edad. Considerando como el valor más frecuente 216 fmoles/mg ADN (siendo este dato obtenido de la moda de la distribución de todos los valores), se puede comprobar que en todas las edades existen resultados que se hallan por encima de este valor, pero el aumento del número de receptores es mayor según avanza la edad. No obstante, no se registra una significación estadística. El valor medio de los receptores androgénicos citosólicos corresponde a  $348 \pm 294$  fmoles/mg ADN; la variación interindividual es muy marcada (figura 6).

Por otra parte, midiendo los receptores androgénicos totales (expresados como sitios de unión/célula), en células aisladas de próstatas humanas, se observa también un aumento del número de receptores con la edad. Este aumento es estadísticamente significativo ( $r = 0,49$ ;  $P < 0.01$ ) (figura 7). Los valores más elevados se registran a partir de los 70 años. El valor más frecuente corresponde a 6324 sitios/célula. El valor medio de todos los sitios/célula corresponde a  $10176 \pm 8537$  (figura 8).

RECEPTORES ANDROGENICOS CITOSOLICOS Y  
EDAD EN PACIENTES CON HIPERPLASIA  
BENIGNA PROSTATICA

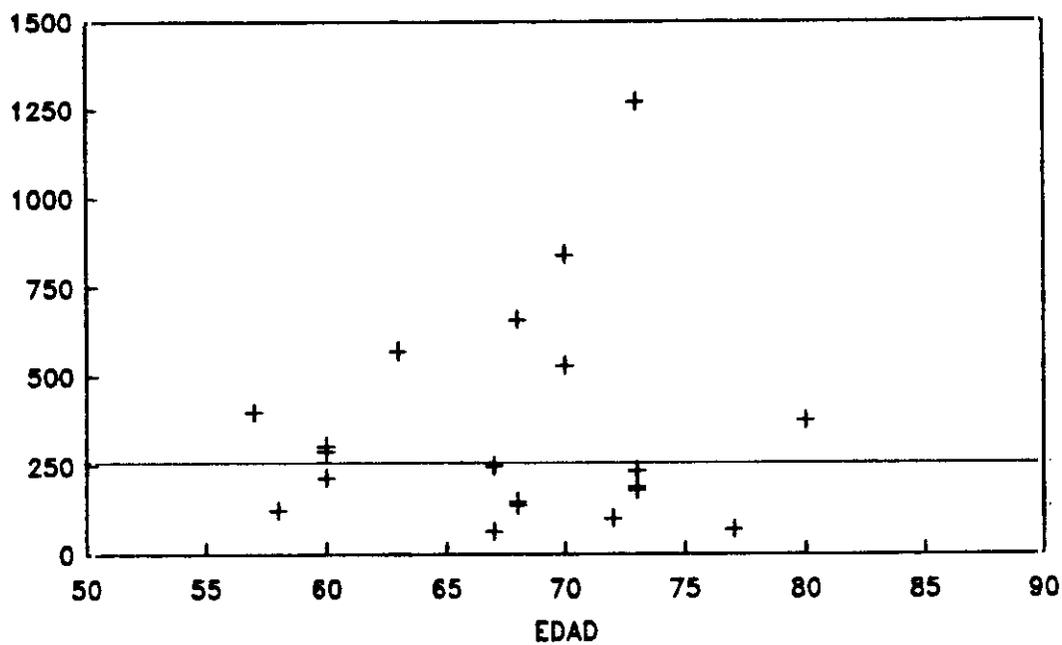


FIGURA 6

RECEPTORES DE ANDROGENOS TOTALES EN  
CELULAS INTACTAS Y EDAD, EN PACIENTES  
CON HIPERPLASIA BENIGNA PROSTATICA

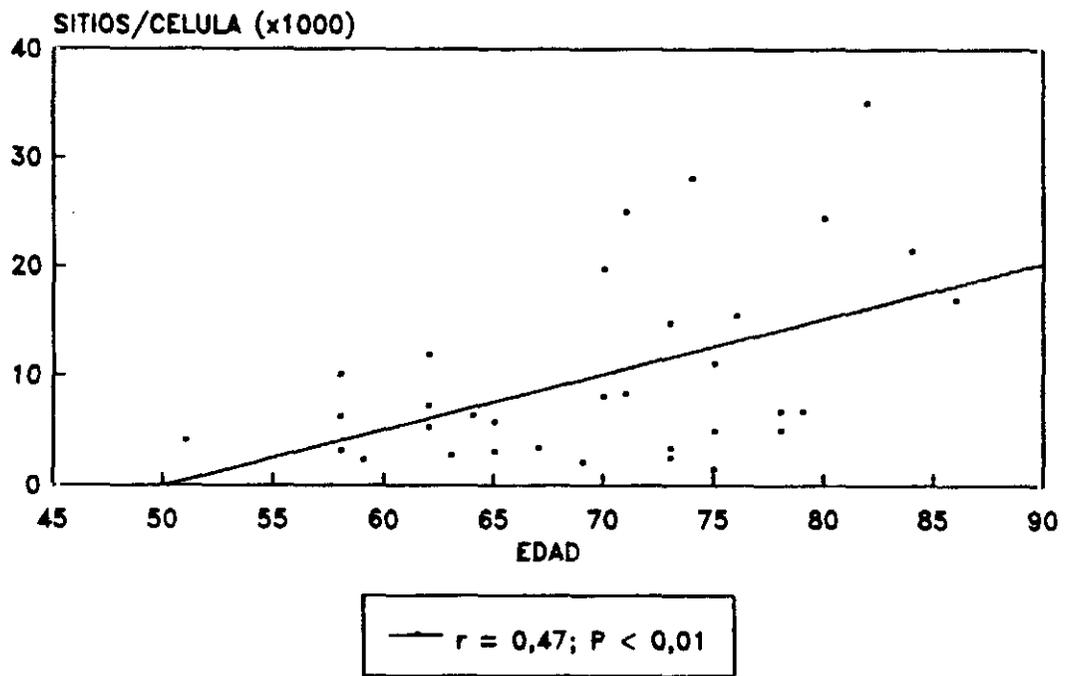


FIGURA 7

RECEPTORES ANDROGENICOS TOTALES SEGUN LA  
EDAD POR QUINQUENIOS, EN CELULAS  
AISLADAS DE PROSTATAS CON HBP

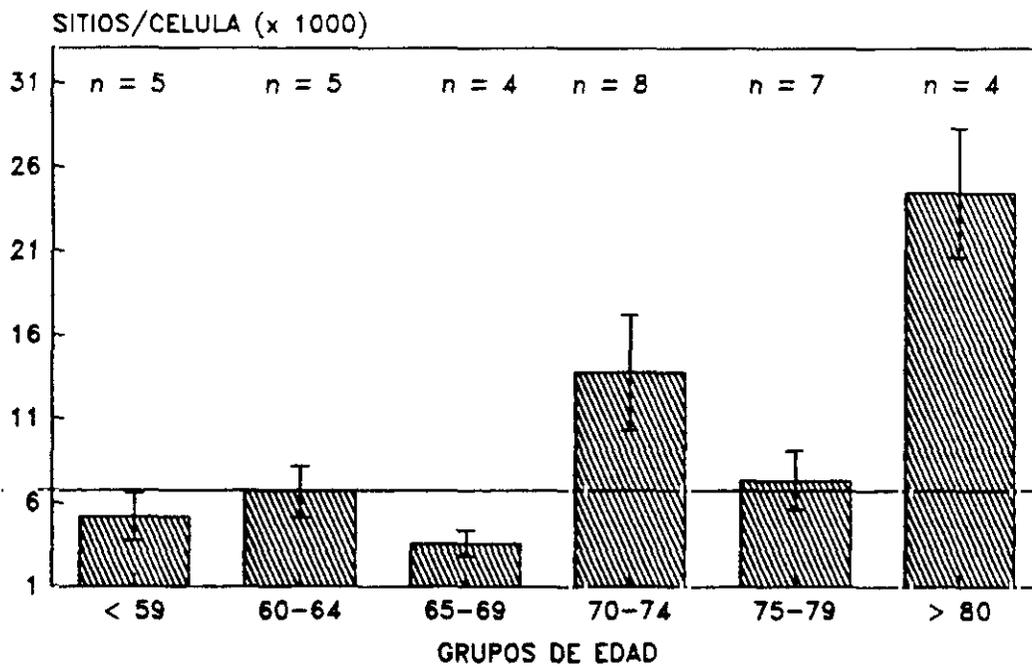


FIGURA 8

En el caso de los receptores nucleares (sal extraíbles y sal resistentes), no se observa una variación clara del número de receptores en menores y mayores de 70 años (tabla IV). En el caso de los receptores nucleares en muestras con HBP, determinados por el procedimiento de las células dispersas, tampoco hay variación del número de receptores con la edad, tanto los determinados en tejido hiperplásico, como en la zona externa de la próstata (tabla IV). Por otra parte, en el caso de los receptores determinados en biopsias de pacientes que presentan adenocarcinoma, tampoco se observa una variación del número de receptores con la edad (tabla IV).

TABLA IV

RECEPTORES ANDROGENICOS NUCLEARES EN HBP Y CÁNCER EN DOS GRUPOS DE EDAD, Y SEGÚN LAS DISTINTAS METODOLOGÍAS EMPLEADAS.

	METODO	< 70	> 71
Hiperplasia Benigna Prostática	Sal extraíbles (fmol/mg ADN)	202 ± 118 (n = 3)	19  (n = 1)
	Sal-resistentes (fmol/mg ADN)	59 - 236 (n = 2)	106 ± 67 (n = 3)
	T. HIPERPLASICO Células intactas (sitios/núcleo)	1220 ± 847 (n = 12)	1420 ± 565 (n = 6)
	ZONA EXTERNA Células intactas (sitios/núcleo)	2198 ± 1778 (n = 9)	1842 ± 306 (n = 3)
Cáncer	Células intactas (sitios/núcleo)	2190-2628 (n = 2)	2578 ± 1492 (n = 4)

En analogía con la HBP, donde el número de receptores androgénicos totales se relaciona con la edad, como se ha mencionado anteriormente, en el cáncer, se tiene en cuenta la edad cuando se comparan los resultados. Dentro del mismo intervalo de edad (66 - 79 años) se observa un aumento estadísticamente significativo en el número de receptores totales, en cáncer, con respecto a la HBP (tabla V).

TABLA V

RECEPTORES ANDROGENICOS TOTALES EN CÉLULAS DISPERSAS EN PACIENTES DE CÁNCER, EN COMPARACIÓN CON LOS RESULTADOS DE PACIENTES DE HBP, EN EL MISMO INTERVALO DE EDAD.

	HIPERPLASIA BENIGNA PROSTATICA (n = 18)	CANCER ( n = 3)
RANGO DE EDAD	66 - 79 años	67 - 79 años
SITIOS/CELULA (X ± D.E.)	9984,5 ± 8298,7	22243 ± 7829
P	0,02	

En el cáncer, el número de receptores nucleares, obtenido por el procedimiento de las células dispersas es superior al de la HBP ( $P < 0,01$ ) (tabla VI). Sin embargo, la cantidad de receptores nucleares determinados en la zona externa de la próstata en 12 pacientes con HBP, es prácticamente igual al número de receptores determinados en biopsias (cuyo material procede del mismo área topográfica) de 6 pacientes con cáncer (tabla VII). No obstante, en caso de la próstata hiperplásica, los receptores nucleares en la zona externa son más abundante que en la zona de tejido hiperplásico, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa (tabla VIII).

Así mismo, es lógico que estos datos se correspondan con aquellos de la figura 9, en donde se representan las variaciones intraindividuales, según se midan los receptores nucleares en el área hiperplásica o en la zona externa.

TABLA VI

DIFERENCIA EN EL NUMERO DE RECEPTORES ANDROGENICOS NUCLEARES EN CANCER Y EN TEJIDO HIPERPLASICO.

Cáncer	Hiperplasia Benigna Prostática (T. hiperplásico)	P
2522 ± 1065 sitios/núcleo (n = 6)	1287 ± 732 sitios/núcleo (n = 18)	< 0,01

TABLA VII

COMPARACIÓN DEL NUMERO DE RECEPTORES NUCLEARES DE LA MISMA ZONA DE LA PROSTATA, EN BIOPSIAS DE CANCER Y HBP.

Cáncer	Hiperplasia Benigna Prostática (zona externa)	P
2522 ± 1065 sitios/núcleo (n = 6)	2387 ± 1705 sitios/núcleo (n = 12)	N.S.

VARIACION INTRAINDIVIDUAL DEL NUMERO DE RECEPTORES NUCLEARES (sitios/nucleo) EN DOS ZONAS DISTINTAS DE LA MISMA PROSTATA

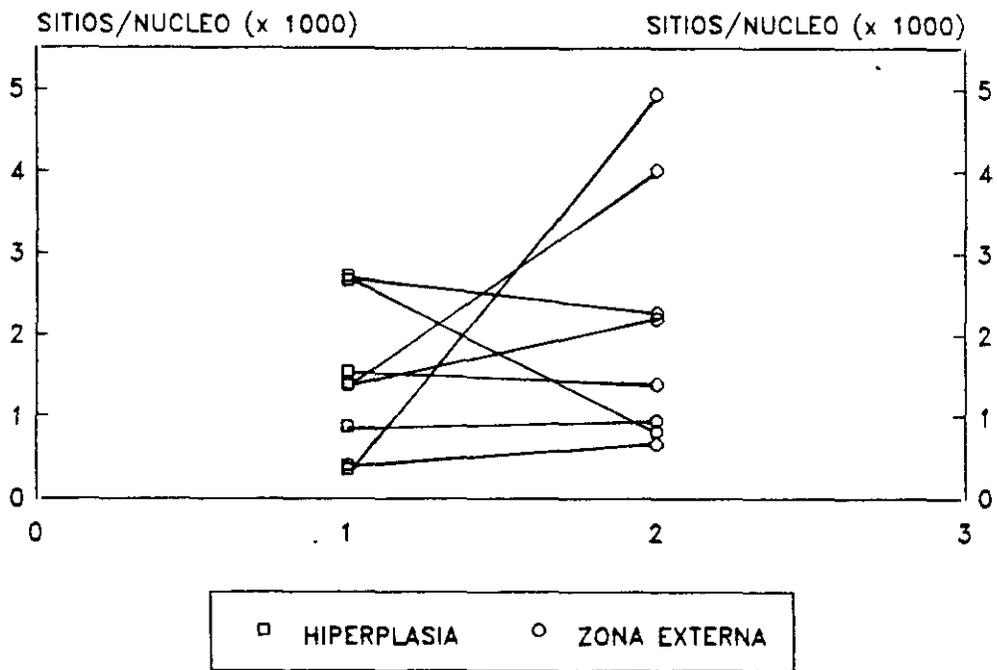


FIGURA 9

TABLA VIII

VARIACIÓN DEL NUMERO DE RECEPTORES ANDROGENICOS NUCLEARES, SEGÚN DISTINTAS ZONAS DE LA PROSTATA, EN PACIENTES CON HBP.

Hiperplasia Benigna Prostática (T. hiperplásico)	Hiperplasia Benigna Prostática (zona externa)	P
1287 ± 732 sitios/núcleo (n = 18)	2387 ± 1705 sitios/núcleo (n = 12)	0,059

Según el volumen prostático, medido ecográficamente próstatas de mayor tamaño muestran el mayor número de receptores totales, aunque - como se observa en la figura 10 - las DE se solapan, por lo que las diferencias no son estadísticamente significativas.

Por otro lado, el volumen prostático se relaciona con la edad (figura 11). Considerando el promedio de valores por quinquenios de edad, en el intervalo entre los 51 y 86 años, la recta de regresión es estadísticamente significativa ( $r = 0,867$ ;  $P < 0,05$ ).

VARIACION DEL VOLUMEN PROSTATICO Y EL  
NUMERO DE RECEPTORES

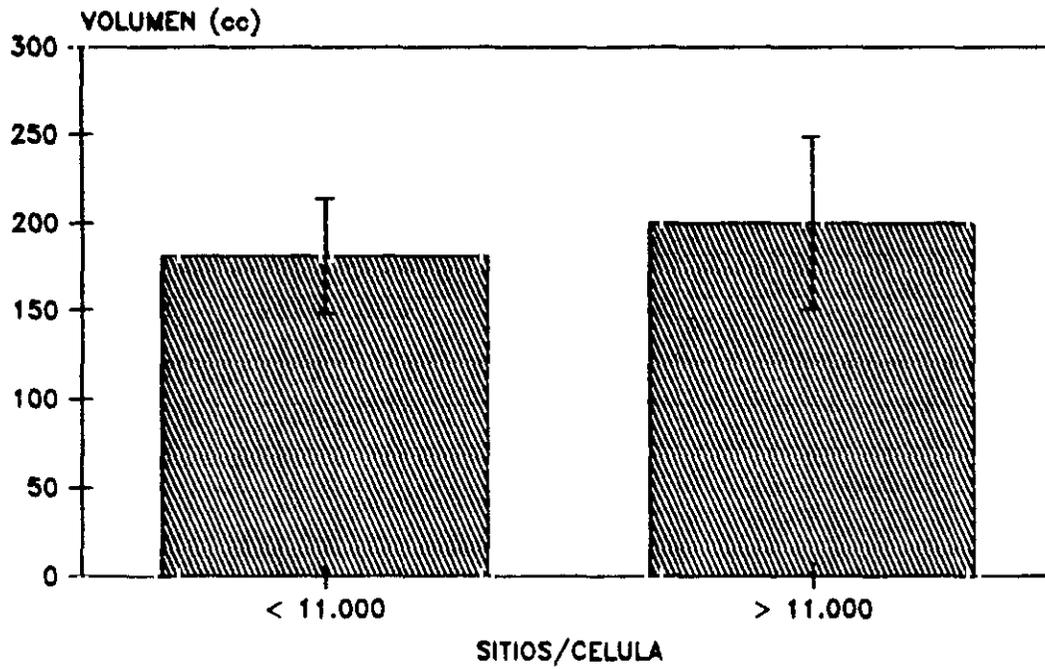


FIGURA 10

VOLUMEN PROSTATICO SEGUN GRUPOS DE EDAD,  
EN PACIENTES CON HBP

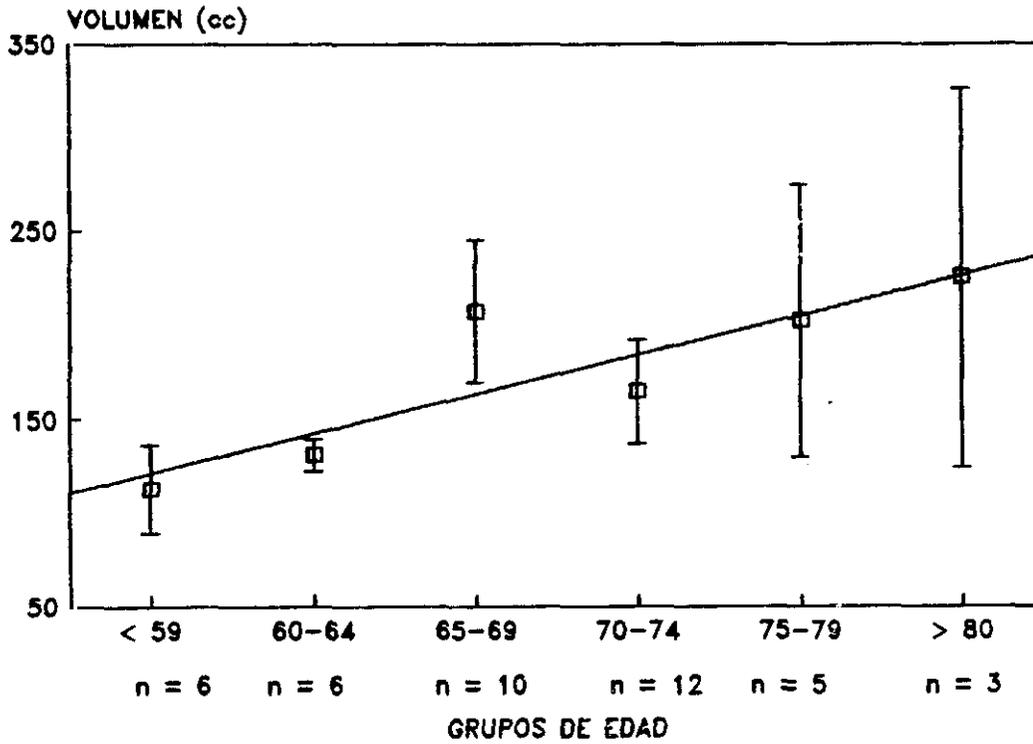


FIGURA 11

Representación gráfica de la correlación entre el volumen y edad cronológica de los individuos afectados de hiperplasia benigna prostática, agrupados en quinquenios. La dispersión de valores es evidente, por lo que el cálculo de la regresión sólo alcanza una significancia estadística cuando se utilizan los promedios ( $r = 0,867$ ;  $P < 0,05$ ).

Referente a los perfiles hormonometabólicos de los enfermos de HBP estudiados, no se ha obtenido relación alguna entre cada uno de estos valores sanguíneos y los receptores androgénicos prostáticos, a excepción del estradiol y los receptores nucleares de la zona externa de la próstata, donde el coeficiente de correlación es de 0,6 y con la correspondiente significación estadística ( $P = 0,05$ ) (figura 12 ).

Por otro lado, entre los parámetros hormonales que se detallan en el apartado metodológico, sólo la gonadotropina LH muestra una relación ascendente con la edad (figura 13), sin que tal lógico comportamiento se objetive con la relación inversa de la concentración sanguínea de testosterona total y la edad de nuestros enfermos ( $r = 0,274$ ; N.S.). Estos resultados, cuya obtención iba dirigida fundamentalmente a la caracterización del material de estudio, se discuten, junto a otros de similar importancia, en el apartado correspondiente.

RELACION ENTRE LOS RECEPTORES NUCLEARES  
DE LA ZONA EXTERNA DE LA PROSTATA  
HIPERPLASICA Y EL ESTRADIOL

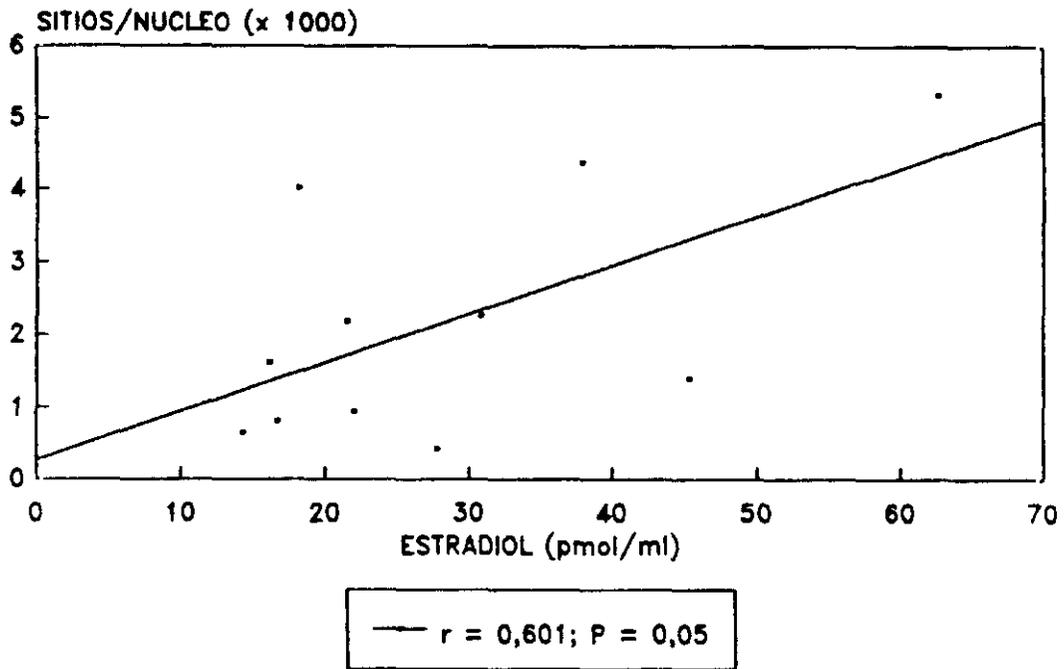


FIGURA 12

RELACION ENTRE LA HORMONA LUTENEIZANTE (LH) Y LA EDAD, EN PACIENTES CON HBP

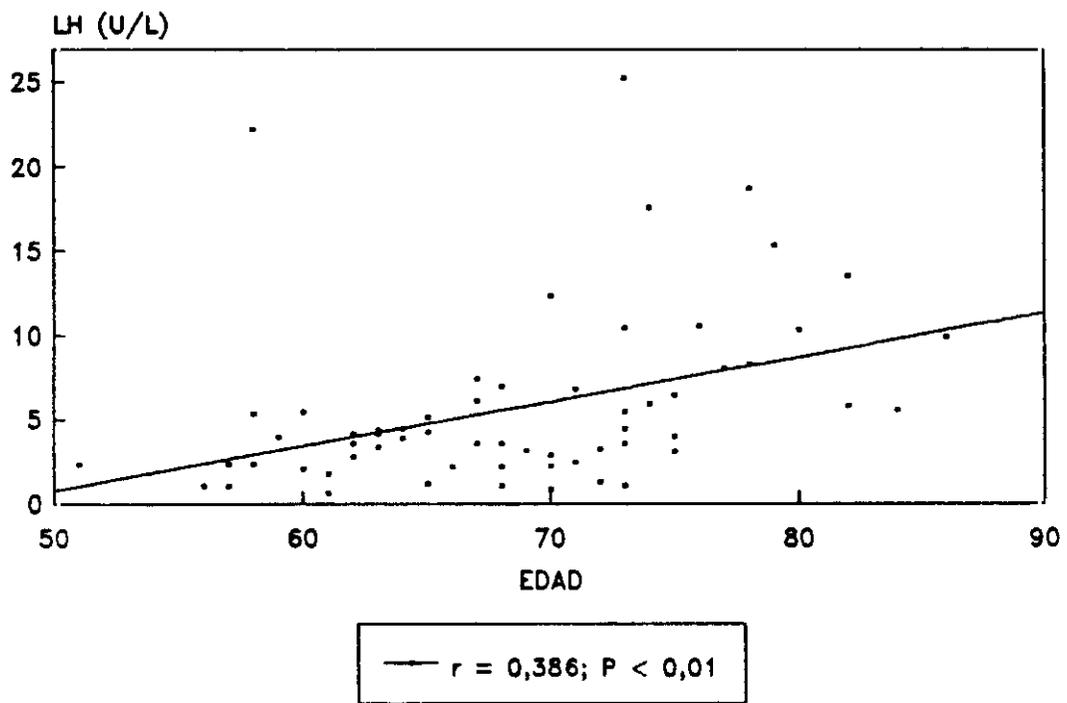


FIGURA 13

Respecto a la interrelación de los parámetros metabólicos, se observa una comprensible correlación entre la concentración sanguínea de fosfatasa alcalina y la de fosfatasa ácida (figura 14). Debido a que la concentración de fosfatasa alcalina se correlaciona ligeramente con la edad ( $r = 0,242$ ;  $P < 0,05$ ) (figura 15), así como lo hace el volumen prostático (véase arriba), es probable que sea lo último el parámetro determinante, ya que el volumen prostático está relacionado con la concentración sanguínea de fosfatasa ácida. El coeficiente de correlación asciende ligeramente cuando sólo se considera la fracción prostática de la fosfatasa ácida ( $r = 0,350$ ,  $r = 0,357$  respectivamente) (figuras 16 y 17). No obstante, las correlaciones parciales, independizándo el factor edad, no son concluyentes.

Una vez hecho referencia al comportamiento de las distintas variables en relación con el volumen prostático, interesa resaltar - como muestra la figura 18 - que existe una clara correlación inversa entre la concentración sanguínea de fosfatasa alcalina y los niveles séricos de estradiol ( $r = -0,426$ ;  $P < 0,001$ ) en los enfermos de HBP. No obstante, este comportamiento no se

RELACION ENTRE LAS FOSFATASAS ALCALINA  
Y LA ACIDA, EN PACIENTES CON HBP.

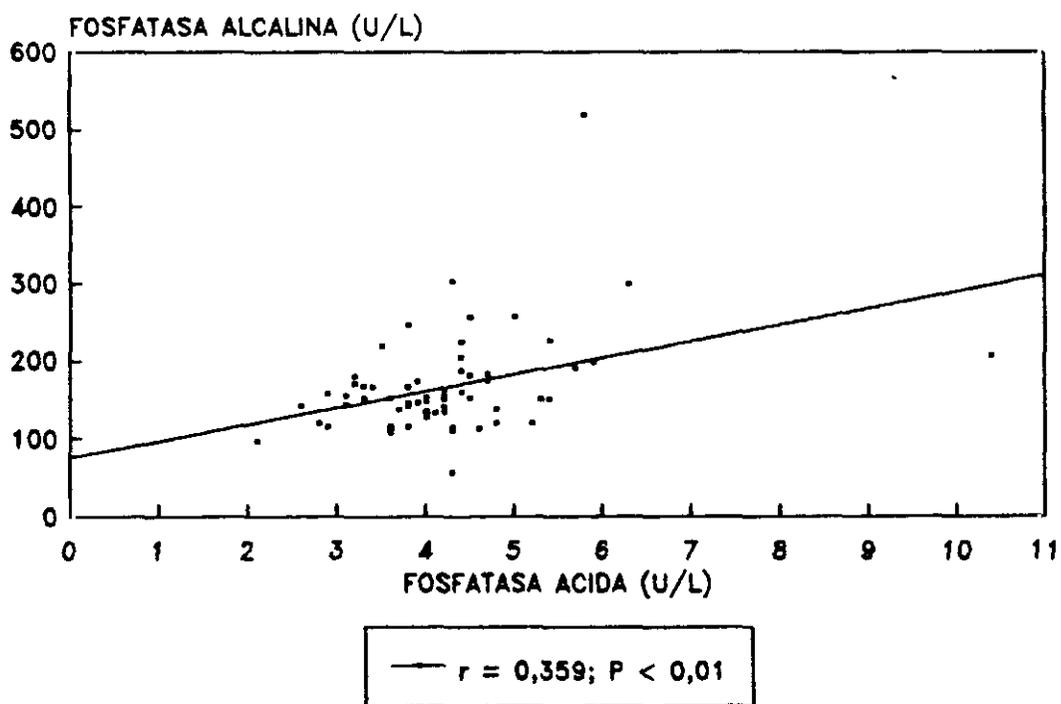


FIGURA 14

RELACION ENTRE LA FOSFATASA ALCALINA Y  
LA EDAD DE PACIENTES CON HBP.

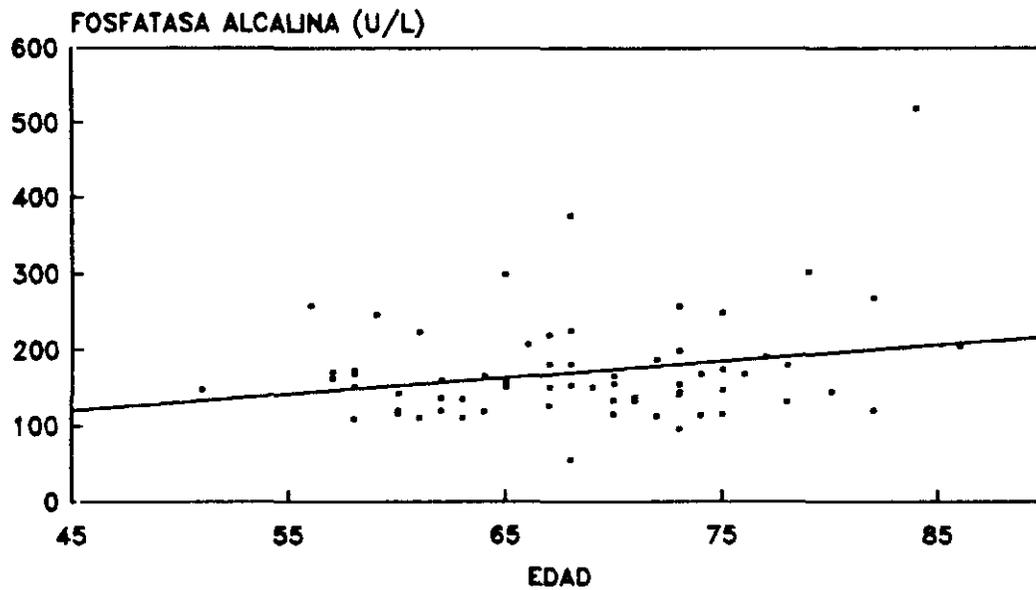


FIGURA 15

RELACION ENTRE EL VOLUMEN PROSTATICO  
Y LA FOSFATASA ACIDA, EN PACIENTES  
CON HBP

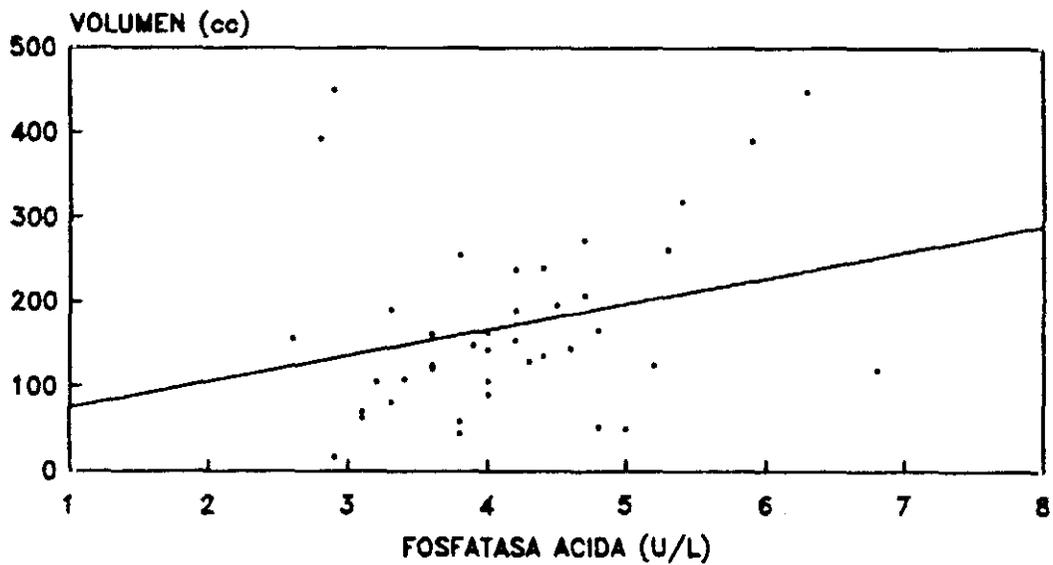


FIGURA 16

RELACION ENTRE EL VOLUMEN PROSTATICO Y  
LA FOSFATASA ACIDA, EN PACIENTES CON HBP

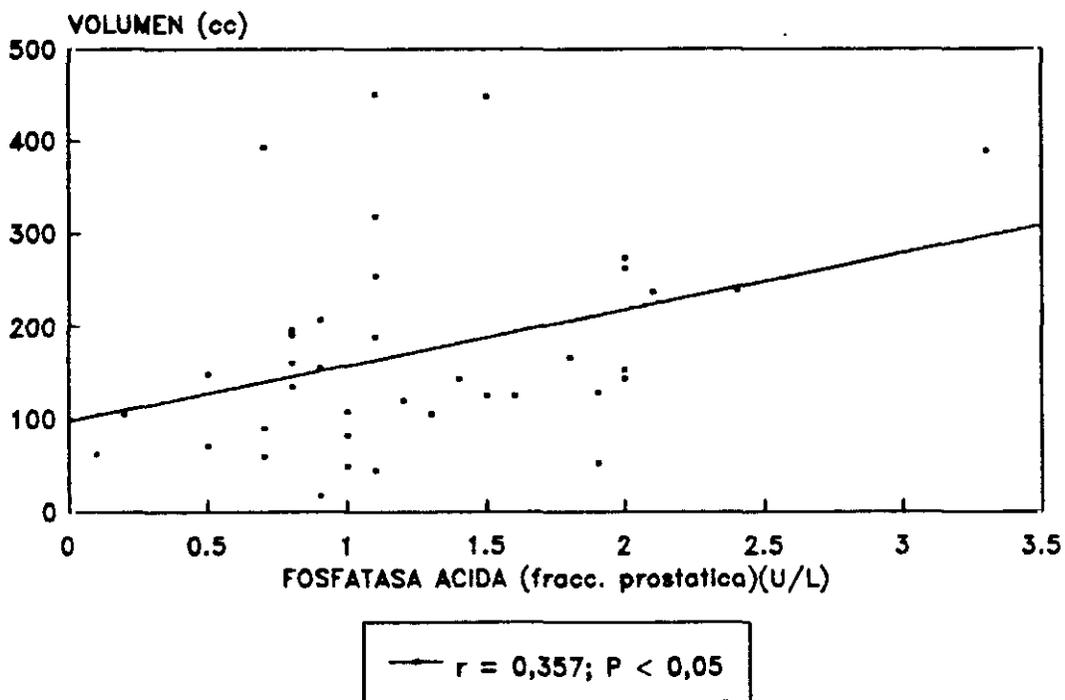
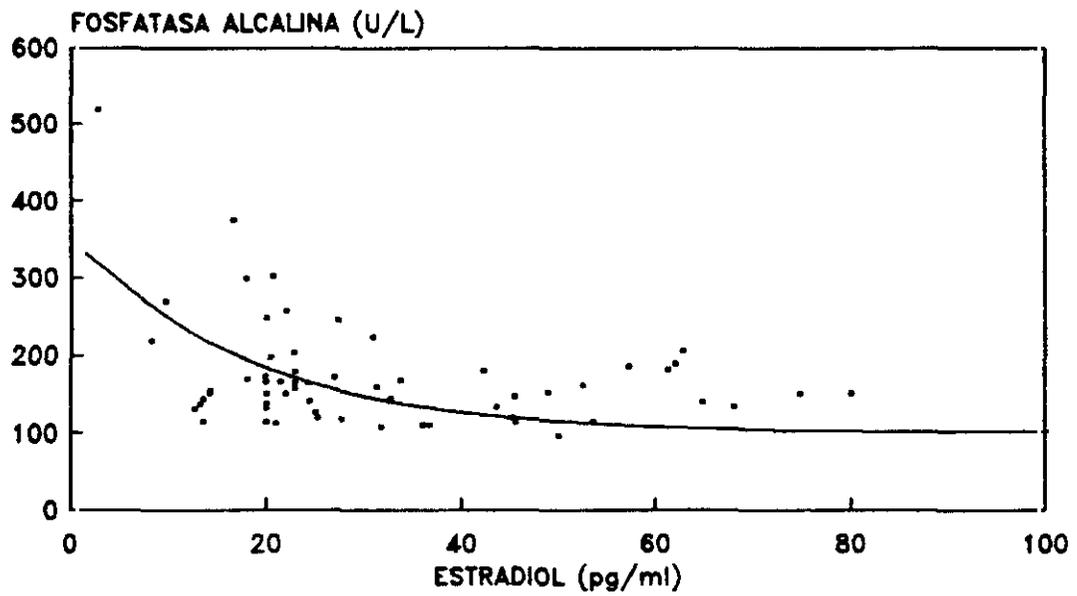


FIGURA 17

registra en el caso de la fosfatasa ácida o en el de la fracción prostática de esta enzima. Tampoco pudo registrarse relación alguna entre el volumen prostático y el estradiol sanguíneo, como ya se apuntaba arriba.

Referente al antígeno prostático específico (PSA), que en clínica se utiliza como marcador de malignidad, en el sentido de la directa proporcionalidad del pronóstico del cáncer con su concentración sanguínea, es digno de mencionar que existe una correlación estadísticamente significativa de alto coeficiente de correlación ( $r = 0,814$ ) entre el mencionado antígeno y el número de receptores nucleares de la zona externa de la próstata de pacientes con HBP, si bien todavía se trata de una muestra pequeña ( $n = 7$ ) (figura 19).

RELACION ENTRE LA FOSFATASA ALCALINA  
Y EL ESTRADIOL, EN PACIENTES CON HBP



$r = -0,426; P < 0,001$

FIGURA 18

CORRELACION ENTRE LOS SITIOS/NUCLEO DE  
LA ZONA EXTERNA DE PROSTATAS CON HBP Y  
EL PSA.

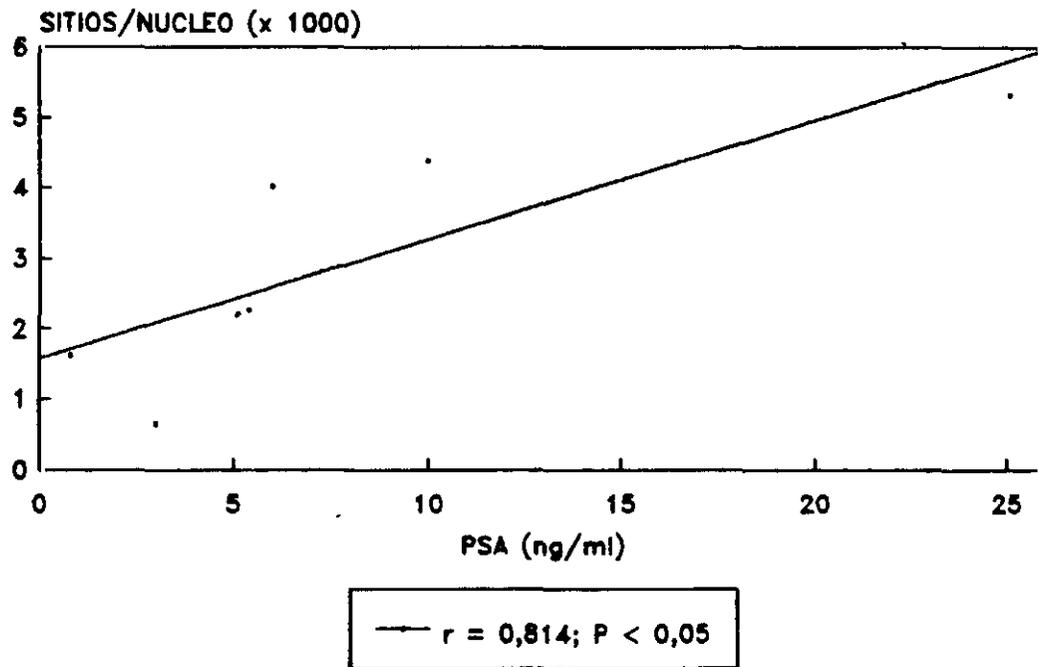


FIGURA 19

## **DISCUSIÓN**

Se ha desarrollado un método para la cuantificación de receptores androgénicos en células prostáticas intactas, aisladas de fragmentos de próstatas humanas. Todos los fragmentos de próstatas utilizados para el aislamiento de las células, presentaban un diagnóstico anatomopatológico de hiperplasia benigna prostática o de adenocarcinoma. Este método es el resultado de la modificación del trabajo original de Colvard y col. (1988), desarrollado para la determinación de receptores de progesterona en oviducto de pollo, y de receptores de estrógenos en biopsias de cáncer de mama. Con esta metodología se ha determinado el número de receptores androgénicos en condiciones similares a las fisiológicas, ya que las células prostáticas se mantienen viables durante todo el proceso metodológico. También permite determinar los receptores en muestras de biopsias de próstata, cuyo peso oscila entre 42 y 77 mg. Muestras de este tamaño no pueden ser procesadas por el clásico método de homogeneización. Además, el método desarrollado cuantifica receptores nucleares funcionalmente activos, que según los define Spelsberg (1987b), son receptores que al unirse a su hormona específica, son activados y capaces de ligarse a los sitios aceptores

nucleares específicos de la célula.

Los receptores citosólicos, totales y nucleares, han sido identificados en muestras de próstata humana, por distintas metodologías. Comparando los datos obtenidos de receptores citosólicos con los de otros autores, se observan resultados similares. Traish y col. (1986), que utilizan al igual que nosotros como ligando la Mibolerona, obtienen en 18 casos de HBP  $358 \pm 298,6$  fmoles/mg ADN, y una KD de  $0,98$  nM. Por otra parte, Trachtenberg y col. (1982) obtienen un intervalo de  $0 - 550$  fmoles/mg ADN, y una KD de  $1,8 \pm 0,3$  nM. Ekman y col. (1979) obtienen  $566 \pm 317$  fmoles/mg ADN, y una KD de  $0,61$  nM ( $n = 40$ ) y Barrack y col. (1983)  $428 \pm 35$  fmoles/mg ADN ( $n = 18$ ). Además, si nuestros resultados se expresan en fmoles/mg de proteína ( $54 \pm 33$  fmoles/mg de proteína; KD  $1,01 \pm 0,61$ ), se obtienen valores similares a los de Corrales y col. (1983) ( $45 \pm 20$  fmoles/mg de proteína; KD  $1,03 \pm 0,5$ ), Murthy y col (1986) ( $45,7 \pm 16,9$  fmoles/mg de proteína; KD  $1,4 \pm 0,6$  nM), Snochowski y col. (1977) ( $28,3 - 30,1$  fmoles/mg de proteína; KD  $1,48 \pm 0,11$ ) y Ekman y col. (1979) ( $35 \pm 20$  fmoles/mg de proteína; KD  $0,6 \pm 0,2$  nM)

La determinación de receptores totales en células intactas, referida a unidad de peso de ADN, da lugar en 29 muestras a un amplio margen de valores (57 - 4786 fmol/mg ADN). No obstante, estos resultados son comparables a los de Shain y col. (1980) ( $771 \pm 210$  fmol/mg ADN;  $n = 22$ ) y a los de Barrack y col. (1983) ( $872 \pm 32$  fmol/mg ADN;  $n = 18$ ). En la literatura consultada, no se han encontrado referencias de receptores totales expresados en sitios/célula en enfermos de HBP. El único trabajo, de los consultados, que expresa sus resultados en sitios/célula, fue realizado en células prostáticas de perro (Turcotte y col., 1988), donde se determinaron  $6624 \pm 4577$  sitios/célula;  $KD = 2 \pm 0,2$  nM;  $n = 34$ . Sin embargo, el contenido medio de receptores de esteroides que presenta una célula diana (Alberts y col., 1983) se corresponde con el promedio de nuestros resultados.

En cuanto a los receptores nucleares sal-extraíbles, los resultados obtenidos son comparables a los de Kyprianou y Davies (1986) ( $346 \pm 107$  fmol/mg ADN;  $n = 7$ ) y a los de Barrack y col. (1983) ( $241 \pm 12$  fmol/mg ADN;  $n = 18$ ), aunque inferiores a los de Trachtenberg y col. (1982) (616

$\pm 117$  fmol/mg ADN;  $n = 9$ ) y Grimaldo y Meikle (1984) ( $1185 \pm 84$ ;  $n = 9$ ). Por otra parte, los sal-resistentes son de número semejante a los así obtenidos por Kyprianou y Davies (1986) ( $125 \pm 24$  fmol/mg ADN;  $n = 7$ ), y ligeramente inferiores a los de Barrack y col. (1983) ( $240 \pm 11$  fmol/mg ADN).

Con respecto a la diferencia de resultados en caso de los receptores nucleares sal-extraíbles con los trabajos de Grimaldo y Meikle (1984) y Trachtenberg y col. (1982), hay que resaltar que los primeros autores utilizan un compuesto mercurial ("mersalil acid"), que disocia del 80 al 90 % del andrógeno endógeno unido al receptor (Traish y col., 1981), por lo que determinan a la vez receptores ocupados y libres. Debido a que nosotros no determinamos todos los receptores ocupados, es lógico que nuestros resultados sean inferiores a los de estos autores, aunque la KD sea similar ( $3,2 \pm 0,2$ ). Además, al no detectar ellos receptores nucleares sal-resistentes, es de suponer que, por el procedimiento empleado, se hayan extraído todos los receptores asociados a matriz en la fracción sal-extraíble. Sin embargo, Trachtenberg y col. (1982), empleando el mismo ligando y la misma

metodología que nosotros, obtienen un número mayor de receptores, pero con valores de KD ( $3,8 \pm 0.4$  nM) muy similares, por lo que las diferencias pudieran ser debidas a aquellas inherentes al material de enfermos con HBP.

Los receptores nucleares en tejido hiperplásico de enfermos con HBP, por el método de las células dispersas tras purificación (Donnelly y col., 1984), da lugar a resultados comparables con los de Lieskovsky y Bruchovsky, (1979), que determinan receptores nucleares por cromatografía de exclusión (Sephadex), también en núcleos purificados, expresando sus resultados en moléculas/núcleo, es decir de la misma forma que nosotros. Ellos encuentran en 11 muestras de HBP  $1400 \pm 300$  moléculas/núcleo (nosotros:  $1287 \pm 732$  moléculas/núcleo). Kyprianou y Davies (1986) hallan  $5170 \pm 1308$  moléculas/núcleo en receptores nucleares totales, determinados en células epiteliales de próstatas hiperplásicas, siendo  $1400 \pm 270$  moléculas/núcleo receptores sal-resistentes. Puesto que estos últimos resultados son idénticos a los de Lieskovsky y Bruchovsky (1979), y similares a los nuestros, parece ser que los receptores asociados a

matriz nuclear (sal-resistentes) corresponden a receptores funcionalmente activos, ya que en la matriz nuclear es donde se localizan los sitios aceptores, para la interacción entre receptores y núcleo (Barrack, 1987).

La observación de que el número de receptores androgénicos nucleares en la zona externa de próstatas hiperplásicas sea mayor que en el tejido hiperplásico, no discrepa con los resultados obtenidos por Bowman y col (1986), los cuales hallan un mayor número de receptores citosólicos en la zona externa de la próstata que en la zona media. En estas dos zonas, el número de receptores es mayor que en la zona próxima a la uretra prostática. Por tanto, parece evidente que existe una variación regional en la glándula, en cuanto al número de receptores androgénicos (Bowman y col., 1986; Gorelic y col., 1987). Este hecho parece lógico, puesto que la andrógeno dependencia es distinta según las zonas de la próstata, siendo las células glandulares de la parte externa más andrógenodependiente que las de la parte interna (Blacklock, 1991).

Es posible que, en muestras obtenidas por resección transuretral, el calor producido por el resectoscopio desnaturalice receptores, subestimándolos al ser cuantificados (Shain y col., 1978; Kitano y col., 1983; Kyprianou y col., 1985; Snochowski y col., 1977; Benson y col., 1985). Sin embargo, en nuestro caso no hallamos diferencias entre el número de receptores totales determinados por resección transuretral, y el determinado por cirugía abierta. En el primer caso, el número de receptores corresponde a  $10.776 \pm 8.319$  sitios/célula, y la edad a  $69 \pm 8$  años, mientras que el número de receptores correspondientes a muestras extraídas por enucleación transvesical, es de  $9.541 \pm 8.845$  sitios/célula, y la edad de  $71 \pm 9$  años, no apreciándose, por tanto, diferencias significativas entre ambos métodos de extracción quirúrgica, como otros autores también describen (Bowman y col., 1985; Habib y col., 1986; Fentie y col., 1986; Frydenberg y col., 1991).

Nuestros resultados apuntan que el número de receptores androgénicos aumenta con la edad. Por una parte, el número de receptores citosólicos presenta una tendencia al ascenso, según avanza la edad. Este

hecho es corroborado por el incremento de los receptores androgénicos totales con la edad, determinados por el método de dispersión celular, siendo estadísticamente significativo. Sin embargo, este aumento con la edad no ha sido observado por otros autores, como Corrales y col. (1983). Estos autores no corrigen con la celularidad, es decir no refieren los resultados a mg de ADN o a célula. Por otra parte, cuando nuestros datos se expresan en fmol/mg de proteína o mg de tejido frente a la edad, al igual que estos autores, no hallamos el comportamiento edad dependiente. Ekman y col. (1979) tampoco encuentra correlación entre el número de receptores y la edad, aunque en este caso los datos se expresan en fmol/mg ADN. Aparte de que el trabajo sólo contiene la mencionada aseveración sin que aparezcan las edades de los enfermos estudiados, y por tanto, no sea posible hacer comprobación alguna, los autores emplean para la cuantificación de receptores la Metiltrienolona, un andrógeno sintético de características similares a la Mibolerona utilizada por nosotros, pero no bloquean los receptores de progesterona, por lo que determina a la vez receptores de andrógenos y de progesterona, como los mismos autores reconocen. Finalmente,

Trachtemberg y col. (1982) no hallan un aumento de receptores de andrógenos citosólicos en HBP con la edad, pero sus estudios se basan en sólo 9 pacientes, de los cuales 3 no tenían receptores medibles. De los 6 restantes, el intervalo de edad era de los 55 a los 69 años, por tanto, debido a tan estrecho intervalo de edad, y al mínimo número de casos estudiados, estos datos tampoco son susceptibles de comparación.

El comportamiento de los receptores nucleares frente a la edad, tanto los extraíbles como los resistentes a altas concentraciones iónicas, no presenta un aumento, sino más bien una tendencia a disminuir con la edad, aunque en ninguno de los dos casos esta tendencia sea estadísticamente significativa. Por otra parte, en núcleos purificados, el número de receptores nucleares totales, determinados en células intactas, no presenta diferencias con la edad, y este comportamiento es igual, tanto para tejido hiperplásico, como para la zona externa de próstatas con HBP. Van Aubel y col. (1985), tampoco hallan una correlación entre la edad del individuo y el número de receptores nucleares extraíbles con heparina. Por otra parte, Lanisnitzi y col. (1988), empleando

técnicas de autorradiografía, observan que la captación nuclear de los andrógenos, por parte de células prostáticas hiperplásicas, tiende a disminuir con la edad del individuo. Por el contrario, una tendencia al aumento de los receptores androgénicos nucleares con la edad, ha sido hallada por Hulka y col. (1987). Por técnicas de autorradiografía, donde la unión del andrógeno al receptor es exclusivamente nuclear, estos autores observan mayor contenido de receptores en muestras de HBP correspondientes a los mayores de 70 años. Resultados similares también han sido observados en estudios realizados en perros con HBP (Trachtemberg y col., 1980).

Se ha observado que los tratamientos que inducen un bloqueo androgénico, producen cambios en el número de receptores. Los receptores nucleares, son inhibidos significativamente por la castración con agonistas de la LHRH (Forti y col., 1989), por los antiandrógenos que bloquean el receptor, como la Flutamida y por los antiandrógenos en combinación con antiestrógenos (Petrangeli y col., 1988). Sin embargo, los citosólicos aumentan significativamente tras el tratamiento con análogos de la LHRH (Forti y col., 1989). En estudios con ratas se han hallado los

mismos resultados, observándose una disminución en el número de receptores tras la castración, seguido de un posterior aumento según avanza el tiempo (Greenstein, 1979; Robel y col., 1983; Shan y col., 1990). De cualquier forma parece ser que el número de receptores es inversamente proporcional a la concentración sanguínea de andrógenos, por lo que se sugiere un mecanismo de regulación negativa (down-regulation) de su receptor (Shan y col., 1990).

Si la castración con los análogos de la LHRH reduce los niveles plasmáticos de testosterona, y en contraposición a esta bajada de hormona los receptores citosólicos aumentan, una posible explicación del incremento que observamos del número de receptores con la edad, podría ser debida a la bajada de los niveles de testosterona según avanza la edad. Sin embargo, aunque se ha descrito que la testosterona libre desciende con la edad (Vermeulen y col., 1971; Partin y col., 1991), si tenemos en cuenta que nuestros datos no apuntan hacia una bajada significativa de testosterona (tal vez debido a que la fracción determinada es la total), al menos en el intervalo de edad de nuestros resultados, éste aumento del número de receptores podría ser debido a

otras causas. Hay que tener además en cuenta, que nuestro estudio es transversal, en una muestra dentro de un marco de edad relativamente estrecho. De aquí que descensos individuales más o menos ligeros de testosterona precisen el estudio longitudinal para su demostración, ya que la variación interindividual puede "neutralizar" una correlación que biológicamente no dejaría de ser independiente.

Por otra parte, como el método de cuantificación de receptores en células intactas mide en el núcleo los receptores funcionalmente activos, parece razonable, por tanto, que el número de receptores superior al de los localizados en el núcleo pueda tratarse de receptores funcionalmente no activos. Su aumento con la edad, pudiera ser inherente al proceso lógico del envejecimiento.

El aumento de receptores no funcionales con la edad puede ser explicado, tanto si aceptamos el modelo de mecanismo de acción de "dos pasos", como si consideramos que sólo existen receptores nucleares. En el modelo de "dos pasos", este hecho podría ser explicado como una alteración del proceso de traslocación nuclear, según avanza la edad. Pero si

consideramos el modelo que postula la existencia única de receptores nucleares, el ascenso de receptores totales, puede ser debido a un aumento de receptores funcionalmente inactivos. Independientemente de estimar uno u otro modelo, el número de receptores que aumentan con la edad deben ser considerados como receptores funcionalmente no activos, ya que en cualquier caso, para que el receptor ejerza su acción debe unirse al núcleo.

Al igual que otros autores (Partin y col., 1991), hemos hallado un ascenso del volumen prostático con la edad. Por otra parte, no existe correlación lineal entre el número de receptores y el volumen prostático, aunque parece ser que el mayor número de receptores lo tienen las células de las próstatas más hiperplásicas. En otros trabajos tampoco se ha hallado correlación entre el número de receptores y el peso del tejido hiperplásico (Snochowski y col., 1977; Ekman y col., 1979; Corrales y col., 1983), y lo mismo se ha observado en estudios con perros (Lamarre y col., 1985). Estos resultados no son sorprendentes, si se tiene en cuenta que la próstata hiperplásica es fundamentalmente debida al aumento del estroma (McNeal, 1972).

Por otra parte, Sepplet (1978) encuentra una correlación entre el tejido fibromuscular de la próstata y el estradiol, así como entre la excreción urinaria del estradiol y el estroma prostático, lo cual sugiere que el desarrollo del estroma es principalmente estrógeno dependiente. Además, el epitelio es más andrógeno dependiente que el estroma, ya que posee un mayor número de receptores androgénicos (Lasnitzki y col., 1989; Kiprianou y Davies, 1986). No obstante, experimentalmente se ha desarrollado hiperplasia de próstata por tratamiento con andrógenos y estrógenos (Moore y col., 1979). Aunque la influencia de los estrógenos en el desarrollo de la HBP es evidente, otros factores, como los de crecimiento, también pueden influir en el desarrollo de la hiperplasia (Griffiths y col., 1991; Frydenberg y col., 1991). Sin embargo, el tratamiento que produce el bloqueo androgénico, ya sea por castración quirúrgica o con análogos de la LHRH, por un bloqueo directo de los receptores, por tratamiento con antiestrógenos, por inhibidores de la 5 $\alpha$ -reductasa, o por una combinación de todos ellos, produce una disminución del volumen prostático (McConnell, 1990; Bosch y col., 1989; Tenaglia y Di Silveiro, 1989; Gormley y Stone, 1991; Geller y col.,

1976) que se acompaña de un descenso del contenido de DHT dentro de la glándula en pacientes con HBP (McConnell, 1990; Petrangelli y col., 1988; Forti y col., 1989; Gormley y Stone, 1991). Esta reducción de volumen parece ser debida a la disminución del componente epitelial (McConnell, 1990). Nuestros resultados apuntan hacia una correlación positiva entre la fosfatasa ácida y el volumen prostático, especialmente entre el volumen y la fracción prostática de esta enzima, lo que subraya la participación de las células prostáticas glandulares en el volumen prostático.

La relación de los resultados obtenidos con la patogénesis de la HBP, puede ser explicada según la hipótesis de Wilson (1980). Para Wilson, tras la observación de una mayor concentración de DHT en próstatas hiperplásicas que en normales (Bartsch y col., 1982; Krieg y col., 1983) y de la inducción experimental de hiperplasia en animales (Karr y col., 1984; Jacobi y col., 1978; Moore y col., 1979), la causa del desarrollo de la HBP es la acumulación de DHT dentro de la glándula. Esta acumulación puede ser debida a que el catabolismo de la DHT esté disminuído en la HBP (Tunn y col., 1987), que la tasa de

formación de DHT esté aumentada (Krieg y col., 1981) y un aumento de la unión de la DHT dentro de la próstata hiperplásica, vía proteínas transportadoras (Horst y col., 1974; Bartsch y col., 1977; Dennis y col., 1977) o vía receptor. Además, se ha hallado un menor número de receptores nucleares en próstatas normales que en HBP (Grimaldo y Meikle, 1984). Los estrógenos actuarían sinérgicamente con los andrógenos, aumentando el número de receptores androgénicos nucleares, desarrollando simultáneamente una HBP (Trachtenberg y col., 1980). Además, se ha comprobado que el tratamiento con antiestrógenos disminuye significativamente el número de receptores androgénicos nucleares (Albert y col., 1984). Este efecto de los estrógenos sobre los receptores de andrógenos se corrobora con nuestros resultados, ya que hallamos una correlación estadísticamente significativa entre los niveles séricos de estradiol y el número de receptores androgénicos nucleares de las células epiteliales de próstatas hiperplásicas.

Referente al número de receptores androgénicos nucleares en células intactas de biopsias realizadas a pacientes con adenocarcinoma de próstata, los resultados obtenidos en 6 muestras son comparables a

los de Lieskovsky y Bruchovsky (1979), en 5 muestras de carcinomas, los cuales obtienen  $1900 \pm 200$  moléculas/núcleo.

La diferencia en cuanto al comportamiento andrógeno-dependiente del cáncer con respecto a la HBP, se observa al comparar los resultados de receptores nucleares en ambas alteraciones. Se observa que, aunque no existen diferencias en cuanto al número de receptores obtenidos de la misma zona de la glándula, es decir de la zona externa prostática, hay un aumento estadísticamente significativo entre los receptores determinados en biopsias con cáncer y los determinados en tejido hiperplásico de HBP ( $P < 0,01$ ). En otros trabajos se han obtenido los mismos resultados, ya que en muestras del mismo origen con cáncer e HBP, ya sea en biopsias (Van Aubel y col., 1985) o en muestras obtenidas por resección transuretral (Habib y col., 1986; Rio y Offner, 1982; Emtage y col., 1989; Shain y col., 1983), no se han encontrado diferencias en cuanto al número de receptores androgénicos, mientras que en las de origen distinto, el número de receptores es mayor en cáncer que en HBP (Shimazaki y col., 1981; Masai y col., 1990). Sin embargo, en otros estudios, en

muestras del mismo origen, se ha hallado un mayor número de receptores en cáncer que en HBP, aunque este aumento no es significativo (Ghanadian y col., 1978; Lieskovsky y Bruchovsky, 1979). Por el contrario, en otros trabajos se ha observado un mayor número de receptores en HBP que en cáncer, en muestras del mismo origen (Barrack y col., 1983).

Actualmente el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata se realiza evaluando las concentraciones sanguíneas del PSA. Este marcador tumoral es bastante específico y sensible, por lo que se ha considerado esencial en la evaluación de la progresión de los tumores de próstata (Ferro y col., 1987). Sin embargo, ya que este marcador tumoral también se halla elevado en prostatitis y en algunos pacientes con HBP (Stamey y col., 1987), dando lugar a falsos positivos (Morote y col., 1986), su empleo no asegura el pleno acierto en el diagnóstico y evaluación del cáncer de próstata. A pesar de todo, actualmente es el único parámetro disponible para aplicar los distintos tipos de terapia contra los tumores de próstata. Puesto que hemos encontrado una correlación estadísticamente significativa entre el PSA y el número de receptores androgénicos nucleares

en enfermos con HBP, en la misma zona donde se desarrolla el cáncer, podríamos esperar - con un número mayor de casos de cáncer estudiados - que el método aquí desarrollado para la determinación de receptores pueda tener una futura utilidad en el diagnóstico y seguimiento de tumores de próstata hormonodependientes.

## **CONCLUSIONES**

1.- En enfermos de hiperplasia benigna prostática, el número de receptores androgénicos de células epiteliales depende de la zona de la próstata de donde procedan las células. Las células de la zona externa son más ricas en receptores androgénicos que las de la zona interna. Es decir, se encuentran en mayor abundancia en la parte donde regularmente se desarrolla el cáncer y en menor número en las células de la zona en la que primordialmente se localiza la hiperplasia.

2.- Los receptores medidos en células aisladas son en número superior a cuando sólo se prepara el núcleo de estas células. La substracción del resultado de los receptores nucleares, de la cantidad total por célula intacta, corresponde al valor de los receptores citosólicos medidos por el procedimiento convencional tras homogeneización del material. Sólo los receptores nucleares pueden ser considerados como funcionalmente activos, por lo que, probablemente, más allá de la cifra equimolar los restantes citoplasmáticos no deben ser funcionales.

3.- En el estudio transversal por edad cronológica de la muestra de enfermos de hiperplasia benigna prostática, los receptores totales por célula aumentan a medida que avanza la edad, mientras que la cifra de los nucleares permanece invariable. Este comportamiento, que es apoyado por resultados comparables medidos en el citosol y en las distintas preparaciones del núcleo, se interpreta como consecuencia directa del envejecimiento, ya sea como reflejo de una menor degradación de receptores o de una deceleración en el proceso de traslocación nuclear, o una combinación de ambos fenómenos. En cualquier caso, parece lógico que el "exceso" de receptores citosólicos con la edad, no se corresponda con la actividad funcional y, por tanto, se trate de receptores inactivos o ineficaces.

4.- Las células obtenidas de material carcinomatoso poseen un mayor número de receptores que aquellas del material hiperplásico. Es más, cuando la zona hiperplásica de la próstata está invadida por tejido carcinomatoso, el número de receptores asciende y se equipara al comportamiento de las células de la zona externa.

5.- Basándonos en el concepto anterior de receptores funcionalmente activos, para interpretar la efectividad androgénica a través de la cantidad registrada en las diferentes condiciones, así como una mayor edad de los enfermos, se deduce de los resultados que en el grupo de pacientes de hiperplasia benigna el tamaño de la próstata no es andrógenodependiente. Por el contrario, aunque son precisos más estudios para hablar en términos absolutos en el caso del cáncer, la comparación entre las dos zonas prostáticas estudiadas apuntan, no sólo hacia la mayor andrógeno dependencia de la zona externa, sino de su posible relación con la degeneración maligna.

6.- Posiblemente los receptores nucleares de las células en la zona externa de la próstata se modulan por la concentración sanguínea de estradiol, en directa proporcionalidad. Por el contrario, no se encuentra tal relación en el caso de la testosteronemia total.

7.- Mientras que las concentraciones sanguíneas de fosfatasa alcalina, ácida y fracción prostática parecen depender del tamaño o grado de hiperplasia

benigna prostática, sin rebasar las cifras de la normalidad, las del antígeno prostático específico lo harían del potencial de malignidad, expresado en el incremento del número de receptores androgénicos nucleares, de las células localizadas en la zona externa de la próstata.

8.- Por último, se concluye que el procedimiento desarrollado para determinar el número de receptores androgénicos totales o nucleares en células dispersas, significa un método sencillo y fiable que, aplicado a la técnica de biopsia, puede ser muy útil en futuros estudios longitudinales y terapéuticos de evolución.

## **RESUMEN**

Se ha determinado el número de receptores androgénicos en 77 muestras de próstata humana, de las cuales 68 presentaban un diagnóstico anatomopatológico de hiperplasia benigna prostática (HBP), y 9 de adenocarcinoma, con un intervalo de edad de 53 a 83 años. Se midió el número de receptores citosólicos ( $n = 23$ ), y nucleares extraíbles y asociados a matriz ( $n = 8$ ) por homogeneización de tejidos. Por el método de dispersión celular, se determinaron los receptores totales ( $n = 33$ ) en tejido hiperplásico. Los receptores fueron medidos alternativamente o bien en la zona hiperplásica de la próstata ( $n = 18$ ) o en la zona externa ( $n = 5$ ). En 7 próstatas se midieron los receptores nucleares en ambas zonas mencionadas. En 6 enfermos de adenocarcinoma fueron determinados los receptores nucleares y en 3 los totales por célula, aplicando el procedimiento de las células dispersas al material prostático extraído por biopsia. Además del diagnóstico histológico que se correspondía con la zona prostática donde se determinaron los receptores, los enfermos fueron estudiados sistemáticamente mediante la determinación sanguínea de la concentración de testosterona total, estradiol, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida y fracción

prostática, así como el antígeno prostático específico.

En primer lugar, se demuestra que la extracción quirúrgica, ya sea por ectomía o por resección transuretral, no influye en la determinación del número de receptores. De esta forma se descarta también que los resultados obtenidos hubieran podido depender de circunstancias externas.

Por el contrario, en enfermos de hiperplasia benigna prostática, el número de receptores de células glandulares prostáticas asciende con la edad del paciente. Este ascenso se registra solamente en la fracción citosólica, mientras que los localizados en el núcleo - los receptores realmente activos - permanecen inalterados.

Los receptores nucleares son más o menos abundantes según la zona de la próstata de donde procede el material. La zona interna, que responde al área hiperplásica acusa una menor densidad de receptores nucleares que la zona externa.

No obstante, no existe una correlación entre el volumen prostático y el número de receptores en células prostáticas de enfermos con HBP, si bien las cifras más elevadas se encuentran en las células de glándulas de mayor tamaño.

En las células obtenidas de material prostático con adenocarcinoma el número de receptores nucleares es superior, cuando se compara con el de las células de la zona interna (área hiperplásica), en caso de enfermos con sólo hiperplasia. En cambio, si se compara con la zona externa de la próstata hiperplásica, las diferencias son bastante menores, desapareciendo así la significación estadística. Dado que el adenocarcinoma aparece regularmente en la zona externa, es decir, en la parte de mayor número de receptores androgénicos, y dada la relación evolutiva del adenocarcinoma prostático con el efecto de la hormona masculina, se ofrece la deducción que la riqueza de receptores androgénicos nucleares pudiera expresar el riesgo carcinomatoso en el caso de los enfermos de hiperplasia benigna prostática. Efectivamente si la zona interna se encuentra infiltrada por el proceso adenocarcinomatoso, también aquí se observa un aumento considerable del número de

receptores androgénicos totales por célula, en comparación con la misma zona en caso de hiperplasia benigna prostática.

No obstante, no se ha podido demostrar correlación alguna entre las concentraciones séricas de testosterona total y el número de receptores, ya sean totales por célula o nucleares. Al no haber determinado testosterona libre en suero, así como DHT intracelular, la cuestión de la andrógeno dependencia queda todavía pendiente para ulteriores estudios. Además, por un parte, como se menciona arriba, el ascenso de receptores androgénicos es edad dependiente, pero no se refiere a la fracción nuclear, es decir, no debe reflejar una mayor efectividad androgénica. Por otro lado, también se menciona arriba, que son precisamente las células de la zona hiperplásica las que menor número de receptores nucleares tienen; por lógica deberían representar a la zona topográfica de la próstata de menor efectividad androgénica.

Los receptores nucleares de la zona externa de la próstata con hiperplasia benigna, se correlacionan con significación estadística con las concentraciones

séricas de estradiol. Si bien este resultado puede tener una interpretación de efecto indirecto, proporcional al del estradiol sobre la síntesis de la proteína transportadora de andrógenos, y por tanto, carecer de valor patogénico. No obstante, interesa resaltar aquí la relación encontrada entre número de receptores nucleares de las células de la zona prostática externa y la concentración sérica de antígeno prostático específico (PSA). Aun cuando la muestra es pequeña existe significación estadística, lo que parece apuntar hacia la relación entre el número de receptores androgénicos nucleares y el grado de potencial malignidad.

Debido a que la concentración sérica de fosfatasas, tanto de las alcalinas, como de las ácidas, especialmente de la fracción prostática de las últimas, se relaciona con el grado de hiperplasia, es interesante mencionar aquí que la concentración sérica de fosfatasa alcalina se correlaciona inversamente proporcional con la concentración sanguínea de estradiol. Ya que la zona fundamentalmente hiperplásica corresponde fundamentalmente al área de la próstata donde menor número de receptores nucleares se detecta, aún cuando

existe un incremento del componente citosólico con la edad, así como del volumen glandular, todo habla en favor a que esta zona prostática sea distinta a la externa, tanto respecto al tipo de manifestaciones histológicas y serobioquímicas, como a la forma de la hormonodependencia.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Adams R.L.P. (1980). Cell culture for biochemists. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Oxford.

Albert J.D., Geller J., Liu J. y Fabers L.E. Tamoxifen decreases progesterone and nuclear androgen receptors in the human prostate. J. Steroid Biochem. (1984), 21: 659 - 662.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J.D. En Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc. New York & London (1983), 717 - 766.

Anthony C.T., Kovacs W.J. y Skinner M.K. Analysis of the androgen receptor in isolated testicular cell types with a microassay that uses an affinity ligand. Endocrinology (1989), 125: 2628 - 2635.

Auf G. y Ghanadian R. Analysis of androgen receptors in the human prostate by isoelectric focussing in polyacrylamide gel. J. Steroid Biochem. (1981), 14: 1261 - 1267.

Balducci L., Khansur T., Smith T. y Hardy C.  
Prostate cancer: a model of cancer in the elderly.  
Arch. Gerontol. Geriatr. (1989), 8: 165 - 187.

Barrack E.R. y Coffey D.S. The specific binding  
of estrogens and androgens to the nuclear matrix of  
sex hormone responsive tissues. J. Biol. Chem.  
(1980), 255: 7265 - 7275.

Barrack E.R., Bujnovszky P. y Walsh C.  
Subcellular distribution on androgen receptors in  
human normal, benign hyperplastic, and malignant  
prostatic tissues: characterization of nuclear  
salt-resistant receptors. Cancer Res. (1983), 43:  
1107 - 1116.

Barrack E.R. Steroid hormone receptor  
localization in the nuclear matrix: interaction with  
acceptor sites. J. Steroid Biochem. (1987), 27: 115  
- 121.

Barsano Ch. P. y Baumann G. Editorial: simple  
algebraic and graphic methods for the apportionment  
of hormone (and receptor) into bound and free  
fractions in binding equilibria; or how to calculate

bound and free hormone?. *Endocrinology* (1989), 124: 1101 - 1106.

Bartsch W., Horst H-J., Becker H. y Nehse G. Sex hormone binding globulin binding capacity, testosterone, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, oestradiol and prolactin in plasma of patients with prostatic carcinoma under various types of hormonal treatment. *Acta Endocrinol.* (1977), 85: 650 - 664.

Bartsch W., Krieg M., Becker H., Mohrmann J. y Voigt K.D. Endogenous androgen levels in epithelium and stroma of human benign prostatic hyperplasia and normal prostate. *Acta Endocrinol.* (1982), 100: 634 - 640.

Bartsch G., Brüngger A., Schweikert H.U., Hinter H., Höpfl R. y Rohr H.P. Patogenia de la Hiperplasia Benigna Prostática: estudios morfométricos y bioquímicos. En fundamentos científicos de urología. Tomo I, sección 7. Chisholm G. y Fair W. ed. Salvat. (1991).

Baxter J.D. y Funder J.W. Hormone Receptors. *N. Engl. J. Med.* (1979), 301: 1149 - 1161.

Benson R.C., Utz D.C., Holicky E. y Veneziale C.M. Androgen receptor binding activity in human prostate cancer. *Cancer* (1985), 55: 382 - 388.

Berkovitz G.D., Brown T.R. y Migeon C.J. Androgen receptors. *Clin. Endocrinol. Metab.* (1983), 12: 155 - 173.

Blacklock N.J. Fisiología de las secreciones prostáticas. En fundamentos científicos de urología. Tomo I, sección 7. Chisholm G. y Fair W. ed. Salvat. (1991).

Blondeau J-P, y Robel P. Determination of protein-ligand binding constants at equilibrium in biological samples. *Eur. J. Biochem.* (1975), 55: 375 - 384.

Blondeau J-P, Baulieu E-E y Robel P. Androgen-dependent regulation of androgen nuclear receptor in the rat prostate. *Endocrinology* (1982), 110: 1926 - 1932.

Boesel R.W., Klipper R.W. y Shain S.A. Androgen regulation of androgen receptor content and

distribution in the ventral and dorsolateral prostates of aging AXC rats. Steroids (1980), 35: 157 - 176.

Bosch R.J.L.H., Griffiths D.J., Blom J.H.M. y Schroeder F.H. Treatment of benign prostatic hyperplasia by androgen deprivation: effects on prostate size and urodynamic parameters. J. Urol. (1989), 141: 68 - 72.

Bowman S.P., Barnes D.M. y Blacklock N.J. A mini-column method for routine measurement of human prostatic androgen receptors. J. Steroid Biochem. (1985), 21: 421 - 430.

Bowman S.P., Barnes D.M., Blacklock N.J. y Sullivan P.J. Regional variation of cytosol androgen receptors throughout the diseased human prostate gland. Prostate (1986), 8: 167 - 180.

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. (1976), 72: 248 - 253.

Braunsberg H. y Hammond K.D. Methods of steroid receptor calculation: an interlaboratory study. J. Steroid Biochem. (1979), 11: 1561 - 1565.

Braunsberg H. y Hammond K.D. Practical and theoretical aspects in the analysis of steroid receptors. J. Steroid Biochem. (1980), 13: 1133 - 1145.

Buller R.E., Schrader W.T. y O'Malley B.W. Steroids and the practical aspects of performing binding studies. J. Steroid Biochem. (1976), 7: 321 - 326.

Burton K. A study of the conditions and mechanism of the difenilamine reaction for the colorimetric estimation of DNA. Biochem. J. (1956), 62: 315 - 322.

Buttayan R. y Olsson C.A. Androgen receptor assays in advanced prostatic cancer. Urol. Clin. N. Am. (1984), 11: 311 - 317.

Carilla E., Briley M., Fauran F. y Sután Ch. Binding of premixon, a new treatment for prostatic benign hyperplasia, to the cytosolic androgen

receptor in the rat prostate. J. Steroid Biochem (1984), 20: 521 - 523.

Carrol S.L., Rowley D.R., Chang C.H. y Tindall D.J. Exchange assay for androgen receptors in the presence of molybdate. J. Steroid Biochem. (1984), 21: 353 - 359.

Castellanos J.M., Galán A., Calvo M.A. y Schwartz S. Valor predictivo de la determinación de receptores en el carcinoma de próstata. Rev. Esp. Oncología (1984), 31: 265 - 277.

Chamness G.C. y McGuire W.L. Scatchard plots: common errors in correction and interpretation. Steroids (1975); 26: 538 - 542.

Chevalieur S., Bleau G., Roberts K.D. y Chapdelaine A. Characterization of canine prostatic cells from normal and hyperplastic glands. Molec. Cell Endocrinol. (1980), 20: 59 - 70.

Clark J.H. y Peck E. Steroid hormone receptors: basic principles and measurement. En "Receptors and hormone action II". B.W. O'Malley and L. Birnbaumer

eds. Acad. Press N.Y. (1978), 383 - 410.

Cleland W.W. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* (1964), 3: 480 - 482.

Colvard D.S., Jankus W.R., Berg N.J., Graham II M.L., Jiang N-S., Ingle J.N. y Spelsberg T.C. Microassay for nuclear binding of steroid receptors with use of intact cells from small samples of avian and human tissue. *Clin. Chem.* (1988), 34/2: 363 - 369.

Corrales J.J., Miralles J.M., Montero J., Martín T., Martín-Rodríguez M. y Gonzalez J.M. Receptores de andrógenos en el citosol de la hiperplasia benigna de próstata. *Rev. Clin. Esp.* (1983), 168: 233 - 237.

Daniels G.F. y Grayhack J.T. Fisiología de las secreciones prostáticas. En fundamentos científicos de urología. Tomo I, sección 7. Chisholm G. y Fair W. ed. Salvat. (1991).

Davies P., Thomas P. y Griffiths K. Measurement of free and occupied cytoplasmic and nuclear androgen

receptor sites in rat ventral prostate gland. J. Endocr. (1977), 74: 393 - 404.

Dennis M., Horst H-J., Krieg M. y Voigt K.D. Plasma sex hormone-binding globulin binding capacity in benign prostatic hypertrophy and prostatic carcinoma: comparison with an age dependent rise in normal human males. Acta Endocrinol. (1977), 84: 207 - 214).

Donnelly B.J., Lakey W.H. y McBlain W.A. Androgen binding sites on nuclear matrix of normal and hyperplastic human prostate. J. Urol. (1984), 131: 806 - 811.

Eisenthal R. y Cornish-Bowden A. The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. Biochem. J. (1974), 139: 715 - 720.

Ekman P., Snochowski M., Dahlberg E., Bression D., Högberg B. y Gustafsson J-Å. Steroid receptor content in cytosol from normal and hyperplastic human prostates. J. Clin. Endocrinol. Metab. (1979), 49: 205 - 215.

Ekman P., Snochowski M., Zetterberg A., Högberg B. y Gustafsson J-Å. Steroid receptor content in human prostatic carcinoma and response to endocrine therapy. *Cancer* (1979), 44: 1173 - 1181.

Emtage L.A., Dunn P.J.S. y Rowse A.D. Androgen and oestrogen receptor status in benign and neoplastic prostate disease. Study of prevalence and influence on time to progression and survival in prostate cancer treated by hormone manipulation. *Br. J. Urol.* (1989), 63: 627 - 633.

E.O.R.T.C. Breast Co-operative Group. Revision of the standards for the assessment of hormone receptors in human breast cancer; report of the second E.O.R.T.C. workshop, held on 16-17 March, 1979, in the Netherlands Cancer Institute. *Europ. J. Cancer* (1980), 16: 1513 - 1515.

Evans B.A.J. y Hughes L.A. Augmentation of androgen-receptor binding in vitro: studies in normals and patients with androgen insensitivity. *Clin. Endocrinol.* (1985), 23: 567 - 577.

Farnsworth W.E y Brown J.R. Metabolism of testosterone by the human prostate. JAMA (1962), 183: 436 - 439.

Fentie D.D., Lakey W.H. y McBlain W.A. Applicability of nuclear androgen receptor quantification to human prostatic adenocarcinoma. J. Urology (1986), 135: 167 - 173.

Ferro M.A., Barnes I., Roberts J.B.M. y Smith J.B. Tumour markers in prostatic carcinoma. A comparison of prostate-specific antigen with acid phosphatase. Br. J. Urol. (1987), 60: 69 - 73.

Fichman K.R., Nyberg L.M., Bujnovszky P., Brown T.R. y Walsh P.C. The ontogeny of the androgen receptor in human foreskin. J. Clin. Endocrinol. Metab. (1981), 52: 919 - 923.

Floridi A. Quantitation of estradiol receptors by radioimmunoassay. Methods Enzymol. (1981), 74: 420 - 431.

Forti G., Salerno R., Moneti G., Zoppi S., Fiorelli G., Marinoni T., Natali A., Costantini A.,

Serio M., Martini L. y Motta M. Three-month treatment with a long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist of patients with benign prostatic hyperplasia: effects on tissue androgen concentration, 5 $\alpha$ -reductase activity and androgen receptor content. J. Clin. Endocrinol. Metab. (1989), 68: 461 - 468.

Frydenberg M., Foo T.M.S., Jones A.S., Grace J., Hensley W.J., Rogers J., Pearson B.S. y Raghavan D. Benign Prostatic Hyperplasia-video image analysis and its relationship to androgen and epidermal growth factor receptor expression. J. Urol. (1991), 146: 872 - 876.

Galán A., Calvo M.A. y Castellanos J.M. En correlaciones entre receptores hormonales y tratamiento. 46 Congreso Nacional de la Asociación Española de Urología. Madrid Ed. (1981).

García de la Peña E. anatomía del cáncer de próstata. En Tratamientos actuales del carcinoma de próstata. Receptores hormonales. 46 Congreso Nacional de la Asociación Española de Urología. Madrid Ed. (1981).

Gaubert C.M., Tremblay R.R. y Dubé J.Y. Effect of sodium molybdate on cytosolic androgen receptors in rat prostate. *J. Steroid Biochem.* (1980), 13: 931 - 937.

Geller J., Albert J., Geller S., Lopez D., Cantor T. y Yen S. Effect of Megestrol acetate (Megace) on steroid metabolism and steroid-protein binding in the human prostate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1976), 43: 1000 - 1008.

Ghanadian R., Auf G., Chaloner P.J. y Chisholm G.D. The use of methyltrienolone in the measurement of the free and bound cytoplasmic receptors for dihydrotestosterone in benign hypertrophied human prostate. *J. Steroid Biochem.* (1978), 325 - 330.

Ghanadian R., Auf G., Chisholm G.D. y O'donoghue P.N. Receptor proteins for androgens in prostatic disease. *Br. J. Urol.* (1978), 50: 567 - 569.

Giannopoulos G. Binding of testosterone to cytoplasmic components of the immature rat uterus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1971), 44: 943 - 951.

Gil Vernet S. Patología urogenital I. Biología y patología de la próstata. Ed. Paz Montalvo. Madrid (1953): 3- 33.

Godefroi V.C. y Brooks S.C. Improved gel-filtration method for analysis of estrogen receptor binding. Anal. Biochem. (1973), 51: 335 - 344.

Gorelic L.S., Lamm D.L., Ramzy I., Radwin H.M. y Shain S.A. Androgen receptors in biopsy specimens of prostate adenocarcinoma. Heterogeneity of distribution and relation to prognostic significance of receptor measurements for survival of advanced cancer patients. Cancer (1987), 60: 211 - 219.

Gormley G.J. y Stoner E. The role of 5 $\alpha$ -reductase inhibitors in the treatment of benign prostatic hiperplasia. Probl. Urol. (1991), 5: 436 - 440.

Greenstein B.D. Androgen receptors in the rat brain, anterior pituitary gland and ventral prostate gland: effects of orchidectomy and ageing. J. Endocr. (1979), 81: 75 - 81.

Griffiths K., Eaton C.L., Harper M.E., Peeling B. y Davies P. Steroid hormones and the pathogenesis of Benign Prostatic Hyperplasia. Eur. Urol. (1991), 20: 68 - 77.

Grimaldo J.I. y Meikle A.W. Increased levels of nuclear androgen receptors in hyperplastic prostate of aging men. J. Steroid Biochem. (1984), 21: 147 - 150.

Gustafsson J-Å, Ekman P., Snochowski M., Zetterberg A., Pousette Å. y Högberg B. Correlation between clinical response to hormone therapy and steroid receptor content in prostatic cancer. Cancer Res. (1978), 38: 4345 - 4348.

Habib F.K., Odoma S., Busuttil A. y Chisholm G.D. Androgen receptors in cancer of the prostate. Correlation with the stage and grade of the tumor. Cancer (1986), 57: 2351 - 2356.

Hansson V., Tveter K.J., Attramadal A. y Torgersen O. Androgenic receptors in human benign nodular prostatic hyperplasia. Acta Endocrinol. (1971), 68: 79 - 88.

Harper M.E., Wilson D.W., Jensen H.M.,  
Pierrepont C.G. y Griffiths K. Steroid hormone  
concentrations in relation to patient prognosis and  
prostate tumour grade. J. Steroid Biochem. (1987),  
27: 521 - 524.

Hechter O., Mechaber D., Zwick A., Campfield  
L.A., Eychenne B., Balieu E-E. y Robel P. Optimal  
radioligand conditions for measurement of occupied  
androgen receptor sites in rat ventral prostate.  
Arch. Biochem. Biophys. (1983), 224: 49 - 68.

Hicks L.L. y Walsh P.C. A microassay for the  
measurement of androgen receptors in human prostatic  
tissue. Steroids (1979), 33: 389 - 406.

Horst H-J., Becker H. y Voigt K.D. The  
determination in human males of specific testosterone  
and 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone binding to sex hormone  
binding globulin by a differential dissociation  
technique. Steroids (1974), 23: 833 - 844.

Horton R. Benign Prostatic Hyperplasia: a  
disorder of androgen metabolic in the male. J. Am.  
Geriatr. Soc. (1984), 32: 380 - 385.

Hulka B.S., Beckman W.C., Checkoway H., DiFerdinando G., Hammond J.E., Fried F.A., Mickey D.D., Stumpf W.E. y Clarck T.D. Androgen receptors detected by autoradiography in prostatic hyperplastic tissue. *Prostate* (1987), 10: 223 - 233.

Jacobi G.H., Moore R.J. y Wilson J.D. Studies on the mechanism of  $3\alpha$ -androstane- $17\beta$ -diol-induced growth of the dog prostate. *Endocrinology* (1978), 102: 1748 - 1755.

Jensen E.V. y De Sombre E.R. Estrogen-receptor interaction. Estrogenic hormones effect transformation of specific receptor proteins to a biochemically functional form. *Science* (1973), 182: 126 - 134.

Jones D.R., Parkinson M.C., Griffiths G.J., Davies R. LL. y Peeling W.B. Origin and structure of benign prostatic hyperplasia. *Br. J. Urol.* (1990), 66: 506 - 508.

Karr J.P., Kim U., Resko J.A., Scheneider S., Chai L.S., Murphy G.P. y Sandberg A.A. Induction of benign prostatic hypertrophy in baboons. *Urology*

(1984), 23: 276 - 289.

Killian C.S. y Chu T.M. Prostate-specific antigen: questions often asked. Cancer Invest. (1990), 8: 27 - 37.

King W.J. y Greene G.L. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. Nature (1984), 307: 745 - 747.

Kirdani R.Y., Pontes E.J., Murphy G.P. y Sandberg A.A. A micromethod for the measurement of estrogen receptors using high pressure liquid chromatography. J. Steroid Biochem. (1982), 17: 311 - 317.

Kitano T., Usui T., Yasukawa A., Nakahara M., Nihira H. y Miyachi Y. Androgen receptor in electroresected and cold punch-resected specimens. Urology (1983), 21: 119 - 122.

Klein L.A. Prostate carcinoma. N. Engl. J. Med. (1979), 300: 824 - 833.

Kline L.D., Lefebvre F-A. T. y Lefebvre Y.A. Uptake of androgens by intact and detergent-treated

nuclei from the rat ventral prostate. *J. Steroid Biochem.* (1981), 14: 855 - 860.

Krieg M., Bartsch W., Herzer S., Becker H. y Voigt K.D. Quantification of androgen binding, androgen tissues levels, and sex hormone-binding globulin in prostate , muscle and plasma of patients with benign prostatic hypertrophy. *Acta Endocrinol.* (1977), 86: 200 - 215.

Krieg M., Grobe I., Altenähr E. y Voigt K.D. Differences in androgen binding and metabolism between human prostatic carcinoma and human prostatic hypertrophy. *Acta Endocrinol.* (1978), 87: 140 - 141.

Krieg M., Grobe I., Voigt K.D., Altenähr E. y Klosterhalfen H. Human prostate carcinoma: significant differences in its androgen binding and metabolism compared to the human benign prostatic hypertrophy. *Acta Endocrinol.* (1978), 88: 397 - 407.

Krieg M., Kaufmann J. y Voigt K.D. Stroma of human benign prostatic hyperplasia: preferential tissue for androgen metabolism and oestrogen binding. *Acta Endocrinol.* (1981), 96: 422 - 432.

Krieg M., Bartsch W., Thomsen M. y Voigt K.D. Androgens and estrogens: their interaction with stroma and epithelium of human benign prostatic hyperplasia and normal prostate. J. Steroid Biochem. (1983), 19: 155 - 161.

Kyprianou N., Williams H., Peeling W.B., Davies P. y Griffiths K. Evaluation of biopsy techniques for androgen receptor assay in human prostatic tissue. J. Urol. (1986), 58: 41 - 44.

Kyprianou N. y Davies P. Association states of androgen receptors in nuclei of human benign hypertrophic prostate. Prostate (1986), 8: 363 - 380.

Lamarre D., Chevalier S., McKercher G., Bleau G., Roberts K.D. y Chapdelaine A. Quantification of cytosolic steroid receptors in secretory and non-secretory epithelial cells of the canine prostate. J. Steroid Biochem. (1985), 22: 1 - 7.

Laor E., Schiffman Z.J., Braunstein J.D., Reid R.E., Tolia B.M., Koss L.G. y Freed S.Z. Androgen receptors in bladder tumors. Urology (1985), 25: 161 - 163.

Lasnitzki I. y Franklin H.R. The influence of serum on the uptake, conversion and action of dihydrotestosterone in rat prostate glands in organ culture. J. Endocrinol. (1975), 64: 289 - 297.

Lasnitzki I., Takeda H. y Mizuno T. Autoradiographic studies of androgen-binding sites in human benign prostatic hyperplasia in vitro. J. Endocrinol. (1989), 120: 167 - 170.

Leake R.E. y Habib F. Steroid hormone receptors: assay and characterization. Green and Leake ed. Steroid hormones. A practical approach. (1987). IRL Press Ltd., Oxford and Washington DC.

Lieskovsky G. y Bruchovsky N. Assay of nuclear androgen receptor in human prostate. J. Urol. (1979), 121: 54 - 58.

Mainwaring W.I.P. A soluble androgen receptor in the cytoplasm of rat prostate. J. Endocr. (1969), 45: 531 - 541.

Mainwaring W.I.P., y Mangan F.R. A study of the androgen receptors in a variety of androgen-sensitive

tissues. J. Endocr. (1973), 59: 121 - 139.

Mainwaring W.I.P. y Milroy E.J.G.  
Characterization of the specific androgen receptors  
in the human prostate gland. J. Endocr. (1973), 57:  
371 - 384.

Martin P.M. y Sheridan P.J. Towards a new model  
for the mechanism of action of steroids. J. Steroid  
Biochem. (1982), 16: 215 - 229.

Masai M., Sumiya H., Akimoto S., Yatani R., Chang  
Ch., Liao S. y Shimazaki J. Immunohistochemical study  
of androgen receptor in benign hyperplastic and  
cancerous human prostates. Prostate (1990), 17: 293  
- 300.

Max S.R. Cytosolic androgen receptor in skeletal  
muscle from normal and testicular feminization mutant  
(Tfm) rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1981),  
101: 792 - 799.

McConnell J.D. Androgen Ablation and Blockade in  
the treatment of benign prostatic hyperplasia. Urol.  
Clin. North Am. (1990), 17: 661 - 670.

McNeal J.E. The prostate and prostatic urethra: a morphologic synthesis. J. Urol. (1972), 107: 1008 - 1016.

Menon M., Tananis C.E., McLoughlin M.G., Lippman M.E. y Walsh P.C. The measurement of androgen receptors in human prostatic tissue utilizing sucrose density centrifugation and a protamine precipitation assay. J. Urol. (1977), 117: 309 - 312.

Michel G. y Balieu E-E. Androgen receptor in rat skeletal muscle: characterization and physiological variations. Endocrinology (1980), 107: 2088 - 2098.

Moeller H., Oetting G., Fiederer B. y Brüggmann G. A quantitative assay for the cytoplasmic androgen receptor using [<sup>3</sup>H]dihydrotestosterone in the presence of NAD<sup>+</sup>-nucleosidase. Acta Endocrinol. (1983), 102: 153 - 160.

Moore R.J., Gazak J.M., Quebbeman J.F. y Wilson J.D. Concentration of dihydrotestosterone and 3 $\alpha$ -androstenediol in naturally occurring and androgen induced prostatic hyperplasia in the dog. J. Clin. Invest. (1979), 64: 1003 - 1010.

Morishige W.K. y Uetake C-A. Receptors for androgen and estrogen in the rat lung. *Endocrinology* (1978), 102: 1827 - 1837.

Morote J., Ruibal A. y Palou J. Evaluation of specific antigen and prostatic acid phosphatase specificity. Study of false values. *Int. J. Biol. Markers*. (1986), 3: 141 - 146.

Motta M., Zoppi S. y Martini L. In vitro metabolism of testosterone in the rat prostate: influence of aging. *J. Steroid Biochem.* (1986), 25: 897 - 903.

Murthy L.R., Chang C.H., Rowley D.R., Scardino P.T. y Tindall. Physicochemical characterization of the androgen receptor from hyperplastic human prostate. *Prostate* (1984), 5: 567 - 579.

Murthy L.R., Johnson M.P., Rowley D.R., Young C.Y.F., Scardino P.T. y Tindall. Characterization of steroid receptors in human prostate using Mibolerone. *Prostate*. 1986; 8: 241 - 253.

Noma K., Nakao K., Sato B., Nishizawa Y.,  
Matsumoto K. y Yamamura Y. Effect of molybdate on  
activation and stabilization of steroid receptors.  
Endocrinology (1980), 107, 1205 - 1211.

Ojasoo T., Deletreé J., Mornon J.P.,  
Turpin-VanCyccke C. y Raynaud J.P. Towards the mapping  
of the progesterone and androgen receptors. J.  
Steroid Biochem. (1987), 27: 255 - 269.

Ono K., Haji M., Nawata H., Maki T., Kato K-I. y  
Ibayashi H. Age-related changes in glucocorticoid and  
androgen receptors of cultured human pubic skin  
fibroblasts. Gerontology (1988), 34: 128 - 133.

Parikh I., Rajendran K.G., Su J-L., Lopez T. y  
Sar M. Are estrogen receptors cytoplasmic or nuclear  
?. Some immunocytochemical and biochemical studies.  
J. Steroid Biochem. (1987), 27: 1 - 3.

Partin A. W., Oesterling J.E., Epstein J.I.,  
Horton R. y Walsh P. Influence of age and endocrine  
factors on the volume of benign prostatic  
hyperplasia. J. Urol. (1991), 145: 405 - 409.

Pavlik E.J., Van Nagell J.R., Muncey M., Donaldson E.S., Hanson M., Kenady D. Rees E.D. y Talwalkar V.R. Rapid analysis of estrogen and progesterone receptors using gel-exclusion high-performance liquid chromatography. *Biochemistry* (1982), 21: 139 - 145.

Pearce P., Khalid B.A.K. y Funder J.W. Androgen and the thymus. *Endocrinology* (1981), 109: 1073 - 1077.

Pertschuk L.P., Rosenthal H.E., Macchia R.J., Eisemberg K.B., Feldman J.G., Wax S.H., Kim D.S., Whitmore W.F., Abrahams J.I., Gaetjens E., Wise G.J., Herr H.W., Karr J.P., Murphy G.P. y Sandberg A.A. Correlation of histochemical and biochemical analyses of androgen binding in prostatic cancer. *Cancer* (1982), 49: 984 - 993.

Petrangeli E., Sciarra F., Di Silverio F., Toscano V., Lubrano C., Conti C. y Concolino G. Effects of two different medical treatments on dihydrotestosterone content and androgen receptors in human benign prostatic hyperplasia. *J. Steroid Biochem.* (1988), 30: 395 - 399.

Peters C.A. y Barrack E.R. Androgen receptor localization in the human prostate: demonstration of heterogeneity using a new method of steroid receptor autoradiography. *J. Steroid Biochem.* (1987), 27: 533 - 541.

Prout G.R., Kliman B., Daly J.J., McLaughlin R.A. y Griffin P.P. In vitro uptake of <sup>3</sup>H testosterone and its conversion to dihydrotestosterone by prostatic carcinoma and other tissues. *J. Urol.* (1976), 116: 603 - 610.

Raam S. y Teixeira T. Effect of sodium molybdate on protein measurements: quality control aspects of steroid hormone receptor assays. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* (1985), 21: 1219 - 1223.

Razel A.J., Svensson J. Spelsberg T.C. y Coulam C.B. The androgen receptor in normal human foreskin. I. Stabilization and identification of two receptor subunits. *Am. J. Obstet. Gynecol.* (1985), 153: 410 - 416.

Rennie P.S., Bowden J-F, Bruchovsky N., Frenette P-S, Foekens J.A. y Cheng H. DNA and protein

components of nuclear acceptor sites for androgen receptors in the rat prostate. *J. Steroid Biochem.* (1987), 27: 513 - 520.

Rio M.C. y Offner M. Rapport preliminaire d'une etude comparative des concentrations en recepteurs steroidiens de tissus prostatiques adenomateux et cancreux. *J. Steroid Biochem.* (1982), 17: 435 - 441.

Robel P., Eychehenne B., Blondeau J-P., Jung-Testas I., Groyer M.T., Mercier-Bodard C., Hechter O., Roux Ch. y Dadoune J-P. Androgen receptors in rat and human prostate. *Hormone Res.* (1983), 18: 28 - 36.

Rodbard D., Munson P.J. y Thakur A.K. Quantitative characterization of hormone receptors. *Cancer* (1980), 46: 2907 - 2918.

Rosenthal H.E. A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system. *Anal. Biochem.* (1967), 20: 525 - 532.

Rowley D.R. y Tindall D.J. Androgen receptor protein: purification and molecular properties.

Biochem. Action Horm. (1986), 13: 305 - 324.

Roy A.K., Milin B.S. y McMinn D.M. Androgen receptor in rat liver: hormonal and developmental regulation of the cytoplasmic receptor and its correlation with the androgen-dependent synthesis of  $\alpha_{2u}$  globulin. Biochim. Biophys. Acta (1974), 354: 213 - 232.

Saartok T., Dhalberg E. y Gustafsson J-Å. Relative Binding affinity of anabolic-androgenic steroids: comparison of the binding to the androgen receptors in skeletal muscle and in prostate, as well as to sex hormone-binding globulin. Endocrinology (1984), 114: 2100 - 2106.

Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci. USA (1949), 51: 660 - 672.

Seppelt U. Correlation among prostate stroma, plasma estrogen levels, and urinary estrogen excretion in patients with benign prostatic hypertrophy. J. Clin. Endocrinol. Metab. (1978), 47: 1230 - 1235.

Shan L-X., Rodriguez M.C. y Jänne O.A. Regulation of androgen receptor protein and mRNA concentrations by androgens in rat ventral prostate and seminal vesicles and in human hepatoma cells. *Moll. Endocrinol.* (1990), 4: 1636 - 1646.

Shain S.A., Boesel R.W. y Axelrod L.R. Aging in the rat prostate. Reduction in detectable ventral prostate androgen receptor content. *Arch. Biochem. Biophys.* (1975), 167: 247 - 263.

Shain S.A., Boesel R.W., Lamm D.L. y Radwin H.M. Characterization of unoccupied (R) and occupied (RA) androgen binding components of the hyperplastic human prostate. *Steroids* (1978), 31: 541 - 555.

Shain S.A., Boesel R.W., Lamm D.L. y Radwin H.M. Cytoplasmic and nuclear androgen receptor content of normal and neoplastic human prostates and lymph node metastases of human prostatic adenocarcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1980), 50: 704 - 711.

Shain S.A., Gorelic L.S., Boesel R.W., Radwin H.M. y Lamm D.L. Human prostate androgen receptor quantitation: effects of temperature on assay

parameters. *Cancer Res.* (1982), 42: 4849 - 4854.

Shain S.A., Gorelic L.S., Klipper R.W., Ramzy I., Novicki D.E., Radwin H.M. y Lamm D.L. Inability of cytoplasmic or nuclear androgen receptor content or distribution to distinguish benign from carcinomatous human prostate. *Cancer Res.* (1983), 43: 3691 - 3695.

Sheridan P.J., Buchanan J.M., Anselmo V.C. y Martin P.M. Equilibrium: the intracellular distribution of steroid receptors. *Nature* (1979), 282: 579 - 582.

Shimazaki J., Hikage T., Sato R., Kodama T. y Ito H. Measurement of androgen receptor in cytosols from normal, benign hypertrophic and cancerous human prostates. *Endocrinol. Jpn.* (1981), 28: 725 - 734.

Sinnett-Smith P.A., Palmer C.A. y Buttery P.J. Androgen receptors in skeletal muscle cytosol from sheep treated with Trembolone Acetate. *Horm. Metab. Res.* (1987), 19: 110 - 114.

Smith T., Sutherland F., Chisholm G.D. y Habib F.K. Factors affecting the reproducibility of

androgen receptor determination in human prostate. Clin. Chim. Acta (1983 a), 131: 129 - 141.

Smith T., Chisholm G.D. y Habib F.K. Towards a reproducible method of estimating androgen receptors in human prostate. J. Steroid Biochem. (1983 b).

Snochowski M., Pousette Å., Ekman P., Bression D., Andersson L., Högberg B. y Gustafsson J-Å. Characterization and measurement of the androgen receptor in human benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. J. Clin. Endocrinol. Metab. (1977), 45: 920 - 931.

Spelsberg T.C., Goldberger A., Horton M. y Hora J. Nuclear acceptor sites for sex steroid hormone receptors in chromatin. J. Steroid Biochem. (1987a), 27: 133 - 147.

Spelsberg T.C., Graham M.L., Berg N.J., Umehara T., Riehi E., Coulam C.B. y Ingle J.N. A nuclear binding assay to assess the biological activity of steroid receptors in isolated animal and human tissues. Endocrinology (1987b), 121: 631 - 644.

Stamey T.A., Yang N., Hay A.R., McNeal J., Freiha F.S. y Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. N. Engl. J. Med. (1987), 317: 909 - 916.

Steinsapir J., Evans C., Bryhan M. y Muldoon T.G. Androgen receptor dynamics in the rat ventral prostate. Biochim. Biophys. Acta (1985), 842: 1 - 11.

Tanagho E.A. Anatomy of the lower urinary tract. En Urology. Campbell's, 5th ed. (1986), 46 - 74. Wlasko P., Gittes R.F., Perlmutter A.D. y Stamey T.A. W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Tenaglia R. y Di Silverio Management of benign prostatic hyperplasia with antiandrogens and antiestrogens. Clinical results. En New developments in biosciences T. Prostatic hyperplasia. Etiology, surgical and conservative managenents. (1989), 123 - 129.

Tilley W.D., Keightley D.D. y Marshall V.R. Oestrogen and progesterone receptors in benign prostatic hyperplasia in humans. J. Steroid Biochem. (1980); 13: 395 - 399.

Trachtenberg J., Hicks L.L. y Walsh P.C. Androgen- and estrogen-receptor content in spontaneous and experimentally induced canine prostatic hyperplasia. J. Clin. Invest. (1980), 65: 1051 - 1059.

Trachtenberg J., Hicks L.L. y Walsh P.C. Methods for the determination of androgen receptor content in human prostatic tissue. Invest. Urol. (1981), 18: 349 - 355.

Trachtenberg J., Hicks L.L. y Walsh P.C. Androgen receptor content of normal and hyperplastic human prostate. J. Clin. Endocrinol. Metab. (1982), 54: 17 - 21.

Trachtenberg J. y Walsh P.C. Correlation of prostatic nuclear androgen receptor content with duration of response and survival following hormonal therapy in advanced prostatic cancer. J. Urol. (1982), 127: 466 - 471.

Traish A.M., Muller R.E. y Wotiz H.H. A new procedure for the quantitation of nuclear and cytoplasmic androgen receptors. J. Biol. Chem.

(1981), 23: 12028 - 12033.

Traish A.M., Müller R.E. y Wotiz H.H. Binding of  $7\alpha,17\alpha$ -dimethyl-19-nortestosterone (Mibolerone) to androgen and progesterone receptors in human and animal tissues. *Endocrinology*. (1986); 118: 1327 - 1333.

Traish A.M., Müller R.E. y Wotiz H.H. Differences in the physicochemical characteristics of androgen-receptor complexes formed "in vivo" and "in vitro". *Endocrinology* (1984), 114: 1761 - 1769.

Tarpman J. y Brinkmann A.O. Properties and expression of the androgen receptor in prostate cancer. En *Mechanism of progression to hormone-independent growth and prostatic cancer*. Berns, Romijn y Schröder editores. The Parthenon Publishing Group. New Jersey, USA (1990): 153 - 168.

Tunn S., Claus S., Schulze H., Braun B-E. y Krieg M.  $5\alpha$ -androstane- $3\beta,17\beta$ -diol hydroxylating enzymes in stroma and epithelium of human benign prostatic hyperplasia (BPH). *J Steroid Biochem*. (1987), 28: 257 - 265.

Turcote G., Chadpeltaine A., Roberts K.D. y Chevalier S. Androgen binding as evidenced by a whole cell assay system using cultured canine prostatic epithelial cells. *J. Steroid Biochem.* (1988), 29: 69 - 76.

Van Aubel O.G.J.M., Bolt-de Vries J., Blankenstein M.A., Ten Kate F.J.W. y Schröder F.H. Nuclear androgen receptor content in biopsy specimens from histologically normal, hyperplastic, and cancerous human prostatic tissue. *Prostate* (1985), 6: 185 - 194.

Verhoeven G., Heyns N. y De Moor P. Ammonium sulfate precipitation as a tool for the study of androgen receptor proteins in rat prostate and mouse kidney. *Steroids* (1975), 26: 149 - 167.

Vermeulen A., Stoïca T. y Verdonck L. The apparent free Testosterone concentration, an index of androgenicity. *J. Clin. Endocrinol.* (1971), 33: 759 - 767.

Wagner R.K. y Schulze K.H. Clinical relevance of androgen receptor content in human prostate

carcinoma. Acta Endocrinol. (1978), 87: 139 - 140.

Wagner R.K. y Jungblut. Quality control in steroid hormone receptor analyses. Cancer (1980), 46: 2950 - 2952.

Walsh P.C., Hutchins G.M. y Ewing L.L. Tissue content of dihydrotestosterone in human prostatic hyperplasia is not supranormal. J. Clin. Invest. (1983), 72: 1772 - 1777.

Welshons W.V, Lieberman M.E. y Gorski J. Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. Nature (1984), 307: 747 - 749.

Whitmore W.F. Natural history and staging of prostate cancer. Urol. Clin. N. Am. (1984), 11: 205 - 220.

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

Williams D. y Gorski J. Kinetic and equilibrium analysis of estradiol in uterus: a model binding site distribution in uterine cells. Proc. Nat. Acad. Sci. (1972), 69: 3464 - 3468.

Wilson J.D. Recent studies on the mechanism of action of testosterone. N. Engl. J. Med. (1972), 287: 1284 - 1291.

Wilson J.D. The pathogenesis of Benign Prostatic Hyperplasia. Am. J. Med. (1980), 68: 745 - 756.

Woosley J.T. y Muldoon T.G. Use of direct linear plot to estimate binding constants for protein-ligand interactions. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1976 a), 71: 155 - 160.

Woosley J.T. y Muldoon T.G. Comparison of the accuracy of Scatchard, Lineweaver-Burk and direct linear plots for the analysis of steroid-protein interactions. J. Steroid Biochem. (1977), 8: 625 - 629.

Zava D.T., Landrum B., Horwitz K.B. y McGuire W.L. Androgen receptor assay with

[<sup>3</sup>H]methyltrienolone (R1881) in the presence of progesterone receptors. *Endocrinology* (1979), 104: 1007 - 1012.