

FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO
DE LA
FISIOPATOLOGIA ANDROGENICA.
APLICACION A LA
ALOPECIA SEBORREICA MASCULINA

Tesis presentada por la
Lcda. Antonia María
Puerto Rodríguez para
optar al grado de Doc-
tor en Farmacia.
Granada, 1987

Asignaturas o cursos monográficos del Doctorado	Matriculado en		Calificaciones en los exámenes		Observaciones
	Centro	Curso	Ordinarios	Extraordinarios	

Granada, 6 de Julio de 19 87

Conforme
EL SECRETARIO.

EL JEFE DEL NEGOCIADO.

Margarita Lopez Fuen

[Signature]

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR

Reunido el Tribunal examinador, constituido por los Jueces que suscriben la presente acta, el aspirante leyó su Tesis doctoral, que había escrito libremente y que versaba acerca del siguiente tema: "CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA FISIOPATOLOGIA ANDROGENICA- APLICACION A LA ALOPECIA SEBORREICA MASCULINA".

Terminada la lectura y contestadas por el alumno las objeciones formuladas por los señores Jueces del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de *[Handwritten]*

Granada, 4 de Julio de 19 87

EL PRESIDENTE

EL SECRETARIO DEL TRIBUNAL.

[Signature]

[Signature]

El Vocal.

El Vocal.

El Vocal.

[Signature]

[Signature]

[Signature]

Firma del Graduando.

[Signature]

MINISTERIO DE EDIJCACION Y CIENCIA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Curso de 19⁸⁶ a 19⁸⁷

Folio

Núm.

Expediente académico para la expedición del TITULO DE DOCTOR a favor de D. ANTONIA
M. PUERTO RODRIGUEZ

hijo de D. JUAN ANTONIO

de D.ª TERESA

, que nació el día 20 de abril de 1954

en Valverde de Mérida

provincia de Badajoz

BACHILLER por el Instituto de Santa Eulalia

con la calificación de Aprobado, expedido el Título por la Universidad de Sevilla

en 29 de junio de 1970

Hizo los estudios de la Licenciatura en la Universidad de Granada, efectuó el

examen de Licenciatura, con la calificación de Aprobado el 20

de octubre de 1982.

Expedido el TITULO DE LICENCIADO con fecha 10 de agosto de 1978

Tiene además aprobados en la Universidad de los estudios del

Doctorado de la Facultad de Farmacia que se expresan:

Asignaturas o cursos monográficos del Doctorado	Matriculado en		Calificaciones en los exámenes		Observaciones
	Centro	Curso	Ordinarios	Extraordinarios	
"ALIMENTACION HUMANA"	Farmacia	82-83	Sobresaliente		
"INTOXICOLOGIA DE LOS ALIMENTOS NATURALES"	"	82-83	Sobresaliente		
"HIGIENE HOSPITALARIA"	"	82-83	Notable		
"MICROBIOLOGIA CLINICA"	Medicina(Ext)	83-84	Sobresaliente		
"BASES FARMACOLOGICO-CLINICAS DE LA TERAPEUTICA"	"	85-86	Sobresaliente		

(Sigue a la vuelta)

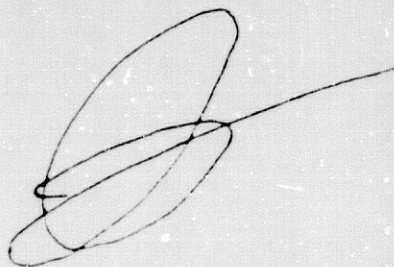
A mis padres.

A José Antonio, mi compañero.

D. JORGE MALLOL MIRON, Catedrático de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de Reus-Tarragona, de la Universidad de Barcelona

CERTIFICA : Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Comisión de Doctorado de la Universidad de Granada, Dña Antonia Mª Puerto Rodriguez sobre el tema :
CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA FISIOPATOLOGIA ANDROGENICA. APLICACION A LA ALOPECIA SEBORREICA MASCULINA, ha sido realizado bajo mi dirección en la Facultad de Medicina de Badajoz y posteriormente en la Facultad de Medicina de Reus, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas, que lo harán acreedor al título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Reus, 20 de abril de 1987



Fdo.: Dr. J. Mallol Miron

AGRADECIMIENTOS:

- Al Dr. Jorge Mallol Mirón, Director de esta Tesis Doctoral, quien me prestó no sólo su competencia científica, sino también su calidad humana.

- Al Dr. Máximo Bartolomé Rodríguez, por haberme acogido en su Departamento y prestado su ayuda cuando fue Decano de la Facultad de Medicina de Badajoz.

- Al Dr. José Jiménez Martín, Director del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada, que además de haber sido mi Profesor, se ha brindado amablemente como Ponente de esta memoria.

- Al Dr. Julio Benitez Rodríguez, por su incondicional apoyo como actual Director del Departamento de Farmacología y Psiquiatría de la Universidad de Extremadura.

- A la Dra. M. J. Caballero Loscos, por su ayuda en el aprendizaje de la técnica radiocromatográfica.

- Al Dr. A. Amura y a la Sra. Begoña Prat, por su colaboración al facilitarnos las biopsias de cuero cabelludo.

- Al Dr. E. Carreras Ginjaume, por sus diversas aportaciones en el desarrollo de esta tesis.

- A los Servicios de Urología de la Residencia Sanitaria Juan XXIII de Tarragona y del Hospital de San Juan de Reus, por facilitarnos las muestras de próstata.

- A los Profs. Amalia Lafuente y Federico Mallol, y a Magda Constantí, que me brindaron su ayuda y amistad durante mi estancia en la Facultad de Medicina de Reus.

- A todos mis compañeros del Departamento de Farmacología y Psiquiatría de la Universidad de Extremadura.

- A la Dra. Carmen Pérez Rodríguez, una gran amiga que encontré en el mundo universitario, por su gran ayuda en la realización de este trabajo.

- A José Antonio Díaz de la Concepción, que me animó y ayudó incansablemente para realizar este trabajo.

INDICE

OBJETIVOS	1
I. INTRODUCCION	2
1. ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LOS ANDRÓGENOS	2
2. ALTERACIONES PATOLÓGICAS DE LOS ANDRÓGENOS	35
3. UNIDAD PILOSEBACEA	44
II. MATERIAL Y MÉTODOS	60
1. TEJIDOS UTILIZADOS	60
2. REACTIVOS Y SOLUCIONES	62
3. INSTRUMENTACION Y MATERIAL	64
4. CONTROLES CROMATOGRAFICOS	64
5. EVALUACION DEL METABOLISMO DE LA TESTOSTERONA EN LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS	65
6. EVALUACION DEL METABOLISMO DE LA DHT EN CUERO CABELLUDO	71
7. INHIBIDORES DEL METABOLISMO DE LA DHT EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO	72
8. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA GUANILCICLASA EN CUERO CABELLUDO	74
9. EXPRESION Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS	77
III. RESULTADOS	78
1. DATOS CROMATOGRAFICOS GENERALES	78

2. METABOLISMO DE LA TESTOSTERONA EN HOMOGENIZADO DE PROSTATA	84
3. METABOLISMO DE LA TESTOSTERONA EN HOMOGENIZADO DE CUERO CABELLUDO ALOPECICO	92
4. COMPARACION DEL METABOLISMO DE LA TESTOSTERONA ENTRE LAS ZONAS ALOPECICA Y NO ALOPECICA	100
5. METABOLISMO DE LA DHT EN HOMOGENIZADO DE CUERO CABELLUDO ALOPECICO	104
6. COMPARACION DEL METABOLISMO DE LA DHT ENTRE LAS ZONAS ALOPECICA Y NO ALOPECICA	113
7. INHIBICION DE LA $3\alpha(\beta)$ -HSOR EN LA ZONA ALOPECICA	119
8. GUANILCICLASA EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO	125
9. COMPARACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GUANILCICLASA ENTRE LAS ZONAS ALOPECICA Y NO ALOPECICA	133
10. ESTIMULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GUANILCICLASA POR EL 3β -ADIOL	135
IV. DISCUSION	137
1. DEL MODELO EXPERIMENTAL	137
2. DE LOS METODOS	142

3. DE LOS RESULTADOS	151
V. CONCLUSIONES	163
VI. BIBLIOGRAFIA	167
VII. ABREVIATURAS	183

OBJETIVOS

Con este trabajo queremos contribuir al esclarecimiento de la fisiopatología hormonal androgénica, especialmente en trastornos localizados en los órganos diana.

En el ciclo biológico de los andrógenos, cobran un especial interés la biotransformación de la testosterona en sus correspondientes metabolitos activos, así como los receptores celulares de dichos metabolitos.

Por ello, en nuestro trabajo, nos hemos centrado en los siguientes puntos:

1. Determinar el metabolismo de la testosterona en cuero cabelludo, para conocer los metabolitos que se originan en el modelo de trabajo elegido.

2. Comparar dichos procesos de biotransformación en glándulas hipertrofiadas y no hipertrofiadas.

3. Profundizar en los mecanismos de acción de los andrógenos, estudiando su relación con el sistema de la guanilciclase, y comparando dicha actividad enzimática en las zonas alopecica y no alopecica de cuero cabelludo.

Dado el interés que representa trabajar con modelos humanos, hemos utilizado la unidad pilosebácea procedente de biopsias de cuero cabelludo humano, fundamentalmente afecto de alopecia seborreica masculina.

I. INTRODUCCION

Para llegar a cubrir los objetivos propuestos, creemos necesario hacer un repaso a los siguientes aspectos relativos a los andrógenos:

1. ASPECTOS FISIOLÓGICOS
2. ALTERACIONES DE LOS MISMOS.
3. UNIDAD PILOSEBACEA

1. ASPECTOS FISIOLÓGICOS:

1.1. BIOQUÍMICA:

Antes de centrarnos en la bioquímica de los andrógenos, recordemos brevemente el ciclo biológico de las hormonas.

La secuencia de acontecimientos en la acción de las hormonas es, básicamente, como sigue:

1) En toda glándula endocrina hay un proceso de síntesis y almacenamiento hormonal y, tras un estímulo específico, se produce la liberación o secreción hormonal.

2) Después de la secreción, las hormonas se distribuyen por la circulación sistémica ligadas a proteínas plasmáticas específicas.

3) Durante su distribución, pueden ser sometidas a la acción de determinados sistemas enzimáticos de biotransformación, o bien son eliminadas.

4) Las hormonas penetran en la célula diana por difusión pasiva, para ejercer su acción.

5) Algunas hormonas necesitan metabolizarse en la célula diana para ejercer su acción. En este caso, el metabolito activo será la verdadera hormona en dicha célula.

6) En el caso de las hormonas esteroideas la hormona o su metabolito se fija selectivamente, y con una alta afinidad, a las proteínas receptoras específicas del citoplasma, formando complejos hormona-receptor que son los iniciadores de la acción hormonal.

Las hormonas esteroideas, en general, no requieren metabolizarse en la célula diana para lograr una respuesta biológica. Sin embargo, existen dos excepciones en las que el metabolismo es un paso obligatorio para la acción de las mismas: testosterona y calciferol.

La testosterona, hormona circulante, en la mayoría de las células se transforma en su metabolito activo, la 5 α -dihidrotestosterona (DHT), por la acción de un enzima específico: la 5 α -reductasa (5 α -R) (1). La DHT se fija al

receptor específico citoplasmático de la célula diana, y el complejo hormona-receptor penetra en el núcleo celular y ejerce sus efectos biológicos.

1.1.1. SINTESIS:

Hace más de 60 años que P. Bonin y P. Ancel postularon que las células de las gónadas masculinas producían una sustancia hormonal. En 1.935 esta sustancia, llamada testosterona, era aislada e identificada por K. David y col.

Químicamente es un esteroide con 19 átomos de carbono hidroxilado en 17- β : el 17 β -hidroxi 4-androsten 3-ona. Es el principal andrógeno producido por las células testiculares de Leydig. En estas células se sintetiza el colesterol a partir del acetato proveniente de la glucosa y ácidos grasos.

En contraste con la glándula adrenal, los testículos tienen una escasa habilidad para captar colesterol de la circulación sanguínea (2), y la mayor parte del mismo es formado probablemente "in situ". En las mitocondrias de las células de Leydig, al igual que en las del ovario y en las de la corteza adrenal, se produce pregnenolona a

partir del colesterol. Este último esteroide de 21 átomos de carbono es el precursor de la síntesis de los esteroides en todos estos órganos.

En el hombre la vía principal de biosíntesis de la testosterona se inicia a partir de la pregnenolona, incluyendo la 17-hidroxipregnenolona, dehidroepiandrosterona y androstendiol. En otras especies se forma a partir de la progesterona, pasando por la 17-hidroxiprogestero y androstendiona (3). Aunque la testosterona es el producto principal segregado por los testículos, también se segregan otros productos intermediarios, pero contribuyen muy poco al caudal total de andrógenos circulantes en el varón (4). Esto contrasta con lo que ocurre en la mujer, en la que la androstendiona y la DHT constituyen una fracción importante de los andrógenos circulantes totales (5).

La androstendiona, que es el primer esteroide con actividad androgénica de esta vía metabólica, es junto con la testosterona precursor de los estrógenos en múltiples tejidos, al convertirse en estrona y estradiol respectivamente. Todos estos pasos están recogidos en la Fig. 1.

La cantidad de estradiol segregada directamente por los testículos, sólo contribuye en pequeña proporción a la cantidad total de estrógenos circulantes. Sin embargo, en

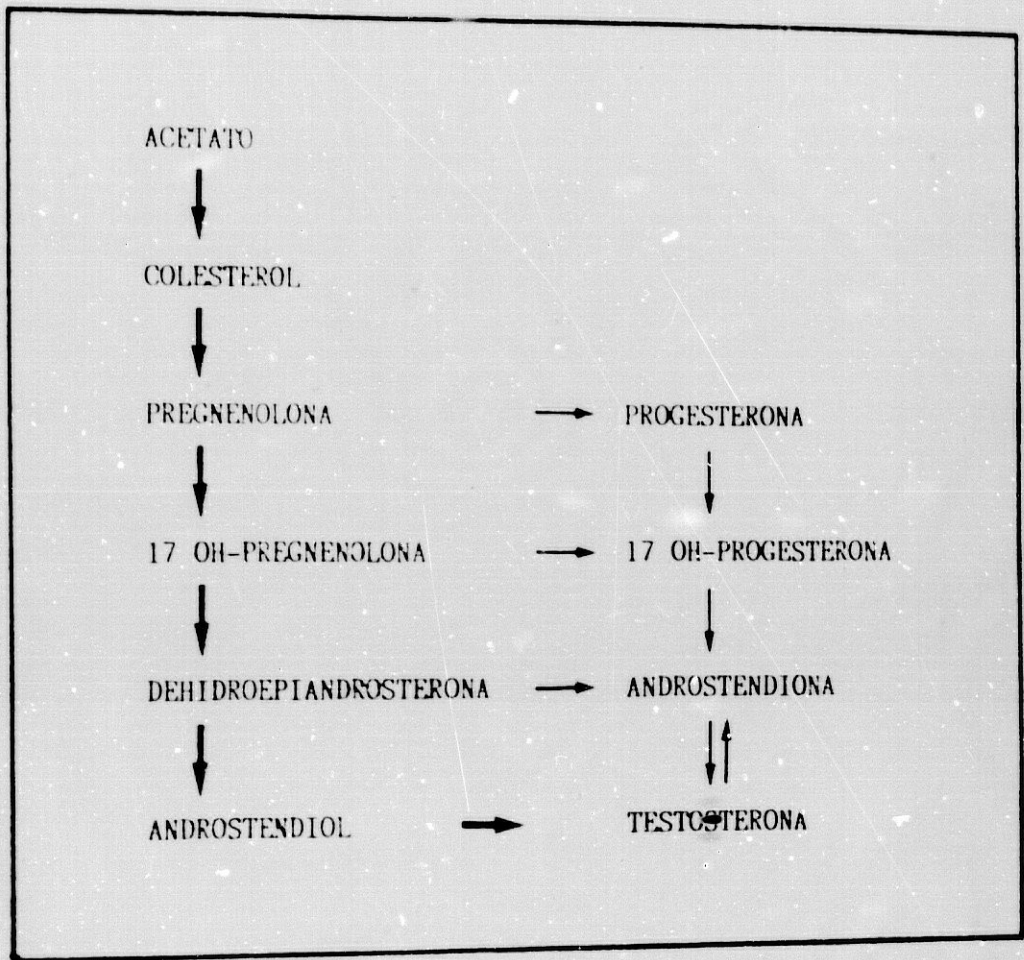


FIG. 1. SINTESIS DE LA TESTOSTERONA EN LAS CELULAS DE LEYDIG.

ciertas condiciones patológicas, la secreción de estrógenos por los testículos es mucho más importante.

Existe una serie de sustancias fisiológicas que estimulan la producción y secreción de los esteroides testiculares. Así, la ICSH y HCG promueven un incremento en la producción y secreción de la testosterona (6).

Las velocidades de secreción de todos los productos intermediarios entre pregnenolona y testosterona se incrementan después de la administración de HCG (7).

La FSH también incrementa la producción (8) y secreción (9) de los esteroides testiculares.

El modo de acción de las gonadotropinas, en la esteroidogénesis testicular, ha dado lugar a numerosas especulaciones y a múltiples trabajos experimentales. El punto central en estas investigaciones está en el papel jugado por el AMPc. Este nucleótido promueve un incremento en la producción (8) y secreción (10) de los esteroides testiculares, y su acción en la esteroidogénesis, en este órgano, es tan eficaz como la promovida por HCG o ICSH (10). Además, este efecto del AMPc es muy específico, no pudiendo ser suplido por otros nucleótidos con estructuras semejantes (8). El tejido testicular contiene una adenilciclase que puede ser estimulada, entre otras

sustancias, por las gonadotropinas, epinefrina e isoproterenol (11), y formar AMPc a partir de ATP.

1.1.2. TRANSPORTE:

Una vez que la testosterona es segregada a la sangre es transportada por proteínas plasmáticas hasta sus lugares de acción.

La testosterona se une a dos tipos de proteínas plasmáticas: 1) Albúmina, con una afinidad baja y poco específica; y 2) SHBG (Sex Hormone Binding Globulin), llamada también TeBG (Testosterone Estradiol Binding Globulin), que tiene una gran afinidad y es muy específica.

La SHBG es una β -globulina, cuyas propiedades físico-químicas han sido puestas de manifiesto tras su aislamiento del plasma de forma activa (12,13). Es una proteína con un peso molecular comprendido entre 80,000 y 94,000, en cuya composición hay de un 30 % a un 40 % de carbohidratos, y con un único lugar de unión por molécula. Bajo condiciones desnaturalizantes, la SHBG se separa en dos subunidades (14) con una considerable

microheterogeneidad. Esto es debido a su variable contenido en ácido siálico (15).

Diversas situaciones fisiológicas y patológicas son capaces de modificar la concentración de SHBG. En mujeres, la concentración de SHBG en el plasma está aumentada de 5 a 10 veces con respecto a los varones; esto es debido a que los estrógenos aumentan la síntesis hepática de la misma, mientras que la testosterona disminuye dicha síntesis. En el varón, los niveles de SHBG son más altos de lo normal en pacientes hipogonadales, y estos valores bajan tras el tratamiento sustitutivo con testosterona.

También en el hipertiroidismo está aumentada la SHBG, y los niveles decrecen en individuos hipotiroideos. Finalmente los niveles plasmáticos de SHBG también están aumentados en pacientes con cirrosis y otros desórdenes metabólicos (16).

En el hombre se estima que sólo el 2 % de la testosterona circula en forma libre, el 30 % circula unida a la albúmina y el 68 % restante lo hace unida a la SHBG (17).

La situación en la que se encuentre la testosterona en el plasma es crucial para determinar su actividad biológica. Antes se creía que la testosterona libre era la única fracción con actividad biológica. Sin embargo,

Vermeulen y col. (18) sugirieron que en humanos, el metabolismo de la testosterona estaba relacionado directamente con la cantidad de testosterona libre más la unida a la albúmina, y que por otra parte, era inversamente proporcional a la cantidad de testosterona plasmática unida a la SHBG. Así pues, la testosterona unida a la SHBG no es útil para metabolizarse, y como el metabolismo de la testosterona es necesario para ejercer su actividad biológica, en órganos reproductivos y en la piel, significa que tanto la fracción libre, como la fracción unida a la albúmina, son las que penetran en el interior de los tejidos y ejercen su actividad. Por todo ello, parece que la testosterona unida a la SHBG se comporta únicamente como un depósito endógeno de testosterona, sin participar directamente en el mecanismo de acción de los andrógenos.

Otras hipótesis que se barajan acerca de las funciones que podrían desempeñar las proteínas plasmáticas son las siguientes: Por una parte, se ha apuntado la posibilidad de que la unión del esteroide con la proteína plasmática facilita la solubilización de ésta en el suero sanguíneo, evitando su precipitación. Esta hipótesis, no obstante, no parece probable, ya que las concentraciones de hormonas en el suero están alejadas de su punto de saturación acuoso, de todos modos no se puede descartar

totalmente que en determinados compartimentos específicos, el esteroide alcance una concentración crítica, y en este caso, el papel de la proteína fijadora sea imprescindible para mantenerla solubilizada (19). En segundo lugar, las proteínas fijadoras de esteroides podrían actuar como protectoras de los mismos, impidiendo su destrucción enzimática, especialmente a nivel hepático, y su excesiva eliminación renal (20).

Estas proteínas transportadoras no sólo se han descrito en el plasma, sino que también se encuentran en el citoplasma celular, aunque se diferencian de los receptores hormonales en que no son transferidas al núcleo y en que no desencadenan ningún efecto.

Otras proteínas fijadoras de andrógenos son: PBP (Prostate Binding Protein) y ABP (Androgen Binding Protein). No existen datos que indiquen la existencia de estas proteínas en piel y anexos.

1.1.3. METABOLISMO:

Dependiendo de la célula, la testosterona se puede metabolizar a: 1) un andrógeno más activo que ejerce su acción sobre esa célula o en algún otro tejido; 2) a un

metabolito menos activo o inactivo, que es conjugado y excretado por la orina y 3) a un esteroide, tal como el estradiol, que tiene una actividad biológica diferente a la de su precursor.

En tejidos extrahepáticos tales como la piel, la testosterona es reducida por la 5α -R para formar DHT, la cual a su vez es reducida por la $3\alpha(\beta)$ -hidroxiesteroide oxidoreductasa ($3\alpha(\beta)$ -HSOR), dando lugar a los $3\alpha(\beta)$ -androstano-dioles: 3α -Adiol y 3β -Adiol.

En el hígado los principales productos del metabolismo de la testosterona son la androsterona y etiocolanolona, que están reducidos en sus posiciones 5α y 5β respectivamente. Estos metabolitos son excretados por la orina en forma de glucurónidos y sulfatos. En contraposición a los estrógenos, los metabolitos de la testosterona se encuentran en la bilis y en las heces en cantidades muy pequeñas.

De la producción total de los 17-cetoesteroides urinarios los testículos contribuyen aproximadamente en un 30%. El 70% restante procede de la corteza suprarrenal, sin embargo, el efecto androgénico de la secreción esteroide suprarrenal total es notablemente menor que el de los testículos. Por lo tanto, la corteza suprarrenal, no es capaz

de sustituir la función de las células de Leydig si estas se hallan afectadas.

El cociente entre androsterona y etiolanolona urinarias ha sido usado como un índice de la actividad 5 α -R hepática. Varios estudios han demostrado que pacientes con una porfiria aguda intermitente tenían una marcada deficiencia en la actividad 5 α -R hepática, pero no en la actividad cutánea (21,22). Esta actividad hepática también está disminuida en el hipotiroidismo, anorexia nerviosa, edad avanzada y en tratamientos con fenobarbital. Un aumento de la actividad hepática de este enzima ocurre en cirrosis, y como consecuencia del tratamiento con flutamida y hormonas tiroideas.

Los glucurónidos de testosterona y 3 α (β)-Adioles son otros de los metabolitos de andrógenos que se pueden medir en orina. El glucurónido de testosterona se origina en el hígado a partir de la testosterona, androstendiona y dehidroepiandrosterona plasmáticas (23). En contraste, los glucurónidos de los 3 α (β)-Adioles se producen como consecuencia del metabolismo de la testosterona tanto de la piel como del hígado. Estos pasos están resumidos en la Fig. 2.

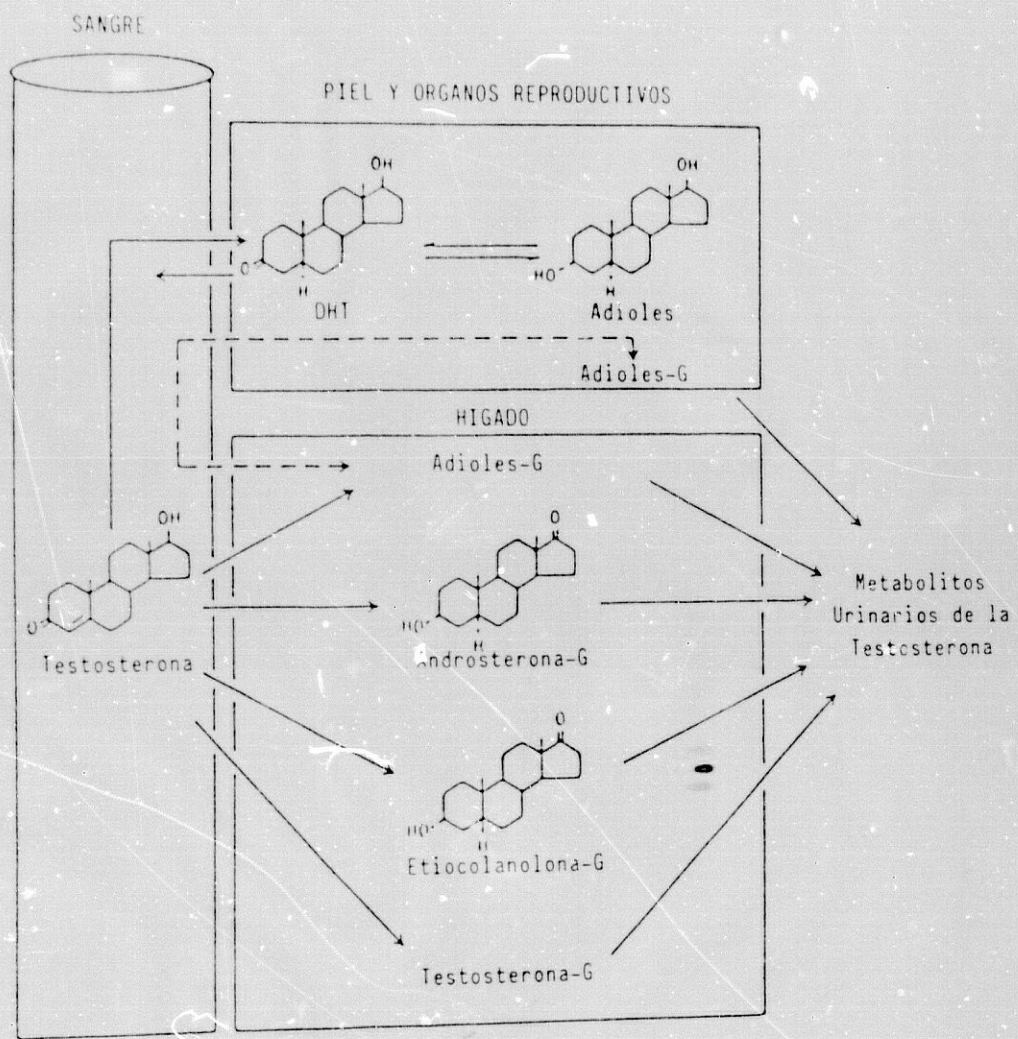


FIG. 2. METABOLISMO DE LA TESTOSTERONA.

1.2. ACCIONES FISIOLÓGICAS:

Las acciones biológicas de la testosterona y de sus metabolitos se han clasificado de acuerdo a sus lugares de acción. Todos los efectos que tienen relación con el crecimiento de la zona reproductora masculina, o con el desarrollo de las características sexuales secundarias, han sido llamados efectos de "Acción Androgénica". Por otra parte, los efectos sobre los tejidos somáticos, tales como hígado, riñones, huesos y músculos, se han denominado efectos de "Acción Anabolizante". Estudios anteriores sugerían que ambos efectos podrían ser independientes y debidos al mismo esteroide (24). Experimentos posteriores, sin embargo, han sugerido que este tipo de respuesta es específico de cada órgano, y que los mecanismos moleculares que inician la acción androgénica, son los mismos o similares a aquellos que estimulan las respuestas anabólicas.

Actualmente, se acostumbra a clasificar la acción de los esteroides según sus mecanismos moleculares de acción (25).

La testosterona y otros andrógenos tienen actividad biológica en casi todos los órganos del cuerpo. La función de los andrógenos en el varón, es sobradamente conocida

por los notables cambios que tienen lugar en la pubertad, transformando al niño en adulto. En los varones, durante el período prepuberal, la mínima secreción de andrógenos tanto por parte de los testículos como de la corteza adrenal, inhibe la secreción de gonadotropinas. Instaurada la pubertad, la secreción de gonadotropinas aumenta y los testículos comienzan a agrandarse (26). Poco después, el pene y el escroto empiezan a crecer y aparece el vello pubiano. Al inicio de la pubertad, las erecciones penianas y la masturbación son frecuentes en la mayoría de los individuos. Simultáneamente, con el rápido aumento de la estatura y del desarrollo de la musculatura esquelética, que contribuyen a un rápido aumento del peso corporal, se revela la propiedad de los andrógenos de promocionar el crecimiento.

Como consecuencia de las acciones de los andrógenos, la piel se engrosa y tiende a ser más grasa por la proliferación de glándulas sebáceas, que si se infectan, y son propensas a ello, dan lugar al acné en ciertos individuos. El crecimiento del vello corporal se intensifica notablemente y se distribuye de forma típica. El crecimiento de la laringe causa, al principio, dificultades para ajustar el tono de la voz, y luego ésta se hace permanentemente más grave. El crecimiento de la barba llega mucho después

que los otros eventos de la pubertad, y es el último carácter sexual que se desarrolla.

También se cree que los andrógenos son los responsables tanto del comportamiento agresivo masculino como del comportamiento sexual del varón (27,28,29), pero en este aspecto hay discusiones, y algunos creen que el comportamiento agresivo es principalmente adquirido y no biológicamente determinado. Aunque es difícil resolver esta cuestión, las formas diferenciales de conducta de muchos animales machos y hembras sugieren que las hormonas sexuales desempeñan un papel importante. Además, el comportamiento sexual de ratas hembras se transforma en el característico de los machos, tras tratamiento con testosterona, ya sea en animales recién nacidos o en animales adultos (30).

1.3. MECANISMO DE ACCION:

1.3.1. INTRODUCCION:

Los años comprendidos entre 1.925 y 1.940 fueron el principio de una nueva era de la Endocrinología, pasando de una disciplina descriptiva a una disciplina cuantitativa. Durante ese tiempo, las principales hormonas esteroideas fueron totalmente caracterizadas, y se establecieron ampliamente sus funciones bioquímicas. Entre ellas merecen destacarse una serie de hechos comunes en su mecanismo de acción: 1) provocan cambios dramáticos en el metabolismo intracelular, a concentraciones extremadamente bajas, 2) son reguladores muy importantes, desde el desarrollo embrionario hasta el adulto, y 3) sus efectos son muy específicos, tanto para órganos como para tejidos. Todas estas razones hacen que, contempladas desde una óptica clínica, la elucidación del mecanismo de acción de las hormonas esteroideas, sea de gran importancia por su transcendencia en los procesos de desarrollo, diferenciación y homeostasis.

1.3.2. METABOLITO ACTIVO:

En los años anteriores a 1.968, se pensaba que la testosterona era el principal andrógeno circulante, y ésta actuaba directamente en los órganos diana, donde ejercía su acción. En consecuencia, se creía que su metabolismo servía sólo como un método para su inactivación, previo a la excreción. Sin embargo, durante ese año, estudios en próstata de rata demostraron que, en el citoplasma celular, la testosterona era reducida por la 5α -R, en presencia de NADPH, convirtiéndose en DHT (1). En trabajos posteriores se demostró que la DHT se unía a un receptor citoplasmático específico de la célula diana, y el complejo DHT-receptor penetraba en el núcleo (31). La conversión de testosterona a DHT ha sido puesta de manifiesto en numerosos tejidos. Sin embargo, la testosterona no siempre se comporta como una prehormona de la DHT, ya que no todos los tejidos diana de los andrógenos contienen el enzima 5α -R. Por ejemplo la testosterona ejerce un efecto directo en músculo y hueso.

Como el efecto de la testosterona en algunos órganos diana, como la próstata, implica su conversión a DHT, surge la cuestión de si tal conversión es necesaria para la respuesta del folículo piloso. Por un lado está claro que

la piel (32-34), y el pelo (35,36) tienen la capacidad de producir DHT. En la piel la tasa de conversión de testosterona en DHT, varia dependiendo de la zona de donde proceda la piel. Estudios como los realizados por Wilson y col. (32) en piel de la zona genital, indican que las zonas de mayor producción son la del escroto, prepucio y clitoris.

Birgham y col. (37) estudiaron la conversión de la testosterona en DHT en distintas zonas del cuero cabelludo, y observaron que ésta era mayor en la zona calva, sugiriendo que ello podía ser debido al distinto número de glándulas sebáceas presentes en cada tipo de piel. Asimismo, encontraron que el principal metabolito formado era la DHT. Esto último contrasta con otros estudios realizados en el cuero cabelludo y en la piel de la espalda (38), donde se ponía en evidencia que, además de no encontrar diferencias entre la actividad enzimática de dichas zonas, aunque la espalda es propensa a desarrollar acné, el principal metabolito formado era el 3β -Adiol, el cual podría ser el responsable de la actividad biológica. Existen, además, otros estudios que indican que el 3β -Adiol puede tener actividad biológica. Así, el 3β -Adiol mantiene la profundidad del epitelio y estimula la actividad secretora en próstata de rata (39). También Schmit y col.

(40) observaron una proliferación celular en la próstata de rata, tras la administración del 3β -Adiol; y Ebling y col. (41) vieron que el 3β -Adiol incrementaba la producción sebácea, la mitosis en la glándula sebácea y el tamaño de la glándula prepucial en ratas hipofisectomizadas.

Posteriormente se ha llegado a determinar la actividad enzimática de la 5α -R en distintos constituyentes de la piel. Takayasu y col. (34), afirmaron que esta actividad estaba localizada principalmente en la glándula sudorípara y en la glándula sebácea. Dichos autores concluyeron que en glándulas sebáceas aisladas se formaba 3β -Adiol, resultados que concuerdan con los indicados por Stewart y col. (38). Hay y col. (42), encontraron resultados similares, llegando a afirmar que, en la piel de la frente, del 40% al 60% de la actividad de la 5α -R estaba en la glándula sebácea, y que en las axilas del 50% al 70% de la actividad correspondía a la glándula sudorípara, especialmente a la glándula apocrina.

En un estudio preliminar, llevado a cabo en folículos aislados de la zona púbica (43), se afirmó que esta zona era de las más activas del cuerpo en convertir testosterona en DHT, sin embargo, sólo se utilizó una muestra (con 75 pelos) y no se mencionó el porcentaje de pelos anágenos y telógenos.

Adachi y Kano (44), subrayaron que podían diferenciar los pelos anágenos de los telógenos, porque la actividad metabólica 5α -R de los folículos en crecimiento es mayor que la de los pelos telógenos.

En otro trabajo Takayasu y Adachi (45), estudiaron la tasa de conversión de la testosterona en pelos anágenos y telógenos de distintas zonas del cuerpo. En cuero cabelludo, vieron que la tasa de conversión en pelos anágenos fue de 3 a 8 veces mayor que la observada en pelos telógenos.

En otros trabajos realizados en folículos aislados, se encontró que la androstendiona era el principal metabolito obtenido de la testosterona (46-48). Es obvio pues, afirmar que en el folículo hay actividad de la 5α -R y de la 17β -HSOR.

Los datos presentados indican claramente que tanto los folículos aislados, como las glándulas sebáceas son sitios activos metabólicamente para interconversiones esteroideas.

Con todo lo visto en este apartado, vemos que existen una serie de dudas acerca del grado de formación de cada metabolito, y de cual es en realidad el metabolito activo

en cada caso. Parece ser que todo ello está en función de dos condiciones:

1.- Zona estudiada.

2.- Condiciones experimentales.

La complejidad del metabolismo activo esteroideo queda de manifiesto en el esquema adjunto. Fig. 3.

1.3.3. RECEPTOR ANDROGENICO:

Las diferentes propiedades de los receptores pueden ser estudiadas "in vivo" e "in vitro", incluso algunos receptores específicos han podido ser aislados y reconocidos. El procedimiento más utilizado se basa en el marcaje del receptor con un ligando radiactivo.

Los receptores específicos, con los que una sustancia ha de reaccionar para ejercer sus acciones, están localizados en el interior o en la superficie de las células diana. Así se clasifican, según su localización celular, en:

- Receptores de membrana: aquellos que forman parte integral de la misma.
- Receptores solubles: localizados en el citoplasma, se les denomina también receptores intracelulares.

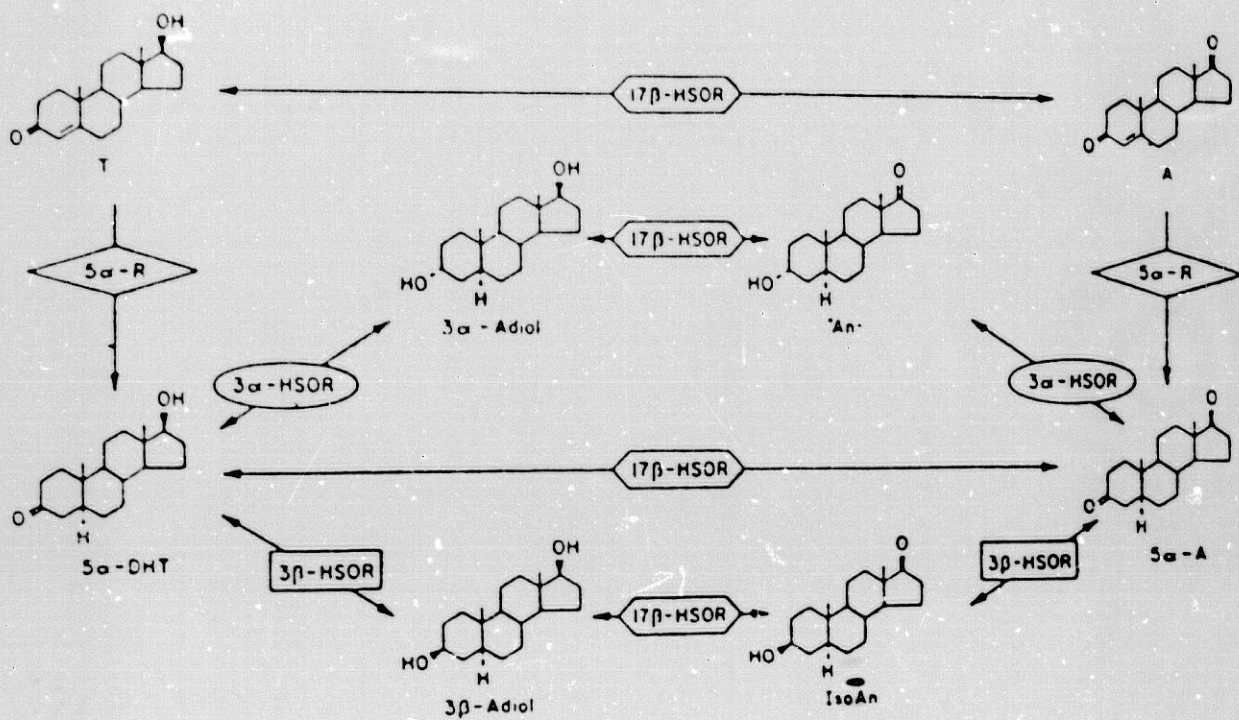


FIG. 3. METABOLITOS ACTIVOS DE LA TESTOSTERONA.

Los receptores de las hormonas tiroideas y esteroideas son solubles, mientras que los de las hormonas peptídicas lo son de membrana.

Los receptores de membrana pueden actuar según la teoría del segundo mensajero de Sutherland (49,50), según la cual, la hormona sería el primer mensajero, que iría desde el lugar de liberación hasta la célula diana, en cuya membrana reaccionaría con el sistema de la adenilciclase. La interacción conduce, en el interior de la célula, al incremento o disminución del segundo mensajero, el AMPc, y éste sería el que realmente llevara a cabo las acciones que se atribuyen a la hormona. La adenilciclase varía, probablemente de configuración molecular, en los distintos tejidos, pudiéndose explicar así la especificidad de la respuesta hormonal.

También pueden actuar como segundos mensajeros otros nucleótidos cíclicos, como el GMPc, y el ión calcio. Actualmente se tiene un mayor conocimiento del GMPc y del enzima relacionado con su producción, la guanilciclase. En la actualidad, se contempla el sistema de estos dos nucleótidos cíclicos, como un sistema de control de numerosos procesos capaces de moverse en dos direcciones, de manera que el AMPc se opondría a las acciones del GMPc en diversos tejidos.

El receptor androgénico, como ya hemos apuntado anteriormente, es soluble y la eficacia del andrógeno dependerá fundamentalmente de su naturaleza lipofílica, que le permitirá penetrar en la célula.

El receptor androgénico citoplasmático, muestra una arquitectura molecular que le permite interaccionar de forma específica con el andrógeno. Esta estereoespecificidad, es más acusada en el caso de la DHT que en el de la testosterona (51).

Por otra parte, son necesarias múltiples interacciones ligando-receptor para conseguir una fijación específica. Esto trae como resultado un cambio conformacional del receptor, en el que el esteroide es envuelto o protegido dentro del mismo. La conformación de otros sitios de fijación del receptor, requeridos para las respuestas hormonales, está influida por los cambios alostéricos de la conformación del sitio de fijación del ligando. Este concepto se basa en las siguientes observaciones: 1) la digestión limitada del complejo receptor-esteroide con tripsina no afecta al sitio receptor, porque los esteroides no se han liberado, pero el complejo pierde su capacidad para fijarse al DNA y a la cromatina, por lo que se sugieren distintos sitios en el receptor, el sitio fijador de esteroide, y otros sitios necesarios para su función; 2) las

antihormonas pueden fijarse a los receptores y ser introducidas en el núcleo, pero no se produce ninguna respuesta biológica. Estas afirmaciones indican que las antihormonas estabilizan al receptor únicamente en su forma inactiva.

La capacidad de unión del andrógeno con el receptor es limitada, variando de un tejido a otro (52).

Todos los receptores de los andrógenos son proteínas oligoméricas, capaces de unirse a los ligandos apropiados con una alta afinidad, siendo dicha unión reversible (53).

En general, todos los tejidos que responden a los andrógenos contienen receptor androgénico citoplasmático. De igual forma, la translocación al núcleo celular de este receptor, ha sido puesta de manifiesto en diversos estudios, en los que se administraban andrógenos marcados radiactivamente a animales de experimentación.

El receptor androgénico, tanto el citoplasmático como el nuclear, tiene una marcada tendencia a agregarse, y este problema unido a su notoria inestabilidad, ha dado como resultado una confusa variedad de información sobre sus características fisico-químicas (54-57).

En condiciones de fuerza iónica baja, el receptor citoplasmático muestra un coeficiente de sedimentación de 8-10 S y un peso molecular de 280,000-360,000 (54). Al exponerlo a una solución de KCl 0.4 M, tiende a ser más

pequeño con un coeficiente de sedimentación de 4-4.5 S y un peso molecular de 100,000 (54). Estas dos formas, del receptor citoplasmático, parecen estar en equilibrio (57), pero se desconoce si las formas mayores son debidas a la autoasociación de las más pequeñas, o son el resultado de una agregación entre proteínas receptoras y no receptoras.

El receptor nuclear parece que se origina a partir del citoplasmático. Sin embargo, se ha visto que las características fisico-químicas de estas dos proteínas son diferentes (54,57). Por ejemplo, el receptor citoplasmático sedimenta a 4-4.5 S y el nuclear a 3-3.5 S, ambos en presencia de KCl 0.4 M, que es la forma universal de extracción del receptor nuclear. No obstante, estas diferencias pueden ser debidas a fenómenos de proteólisis "in vitro", ya que al extraer la forma nuclear en presencia de un inhibidor de la proteólisis, como el di-isopropil-fluorofosfato, el receptor nuclear presenta un coeficiente de sedimentación similar al del receptor citoplasmático (57).

Debido a las grandes dificultades que conlleva la purificación exhaustiva del receptor androgénico, su estructura no está completamente dilucidada.

Hay algunos estudios sobre la purificación del receptor androgénico (55,56,58), y solamente en uno de los

citados (58) se lograba una purificación exhaustiva. En este estudio el receptor androgénico citoplasmático de la vesícula seminal de novillo era purificado, y migraba como una única banda de proteínas, con un peso molecular de 60,000, cuando se le sometía a electroforesis sobre gel de poliacrilamida. No obstante, no se conoce si esta molécula es un oligómero intacto o un fragmento proteolítico del receptor androgénico.

Se han hecho tentativas para relacionar la duración de la ocupación aceptora nuclear por los complejos del receptor, con el tipo de respuesta hormonal. En todos los sistemas estudiados, la respuesta bioquímica promovida por los esteroides, aparece en una secuencia temporal y ordenada; consecuentemente, las respuestas pueden clasificarse en iniciales, rápidas y tardías. Se sugiere que sólo una retención breve, es necesaria para las respuestas iniciales; mientras que las respuestas tardías requieren una retención prolongada.

1.2.5. EFFECTOS CELULARES DE LOS ANDROGENOS:

Los pasos iniciales en la acción de los andrógenos son conocidos en muchos tejidos y son similares a los de otras hormonas esteroideas (59-62).

Como ya apuntamos en otro apartado, los pasos a seguir en la acción de los andrógenos, incluyen: a) entrada de la testosterona a la célula, b) unión de la testosterona o de su metabolito, la DHT, al receptor proteico específico citoplasmático, y transferencia del complejo al núcleo celular, c) interacción del complejo con la cromatina nuclear, que trae como consecuencia una síntesis facilitada de precursores de RNAs, y d) traslación del esteroide y los RNAs específicos a los polirribosomas, dando lugar a una producción de proteínas específicas y de otros componentes celulares necesarios para alterar la función de la célula diana. Fig. 4.

En algunos tejidos dependientes de los andrógenos, no en todos, tiene lugar un cambio en la replicación de DNA, como consecuencia de la acción hormonal (59,63). El hecho de que se estimulen ciertos mRNAs y proteínas, va a depender del tejido donde actúen los andrógenos. Por ejemplo en el ratón, los andrógenos incrementan la síntesis de β -glucuronidasa y ornitina-descarboxilasa en el riñón.

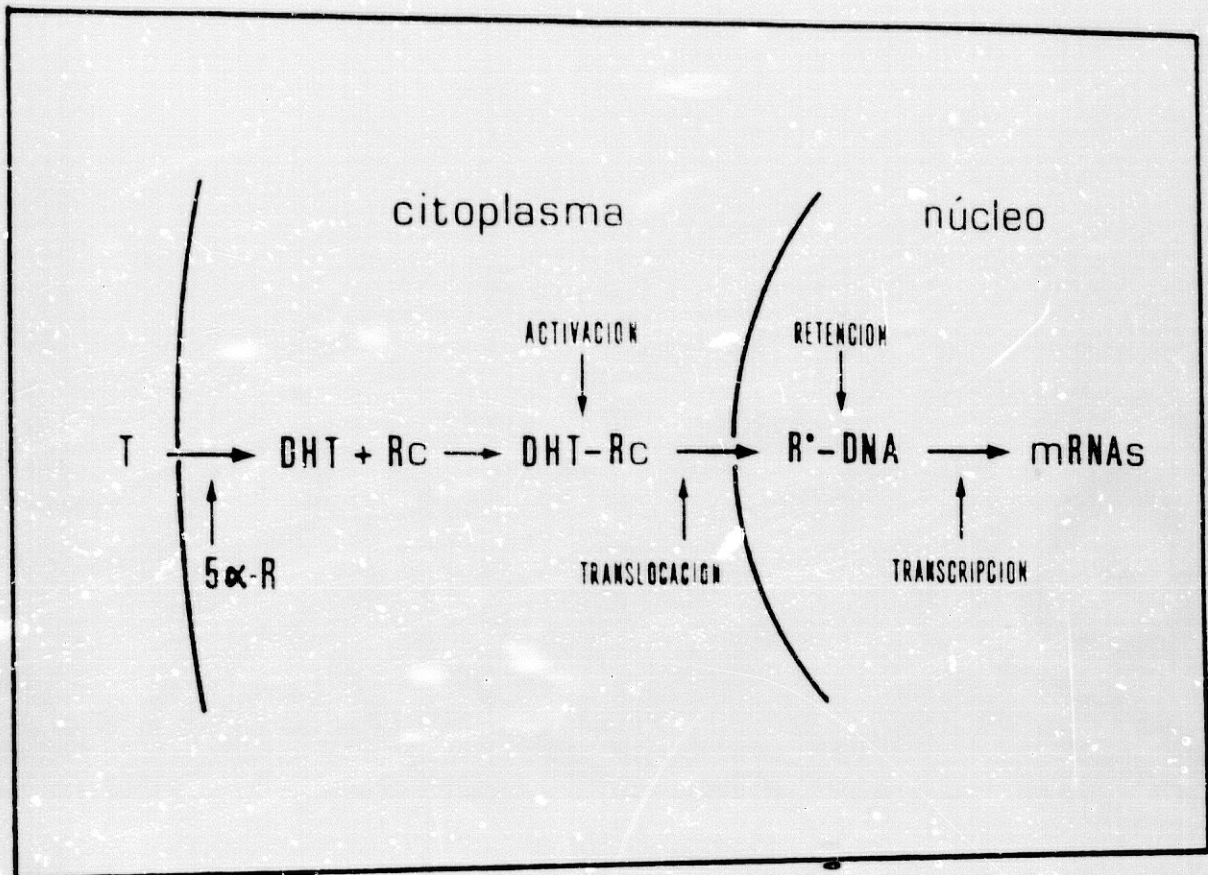


FIG. 4. MECANISMO DE ACCION DE LA TESTOSTERONA EN LA PIEL.

(64,65), y el factor de crecimiento epidérmico en la glándula submaxilar (66); pero no facilita la producción de estas mismas proteínas en otros tejidos, donde también son sintetizados. Estas y otras observaciones sugieren, que hay dos factores principales, que regulan las respuestas androgénicas en cada tejido: a) la maquinaria de reconocimiento del esteroide, que incluye la concentración y la especificidad de unión del esteroide al receptor androgénico, y b) la estructura de la cromatina, que es determinada durante la diferenciación.

Refiriéndonos ya a las acciones concretas de los andrógenos en la glándula sebácea, se ha demostrado en muchos estudios realizados tanto en animales como en el hombre, que la actividad de la glándula sebácea está estimulada por los andrógenos. Los andrógenos incrementan el tamaño de las glándulas sebáceas en rata (67,68) y ratón (69). Estudios de la acción de la testosterona en rata, muestran que estimula la división celular, y que aumenta el tamaño de las células, así como la producción de sebo (70-72).

La administración de testosterona, aumenta el tamaño de las glándulas sebáceas y la producción de sebo en niños prepuberales, pero no en varones adultos, donde las glándulas sebáceas, parecerían estar bajo estimulación máxima

por andrógenos endógenos (73,74). El aumento de tamaño de glándulas sebáceas localizadas, ha sido producido por aplicaciones tópicas de testosterona, indicando que los andrógenos actúan directamente sobre el tejido diana (75,76). En el hombre, la testosterona inyectada intradérmicamente, produce un aumento de la lipogénesis sebácea cuando la secreción sebácea está disminuida; mientras que disminuye la lipogénesis cuando esta última está aumentada.

Otros andrógenos, distintos de la testosterona, también estimulan la actividad sebácea. En ratas castradas la DHT es tan efectiva como la testosterona. La androstendiona es mucho menos potente, aunque en ratas hipofisectomizadas, tanto ésta como el 3β -Adiol, fueron más activos que la testosterona (41). Sin embargo, según otros trabajos en el hombre, la lipogénesis sebácea no se estimula cuando se inyecta DHT intradérmicamente, e incluso en algunos individuos resulta disminuida (77). Esto llevó a la conclusión, a algunos autores, que la DHT actúa muy débilmente en la glándula sebácea humana, y su formación a partir de testosterona puede producir inhibición de la secreción sebácea por competición, y así aceptaron que la DHT no juega papel alguno en la función de la glándula sebácea humana.

La importancia de esta conclusión radica en que la búsqueda de antiandrógenos, cuya acción sea la de inhibir a la 5 α -R, podría estar condenada al fracaso. No obstante, un metabolito de la DHT, el 3 β -Adiol, sí puede jugar un papel importante en la síntesis lipídica de la glándula sebácea, según afirman estudios realizados por Stewart y col. (38) en piel humana, basándose además en las observaciones hechas por Robel y col. (78) quienes demostraron la existencia de un receptor proteico específico para el 3 β -Adiol en próstata de rata.

Según otras teorías, la acción hormonal procede a través del sistema de la ciclasa, sin la necesaria presencia de una proteína receptora. Adachi y Kano (44) han demostrado que la DHT inhibe al sistema de la adenilciclasa, que puede conducir a la limitación del sistema de la quinasa proteica, y de los siguientes pasos en la glicolisis y en la formación de proteínas. Por otra parte, en los últimos años, el GMPc está tomando un papel relevante en cuanto al mecanismo de acción de numerosas hormonas, entre ellas los andrógenos. Se ha visto que tanto la testosterona como sus precursores y metabolitos, así como el GMPc, producen un aumento de la síntesis del DNA, y a su vez estos esteroides estimulan la producción de GMPc (79). Esto sugiere, que el sistema GMPc-guanilciclasa

juega un importante papel en el mecanismo de acción de los esteroides.

2. ALTERACIONES PATOLOGICAS DE LOS ANDROGENOS:

2.1. GENERALIDADES:

Las alteraciones hormonales podrían agruparse, de un modo arbitrario, en dos grandes grupos:

1.- Aquellas que son debidas a trastornos en la síntesis, secreción y/o transporte de las hormonas.

2.- Aquellas que dependen de problemas en la interacción de la hormona con su lugar de acción en particular, con la molécula específica (receptor) de la célula diana.

En el primer caso tendríamos trastornos que afectan, de un modo global, a todo el organismo.

En el segundo, aparecerían trastornos localizados. A nivel de la piel y anexos, se presentan ambos tipos de patogenia, es decir, trastornos secundarios a un proceso generalizado y trastornos localizados en la piel o en algunas de sus zonas. Describiremos a continuación, de forma esquemática, algunas de éstas alteraciones.

2.2. HIRSUTISMO IDIOPATICO:

Es un síntoma común en mujeres jóvenes y de mediana edad, y consiste en un incremento en el crecimiento del pelo de la cara y del cuerpo, acompañado a menudo por una notable secreción sebácea.

Después de muchas lucubraciones para dilucidar el factor desencadenante de este trastorno, se ha llegado a la conclusión de que la causa era un incremento de la sensibilidad de los folículos a los andrógenos. Pudiendo ser debido a dos causas: 1) A un incremento en los niveles de andrógenos circulantes y al consiguiente aumento local de la 5α -R o 2) A una estimulación de los receptores proteicos de los folículos, quienes estimulan la sensibilidad de los mismos a los andrógenos.

2.3. FRACASO EN EL CRECIMIENTO DE LA BARBA:

En 1.973, Jenkins y col.(80), estudiaron este problema en unos pacientes adultos que mostraban una ausencia total del crecimiento de la barba, que estaba cubierta por fino vello, característico del sexo femenino. En estos pacientes, los niveles plasmáticos y urinarios de

testosterona eran normales, pero el metabolismo de la testosterona estaba aumentado en la piel de la barbilla, comparada con la de la zona velluda suprapúbica, a diferencia de lo que ocurre en varones normales.

2.4. SINDROMES DE INSENSIBILIDAD A LOS ANDROGENOS:

En este caso la célula diana no responde a los andrógenos, y las características sexuales secundarias tienden a ser femeninas.

2.4.1. ANORMALIDAD EN EL RECEPTOR PROTEICO:

La total deficiencia del receptor constituye el clásico síndrome de "feminización testicular", con ausencia de todos los vellos sexuales. Formas incompletas de este desorden incluyen algunos casos del síndrome de Reifensteins y el tipo I de pseudohermafroditismo en el varón.

La base bioquímica primaria es normalmente una deficiencia en el receptor intracelular u, ocasionalmente, en una forma anormal de este receptor. Algunos casos, sin embargo, muestran una disminución de la 5 α -R. Esto puede

ser secundario a un exceso de SHBG en sangre, con lo que estaría disminuida la testosterona libre.

2.4.2. DEFICIENCIA DE LA ACTIVIDAD DE LA 5 α -R:

Esta otra forma del síndrome de insensibilidad a los andrógenos, ha sido llamado "síndrome de hipospadia pseudovaginal perineoescrotal" o "hermafroditismo tipo II del varón".

Numerosos estudios de este síndrome "in vitro" e "in vivo", han demostrado que existe un déficit de la 5 α -R (43,81,82). Estos pacientes desarrollan, en la pubertad, una distribución tipo mujer del pelo púbico, con o sin crecimiento piloso facial (83,84). Esto llevó a pensar, que en las condiciones en que exista una deficiencia de la 5 α -R, el crecimiento del pelo está directamente estimulado por la testosterona. Sin embargo, la situación es más compleja, pues existen dos formas conocidas de la 5 α -R: una que tiene un pH óptimo de 5.5, y que presenta una gran variación cuantitativa incluso en individuos normales (82), y la otra forma que es activa entre pH 7 y 9, y normalmente, en estos casos de deficiencia de la 5 α -R, es la de pH 5.5 la que está alterada, y la gran variación de la

misma que mencionamos antes sucede también en estos individuos, con lo que no se puede dilucidar claramente el problema.

2.5. TRASTORNOS LOCALES: ALOPECIA SEBORREICA MASCULINA:

Ya que nuestro modelo de trabajo es el estudio del metabolismo de los andrógenos y sus mecanismos de acción, en cuero cabelludo humano de sujetos afectados de alopecia seborreica masculina (ASM), vamos a centrarnos más extensamente en la descripción de esta alteración local, que es la ASM.

La pérdida de pelo en el cuero cabelludo y la alopecia se consideran como sinónimos, y puede producir graves trastornos psíquicos en quienes la padecen.

La ASM, generalmente se origina en la línea de separación de la frente de la zona poblada, y tanto si los signos de la alopecia son visibles como si no, esta línea divisoria tiene siempre una serie de folículos en estado de reposo. Estos folículos permanecen así durante períodos prolongados, aunque ocasionalmente, puedan observarse fases de crecimiento aisladas o en grupo incluso en la

frente. Preparaciones cutáneas muestran a menudo una cantidad considerable de dichos folículos.

Este tipo de calvicie se da tanto en varones como en mujeres y sigue un curso similar, con pérdida evidente en el vértice y regiones frontales, y recesión lenta de la línea pilosa anterior. El proceso es gradual y el momento de su iniciación sumamente variable, con una clara influencia de factores hereditarios.

En las mujeres, la pérdida del pelo llega pocas veces a la calvicie coronaria total del varón, y es más común la presentación con pérdida capilar difusa. En otros aspectos, esta alopecia es una forma menor de la calvicie de tipo masculino, aunque su iniciación es posterior. Cuando se observa calvicie de tipo masculino en mujeres jóvenes, en grado significativo debe considerarse la posibilidad de enfermedad endocrina.

Aún en aquellos individuos que no muestran cambios clínicos, el examen microscópico revela que los folículos se atrofian progresivamente, y que el diámetro del pelo decrece al envejecer la persona. El anágeno se hace más breve y hay aumento del recuento telógeno. Los folículos del cuero cabelludo se distribuyen en grupos de unos 5 cada uno, y el proceso de envejecimiento, según se ve al microscopio, consiste en la involución de uno o dos del

grupo con la producción de un diminuto tallo piloso. Hay una progresión gradual que afecta a todos los folículos de un área. Algunos son reemplazados por una banda fibrosa atrófica que llega en profundidad hasta la glándula sebácea remanente, mientras que en otros el proceso degenerativo es menos marcado y deriva en folículos pequeños que producen un vello casi invisible.

La disminución progresiva en el tamaño de los folículos durante el establecimiento de la alopecia, se instaura a lo largo de generaciones sucesivas de los ciclos pilosos. En cada ciclo, la longitud del folículo anágeno es más pequeña, hasta que alcanza el tamaño del folículo típico del vello. Fig. 5. Es decir, estos folículos, se tornan pequeños sólo tras fases de crecimiento después de un periodo telógeno. Una vez se alcanza este estado, los folículos presentan periodos crecientes de fase de reposo, en relación con los periodos de crecimiento. La alopecia, se instaura con una perfecta uniformidad durante un largo periodo de tiempo.

La patogenia de esta forma de alopecia se relaciona con la edad, el cuadro genético y las hormonas andrógenas. La afección nunca se produce en niños prepuberales normales, pero al alcanzarse la madurez sexual se hace evidente el proceso de envejecimiento con progresiva pérdida de

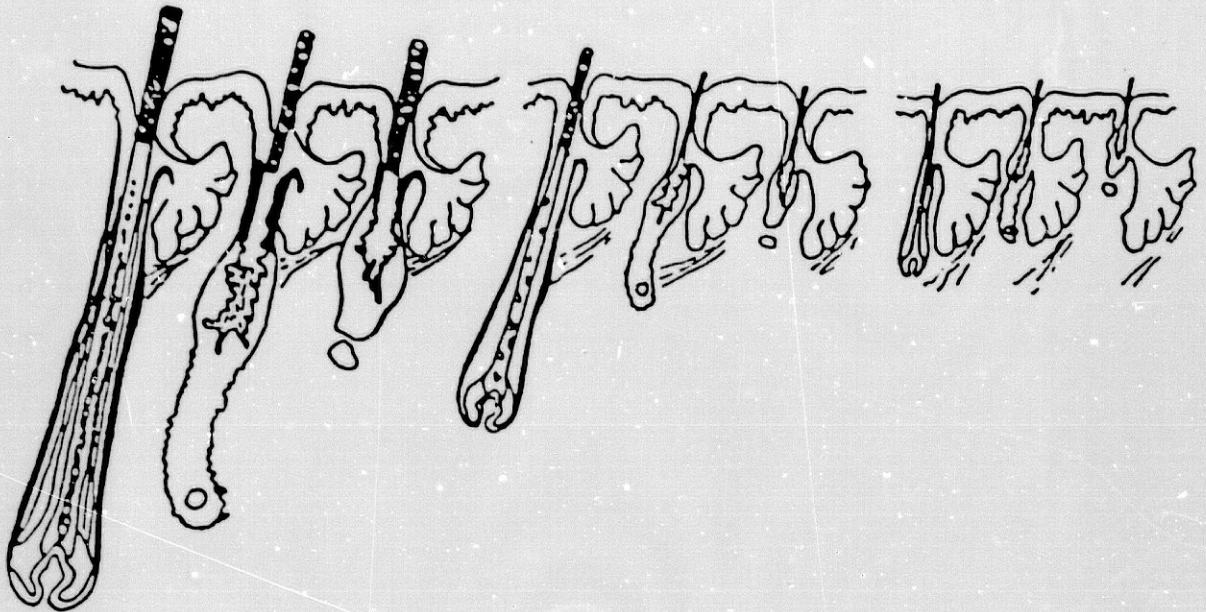


FIG. 5. DISMINUCION DEL TAMAÑO DEL FOLICULO A LO LARGO DE GENERACIONES SUCESIVAS DE CICLOS PILOSOS.

pelo. Aunque la frecuencia hereditaria es notable en los varones, es particularmente evidente en las mujeres con firmes antecedentes familiares de calvicie en sus antepasados tanto masculinos como femeninos.

Sin embargo, la etiología de la alopecia sigue siendo un misterio, ya que aquellos que la atribuían a defectos endocrinos, han tenido que aceptar su error, debido al éxito demostrado de los autotrasplantes de cuero cabelludo. Tampoco puede pensarse seriamente que una disminución de la vascularización del tejido sea la causa de la alopecia, ya que la gran red vascular de dicho tejido es poco utilizada por la piel, e incluso la piel casi isquémica puede presentar un buen crecimiento capilar.

Todo el mundo parece estar de acuerdo con Hamilton (85) en que un cierto nivel de andrógenos, es necesario para el desarrollo de la alopecia. Pero cómo se desarrolla, nadie lo sabe.

La significación de los andrógenos en esta afección es enorme (86). Cuando se produce calvicie de tipo masculino en el varón adulto, la castración interrumpe la progresión de la misma, y la administración de testosterona proporciona una nueva pérdida de pelo. Las enfermedades masculinizantes de las mujeres pueden producir calvicies del mismo tipo, especialmente en aquellas con evidentes

factores genéticos predisponentes. Los varones castrados en época prepuberal o los que sufren infantilismo, no padecen ASM aunque tengan frecuentes antecedentes familiares de calvicie. Como hemos apuntado anteriormente, parece ser que existe una relación directa, entre el metabolismo de los andrógenos y el desarrollo capilar. Sin embargo, una de las paradojas en este sentido, es que cuando la producción de testosterona es masiva, el cuero cabelludo pierde su pelo; pero tanto el pelo del pecho como el de la barba, fosas nasales y conductos auditivos tiene un crecimiento estimulado.

3. UNIDAD PILOSEBACEA:

Los pelos son células queratinizadas producidas por los folículos, que a su vez son invaginaciones de la epidermis en el interior de la dermis. El extremo inferior del folículo se expande en el bulbo piloso, que está unido por su extremo basal a la papila de tejido conectivo. Asociadas con el folículo piloso se encuentran una o más glándulas sebáceas, y un haz de musculatura lisa: el músculo erector del pelo. El folículo piloso, junto con las

glándulas sebáceas que crecen a sus lados, forman lo que se conoce como unidad pilosebácea.

3.1. EL PELO:

El pelo es un cilindro fino, queratinizado y elástico que se desarrolla a partir de la epidermis. Cada pelo tiene un cilindro libre y una raíz que se encuentra en la piel.

El pelo incluye células epidérmicas dispuestas en tres capas concéntricas: la médula, la corteza y la cutícula. La médula está formada por dos o tres capas de células cúbicas cornificadas, que están separadas parcialmente por espacios aéreos. La médula falta en los pelos cortos finos (vello) y también en el pelo rubio.

La corteza integra la mayor masa del pelo, y está compuesta por varias capas de células cornificadas, largas y aplanadas.

Superficialmente, también hay una capa única de células delgadas, la cutícula. Son células cornificadas que, salvo las que se encuentran en la base del pelo, han perdido sus núcleos.

3.2. FOLICULO PILOSO:

El folículo piloso es una vaina compuesta que incluye una vaina de tejido conectivo externa, proveniente de la dermis, y una vaina radicular epitelial interna, que proviene de la epidermis.

En el interior el folículo piloso se expande en un bulbo piloso, donde la raíz pilosa y su vaina, se unen en una masa de células primitivas, la matriz. La base del bulbo está invaginada por la papila de tejido conectivo, a la que se fusionan la raíz pilosa y sus vainas. La papila pilosa, aunque mucho mayor, tiene estructura semejante a otras papilas dérmicas, e incluye fibras de tejido conectivo fino, elementos celulares y un plexo abundante en vasos sanguíneos y nervios. Fig. 6.

Para que en un folículo se forme un pelo, las células de la matriz germinativa tienen que proliferar. Esto desplaza las células de las capas superiores de la matriz germinativa hacia la vaina radicular externa. A medida que las células son impulsadas hacia afuera se alejan más de la papila, que es su fuente nutritiva, y se transforman en queratina.

El pelo crece cíclicamente con periodos alternos de crecimiento y de descanso. La fase de crecimiento se

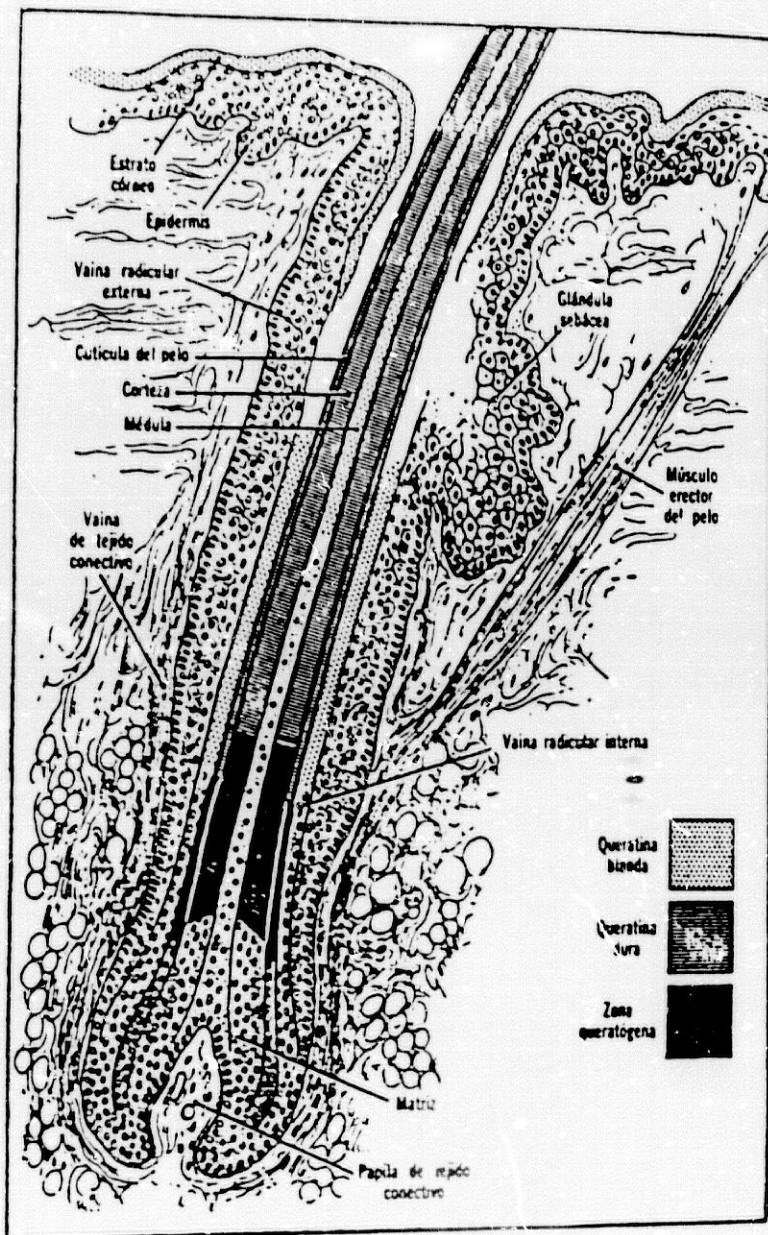


FIG. 6. ESQUEMA DE UN FOLICULO PILOSEBACEO
(SEGUN HAM).

conoce como fase anágena, mientras que la fase de descanso es la fase telógena. El periodo de transición entre ambas fases se conoce como fase catágena. Cuando un folículo inactivo vuelve a crecer, forma un nuevo pelo que desplaza al viejo, que se desprende o crece al lado de él. Fig. 7.

Durante la fase de crecimiento, las células de la matriz germinativa tienden a proliferar y a diferenciarse y, en consecuencia, el pelo se va alargando.

En la fase de reposo, la matriz germinativa pierde su actividad y se atrofia. Entonces, la raíz del pelo queda separada de su matriz y se desplaza hacia arriba, logrando por cierto tiempo una fijación más o menos secundaria en la vaina radicular externa, epidérmica, se ha retraído hacia arriba en sentido de la superficie. Después se desarrollará una nueva matriz germinativa a partir de la papila y crecerá un nuevo pelo.

Este modelo de crecimiento-descanso y la fase de crecimiento varía de unas especies a otras, e incluso en un mismo animal varía de una parte del cuerpo a otra. En mamíferos que mudan anualmente, los pelos de la fase telógena se desprenden más o menos al mismo tiempo, en una época dada del año, cuando son reemplazados por pelos nuevos. En el hombre, cada folículo tiene su propio ciclo de crecimiento, que es normalmente independiente de otros

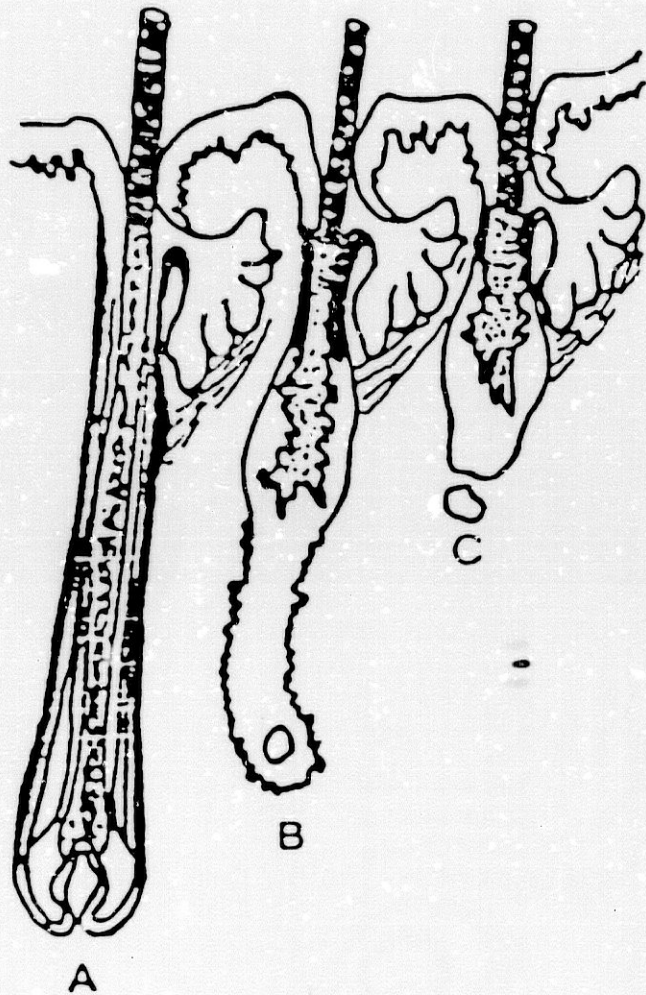


FIG. 7. ESQUEMA DEL CICLO DE CRECIMIENTO DEL PELO. A: ANAGENO; B: CATAGENO; C: TELOGENO.

foliculos cercanos. El pelo humano crece alrededor de 0.3 a 0.4 mm por día (87,88), pero esta tasa de crecimiento puede estar afectada por muchas variables.

3.3. CONTROL HORMONAL DEL CRECIMIENTO DEL PELO:

Diversas investigaciones del ciclo normal del crecimiento folicular en varias especies animales, han contribuido a determinar los efectos hormonales sobre el crecimiento del pelo. Aunque está claro que las hormonas influyen profundamente, la complejidad de sus acciones está por determinar. Las diferentes especies estudiadas responden de forma distinta a la misma hormona, por ejemplo, los adrenocorticoides estimulan el crecimiento del pelo en ciertas alopecias del cuero cabelludo humano, pero lo suprimen en ratas y otros roedores. El crecimiento espontáneo se retrasa marcadamente en animales diabéticos, pero una vez iniciado el crecimiento, éste es normal. Tras la administración de insulina se restaura dicho crecimiento, y se incrementa en animales intactos.

Resulta evidente, en el hombre, que el crecimiento del pelo está bajo control hormonal. El crecimiento del pelo sexual, a saber, el axilar y púbico de los dos sexos

y la barba del varón, es dependiente de los andrógenos. En la pubertad, la secuencia del desarrollo del pelo está, inicialmente, en paralelo con los aumentos de los niveles de andrógenos en las fuentes testicular, suprarrenal u ovárica, que ocurren en ambos sexos (89). Sin embargo, la manera exacta de acción y probablemente de interacción de las hormonas, para promover los cambios en el crecimiento del pelo, permanece incierta. Aunque se acepta que la testosterona producida por las células intersticiales de los testículos, es responsable de la mayor parte de los cambios cutáneos de la adolescencia masculina, y que la actividad testicular está iniciada por las hormonas gonadotróficas de la hipófisis, existen ciertos hechos que indican que otras hormonas pueden jugar también un papel directo en la estimulación del folículo piloso. Así, se requiere el cooperativismo entre los andrógenos y las hormonas hipofisarias, para el desarrollo completo del ciclo de crecimiento del pelo (90).

Una evidencia directa del papel de las hormonas masculinas, es que la castración reduce el crecimiento de la barba, mientras que los andrógenos lo estimulan en eunucos y varones ancianos (91). En el hirsutismo, el tratamiento con un antiandrógeno, como el acetato de ciproterona, parece que actúa disminuyendo los niveles de andrógenos; con

tal tratamiento los pelos se reducen en la longitud definitiva, en la tasa de crecimiento, en el diámetro y en la extensión de la médula (92).

Los cambios en el crecimiento del pelo también pueden ser asociados con otros desórdenes endocrinos, como hipotiroidismo, hipertiroidismo y embarazo.

El hecho de que el cabello se comporte de un modo distinto al resto del pelo corporal, frente a la acción de diversas hormonas sexuales, todavía es hoy objeto de discusión. Aunque se considera que los andrógenos estimulan el crecimiento del pelo en muchas regiones, son indirecta o directamente responsables de la ASM.

El importante papel de los andrógenos en la ASM, ha sido establecido por la ausencia de calvicie en varones prepuberales castrados (86), por su desarrollo en alguno de éstos individuos cuando se les administra testosterona, y por la alta incidencia en mujeres, cuando la secreción androgénica está aumentada.

3.4. GLANDULA SEBACEA:

La glándula sebácea, formación anexa al folículo piloso y resultado de una invaginación del mismo, es una

glándula lobulada que desemboca en la porción terminal del folículo, y está situada entre éste y el músculo erector pili. Existe únicamente en mamíferos.

Se encuentra en todas las áreas de la piel excepto palmas, plantas y dorso de los pies. Su tamaño y número varía de una zona a otra. Las glándulas más grandes se encuentran generalmente en la cara y cuero cabelludo.

La glándula sebácea es una glándula holocrina, su secreción está formada por la desintegración completa de las células glandulares. Las células se reponen por división celular, en la periferia de los lóbulos o acini de la glándula. En este proceso, se fuerzen más y más células hacia el interior del saco, mientras que al mismo tiempo su citoplasma se llena con un material graso pálido, denominado sebo, que las células elaboran conforme se mueven desde la pared al interior del saco. Allí mueren y se desprenden para constituir la secreción de la glándula, que es expulsada a través de los folículos pilosos.

La función principal del sebo es la de actuar a modo de crema natural para la piel. Impide la evaporación excesiva del estrato córneo en tiempo frío, y así ayuda a conservar el calor corporal. En tiempo caluroso, manteniendo aceitado el estrato córneo, evita que se resquebraje y sufra grietas cuando el sudor se evapora.

El sebo es una mezcla compleja de lípidos, y su naturaleza química no se ha aclarado aún del todo. Una complicación inherente a la caracterización del sebo es que, puesto que el material glandular puro es difícil de obtener, casi todos los análisis se han hecho con lípidos superficiales, que son una mezcla de lípidos sebáceos y epidérmicos. Sin embargo, si el lípido superficial se recoge en un área donde hay gran cantidad de glándulas sebáceas, casi todo el lípido será de origen sebáceo. Se han identificado en los lípidos superficiales: ácidos grasos libres, triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, ésteres de la cera, ésteres del colesterol, escualeno y parafinas. La parafina es, probablemente, de origen exógeno mientras que el escualeno y los ésteres de la cera derivan únicamente de las glándulas sebáceas. Greene y colaboradores (93) estudiaron los lípidos de la superficie, recogidos en 7 zonas diferentes de la piel, y dedujeron que en áreas ricas en glándulas sebáceas, como la frente, más del 95 % de los lípidos superficiales eran de origen sebáceo. La composición del sebo puro, calculada por estos autores, es la

siguiente:

Glicéridos y ácidos grasos libres	57.5%
Esteres de la cera	26%
Escualeno	12%
Esteres del colesterol	3%
Colesterol	1.5%

Como las glándulas son holocrinas, la formación del sebo depende de la proliferación celular, siendo la producción del sebo proporcional al tamaño de la glándula. Así de acuerdo con Emanuel (94,95), Kligman y Selly (96), sugirieron que el flujo de las glándulas sebáceas es continuo y que la cantidad de sebo liberado, en un cierto tiempo y por unidad de área, es proporcional al volumen glandular total.

Existe un cierto número de factores que contribuyen a la secreción sebácea. La contracción de los músculos erectores del pelo puede hacer que el sebo formado sea vaciado rápidamente (96-98). El aumento de temperatura, puede incrementar el aflujo de sebo preformado a la superficie de la piel, pero no hay pruebas de que aumente realmente la producción de sebo, que parece estar únicamente bajo control hormonal. Cuando la piel está húmeda, la

superficie, parece más aceitosa que cuando una cantidad comparable de lípido se encuentra en la piel seca. La mayor sudoración, cuando no está acompañada de un aumento de temperatura, no aumenta el aflujo de sebo a la superficie cutánea. No hay ninguna evidencia de una influencia nerviosa (98).

3.5. CONTROL HORMONAL DE LA GLANDULA SEBACEA:

Las glándulas sebáceas, experimentan durante su tiempo de vida marcados cambios en su desarrollo y actividad, como resultado de los cambios endocrinológicos.

En el hombre, las glándulas sebáceas del rostro son moderadamente grandes en el nacimiento, pero se vuelven pequeñas e indiferenciadas en la infancia. En la pubertad, las glándulas sebáceas vuelven a crecer, produciendo grandes cantidades de sebo en varones y mujeres. Generalmente declina la actividad después de la menopausia, mientras que en el varón a menudo persiste sin cambios hasta los 70 años (99,100).

Los cambios que ocurren en la glándula sebácea, en relación con la edad y sexo, están influenciados y mo

dulados por distintas hormonas, como se expone a continuación.

Las hormonas sebotróficas más importantes en el hombre, son los andrógenos, tanto los de origen gonadal y adrenal en la mujer, como los de origen gonadal en el varón. Su influencia ya ha sido descrita anteriormente en el apartado 1.2.5.

Los estrógenos reducen, indudablemente, la actividad sebácea. El tamaño de la glándula sebácea disminuye, cuando se administran oralmente a hombres adultos (100). Como no ha sido posible demostrar ningún efecto por aplicación tópica en frente humana (74) se sugirió que podían actuar por reducción de la producción endógena de andrógenos (100).

Sin embargo, las experiencias con animales apoyan la hipótesis de que los estrógenos actúan periféricamente y directamente sobre la glándula sebácea: 1) No parece que reduzcan la división celular sebácea en rata (67). 2) Su acción supresora puede ser claramente demostrada al lado de los efectos estimuladores de andrógenos exógenos en animales castrados (71,101). En resumen, los estrógenos parecen actuar independientemente de los andrógenos en el lugar periférico e independientemente de la existencia de glándulas secretoras de andrógenos. En el hombre, sin

embargo, la posibilidad de que también influyan los niveles hormonales por algún mecanismo sistémico no puede ser excluida.

En cuanto a la progesterona, ha sido debatido durante algún tiempo si era o no sebotrónica. Estudios en piel, han demostrado el poder inhibitor de la progesterona en la 5α -R (102,103). Voigt y col. (104) sugirieron que el efecto de la progesterona excluía su uso tópico, pero Mauvais y col. (103), sugirieron que su uso tópico era efectivo, ya que en la circulación, antes de su absorción, el 70 % era metabolizada a otros productos inertes.

En el hombre, el papel de las hormonas tiroideas y de la hormona del crecimiento se manifiesta por los cambios de la secreción sebácea, que tienen lugar en el hipotiroidismo (105) y en la acromegalia (106).

Respecto de la hormona del crecimiento, existe una correlación entre sus niveles y los cambios en la secreción sebácea. Sin embargo, las hormonas tiroideas, parece ser que sólo actúan en casos de hipotiroidismo y eutiroidismo, mientras que en rata actúan a todos los niveles (107).

En rata, además de los andrógenos, la hormona sebotrónica más importante es la α -MSH (hormona

estimulante de los melanocitos) (108-110). Actuando ambos sinérgicamente, en la glándula sebácea (109,111).

En el hombre, la α -MSH no es sebotrófica. Existen situaciones, como la lactancia y el parkinsonismo, en que la secreción sebácea está aumentada, y se pensó que podía ser debido a la acción de hormonas peptídicas, posiblemente análogas a la α -MSH de ratas (112,113). Sin embargo, al administrar l-dopa a pacientes con enfermedad de Parkinson, la secreción sebácea disminuye, por lo que se sugirió que la hormona está bajo control inhibitorio dopaminérgico (114).

La prolactina no tiene ninguna acción sobre la glándula sebácea, tanto en hombre como en rata. Esto se ha demostrado por la administración de prolactina a ratas (115); y en el hombre por la ausencia de correlación entre los niveles sanguíneos de prolactina y la secreción sebácea.

II. MATERIAL Y METODOS

1. TEJIDOS UTILIZADOS:

1.1. CUERO CABELLUDO:

Biopsias de cuero cabelludo de pacientes afectados de alopecia seborreica masculina, sometidos a autotransplante de cabello.

Las muestras se obtuvieron mediante un trocar de Orentreich de 4.5 mm, después de practicar un lavado y afeitado de la zona y tras la administración de anestesia local y adrenalina.

1.1.1. ZONA ALOPECICA:

Se ha utilizado en la mayor parte de los estudios. Para caracterizar las reacciones enzimáticas en el estudio del metabolismo, determinación de la actividad enzimática de la guanilciclasa y para los estudios comparativos con la zona no alopécica.

1.1.2. ZONA OCCIPITAL:

Hemos tenido gran dificultad para obtener suficientes muestras de la zona dadora, por razones deontológicas. Por ello, este tejido ha sido utilizado únicamente para realizar estudios puntuales comparativos con la zona alopécica.

Este material biopsico ha sido facilitado por el Dr. Amura de la Clínica Bauert de Barcelona.

1.2. PROSTATA HUMANA:

Obtenidas del Servicio de Urología de los Hospitales Universitarios de Reus y Tarragona, procedentes de pacientes con adenoma benigno de próstata.

Se han utilizado para validar el método de determinación de la actividad 5α -R.

2. REACTIVOS Y SOLUCIONES:

2.1. DIHIDROTESTOSTERONA RADIATIVA. 5α -dihidro (1α 2α (n)- 3 H) testosterona de 56-60 Ci/mmol y 1 mCi/ml, de Amersham.

2.2. TESTOSTERONA RADIATIVA. (1,2,6,7,- 3 H) testosterona de 103 Ci/mmol y 1 mCi/ml, de Amersham.

2.3. KIT DE DETERMINACION DE GMPc, de Amersham, basado en la técnica de radioinmunoensayo, utilizando 3 H-GMPc.

2.4. ESTEROIDES NO RADIATIVOS, de Sigma Co.

2.5. NADPH. β -Nicotinamida-adenin-dinucleótido fosfato reducida, de Boehringer Mannheim GmbH.

2.6. INDOMETACINA, cedida por E. Carreras.

2.7. CREATIN-FOSFATO, de Boehringer Mannheim GmbH.

2.8. CREATIN-FOSFOQUINASA, de Boehringer Mannheim GmbH.

2.9. GTP. Guanosin-5'-trifosfato, de Boehringer Mannheim GmbH.

2.10. SERDALBUMINA BOVINA, de Merck.

2.11. GASES:

- Gas PR, Argon al 10%
- Carbógeno al 5%
- Nitrógeno seco

2.12. SOLUCIONES Y TAMPONES:

2.12.1. Tampón Fosfato sódico, pH=6.6, 0.1 M.

2.12.2. Tampón Tris-ClH, pH=7.6, 50 mM.

2.12.3. Solución de esteroides no radiactivos a una concentración de 0.25 mg/ml.

2.12.4. Solución cloroformo:metanol (2:1).

2.12.5. Solución benceno:etanol (96:4).

2.12.6. Solución para centelleo líquido: Unisolve, de Koch Light.

2.12.7. Los restantes reactivos utilizados fueron de grado analítico.

3. INSTRUMENTACION Y MATERIAL:

- 3.1. MEDIDOR DE pH: PHM 62 Radiometer.
- 3.2. HOMOGENIZADOR: Omni-Mixer L 7106 Sorvall.
- 3.3. CROMATOPLACAS: Alúmina óxido F₂₅₀ 60 E Merck.
- 3.4. CENTRIFUGAS:
 - 3.4.1. Labofugue II Heraeus, Chist.
 - 3.4.2. Ultracentrifuga L5-65 Beckman.
- 3.5. DETECTOR DE CENTELLEO LIQUIDO: Packard Tri Carb 3255.
- 3.6. ESPECTROFOTOMETRO: Varian Techtron 635.
- 3.7. RADIOCROMATOGRAFO: Berthold LB₂₈₃₂.

4. CONTROLES CROMATOGRAFICOS:

El grado de pureza de los esteroides radiactivos fue analizado mediante cromatografía en capa fina, en placas de óxido de aluminio, utilizando como trasportador el esteroide no radiactivo a una concentración de 0.25 mg/ml en cloroformo. La localización de los esteroides en la placa se llevó a cabo mediante el revelado con vapores de yodo metálico. Las placas se leyeron en el

radiocromatógrafo. Para más detalles del desarrollo y análisis de la cromatografía ver más adelante.

5. EVALUACION DEL METABOLISMO DE LA TESTOSTERONA EN LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS:

5.1. METABOLISMO DE LA TESTOSTERONA EN CUERO CABELLUDO:

Esencialmente se ha seguido el método de Moore y Wilson modificado (116). Se ha utilizado tanto la zona alopecica como la zona occipital.

5.1.1. HOMOGENIZADO DEL TEJIDO:

El tejido se cortó, lo más finamente posible, con unas tijeras y se homogenizó, en tampón fosfato potásico 0.1 M pH=6.6 (1/10, p/v), con una Omni-Mixer durante 120 segundos (en 4 periodos de 30 segundos, con intervalos de pausa de 30 segundos), refrigerado con hielo en escamas. El homogenizado obtenido se tamizó con una gasa para eliminar las partículas más groseras.

5.1.2. FRACCION SOLUBLE DEL TEJIDO:

Una vez obtenido el homogenizado, se centrifugó a 105,000xg durante 65 minutos en una ultracentrífuga Beckman L5 65 a 4°C.

El sobrenadante obtenido es la fracción soluble (FS) o citosol, que se recoge cuidadosamente por aspiración, evitando recoger los lípidos sobrenadantes.

Las proteínas de estas dos fracciones, homogenizado y fracción soluble, se determinaron por el método de Lowry y col. (117).

5.1.3. SOLUCION DE TESTOSTERONA:

Se preparó una solución conveniente de ^3HT en cloroformo para que nos de una concentración final entre 4 y 200 nM. En otras ocasiones se realizó una dilución isotópica, en cloroformo, de ^3HT con testosterona no radiactiva 1 mM, adecuada para obtener unas concentraciones finales entre 5 y 100 μM , como veremos en los resultados.

5.1.4. ENSAYO DE LA REACCION ENZIMATICA:

La ^3HT a una concentración adecuada, se introducía en tubos de ensayo y se evaporaban a sequedad en atmósfera de nitrógeno. Una vez evaporada la solución con ^3HT , se añadían 250 μl de una solución de NADPH 2×10^{-3} M en tampón fosfato pH=6.6. A continuación se introducían 500 μl del homogenizado y se completaba hasta un volumen de 1000 μl con el mismo tampón fosfato. Una vez mezclados los reactivos se sometían los tubos a un burbujeo con carbógeno durante 30 segundos, cerrándose los tubos inmediatamente.

5.1.5. INCUBACION:

El proceso general se llevó a cabo en un baño termostatzado a 37°C con agitación, durante 60 minutos. La incubación se hizo a tiempos variables desde 0 a 60 minutos. La reacción enzimática se interrumpió añadiendo 5 ml de una mezcla de cloroformo:metanol (2:1).

5.1.6. SEPARACION Y EXTRACCION DE ESTEROIDES:

La mezcla del ensayo en cloroformo:metanol se agitaba vigorosamente durante 15 segundos, la suspensión se centrifugaba durante 10 minutos a 5,000xg, obteniéndose tres fases: fase acuosa, interfase de proteínas y fase orgánica. Las dos primeras fases se descartaban por aspiración y 3 ml de la fase orgánica se transferían a tubos pequeños y se evaporaban a sequedad en atmósfera de nitrógeno.

El residuo de la evaporación, se disolvía en 60 μ l de una solución clorofórmica que contenía los esteroides no radiactivos, que actuaban de transportadores para la cromatografía en capa fina (testosterona, 3 α -Adiol, 3 β -Adiol, DHT, androstandiona y androstendiona). La concentración de los transportadores fue de 0.25 mg/ml.

5.1.7. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA:

Se aplicaban 50 μ l de esta solución a una cromatoplaca de óxido de aluminio y la cromatografía se desarrollaba utilizando como solventes una mezcla de benceno:etanol (96:4), y se realizaba en dos ascensos.

El revelado de la placa se llevó a cabo con vapores de iodo metálico.

5.1.8. ANÁLISIS DE LA RADIOACTIVIDAD:

Se ha llevado a cabo en un radiocromatógrafo Berthold LB 2832. Este sistema permite detectar la radiactividad con un poder de discriminación superior a 0.25 mm. Los radiocromatogramas obtenidos contienen la siguiente información:

1. Tiempo total de exposición.
2. Cuentas totales.
3. Cuentas integradas de cada esteroide radiactivo.
4. Porcentajes parciales de cada esteroide respecto a la radiactividad total.

Manteniendo constantes las condiciones de trabajo del radiocromatógrafo, se podían convertir las cuentas obtenidas en molaridades, mediante la conversión previa a DPM, y de DPM a moles. Para ello, se aplicaron cantidades conocidas de $^3\text{H-T}$ y $^3\text{H-DHT}$ a una cromatoplaca, procediendo a su lectura e integración por el procedimiento habitual. Paralelamente, cantidades de $^3\text{H-T}$ y $^3\text{H-DHT}$, idénticas a las

aplicadas a la placa, se introducían en viales de centelleo con Unisolve, y se calculaba, en un detector de centelleo líquido LKB, las DPM que corresponden a cada concentración de $^3\text{H-T}$ y $^3\text{H-DHT}$. Correlacionando las cuentas del radiocromatógrafo con las DPM obtenidas, se procedía a su posterior conversión en pmoles, mediante una representación de los pmoles en función de las cuentas $\times 10^3$ del radiocromatógrafo.

5.1.9. ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE LA REACCIÓN:

Se hizo un estudio del metabolismo de la ^3HT variando el tiempo de incubación entre 0 y 60 minutos, variando la concentración de proteínas de 0.1 a 0.4 mg y variando la concentración del sustrato de 5 a 100 μM . Todos estos estudios se hicieron siguiendo los pasos enumerados en el apartado 5.1.

El número de moles fijados y las K_M de la reacción se calcularon por el método de Lineweaver-Burk.

5.2. ESTUDIO DEL METABOLISMO DE LA TESTOSTERONA EN PROSTATA HUMANA:

Se ha utilizado la próstata humana como control de la metodología, al ser un tejido en donde tiene lugar la 5α -reducción. Se ha seguido el método general según los pasos descritos en el apartado 5.1.

6. ESTUDIO DEL METABOLISMO DE LA DHT EN CUERO CABELLUDO:

Se ha realizado en homogenizados de las zonas alopécica y occipital de cuero cabelludo, según el método general descrito en el apartado 5.1., utilizando $^3\text{H-DHT}$ como sustrato en lugar de $^3\text{H-T}$.

6.1. ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE LA REACCIÓN:

Asimismo se realizó un estudio de la cinética variando la concentración de proteínas, tiempo de incubación y concentración de $^3\text{H-DHT}$, en condiciones iguales a las del apartado 5.2., siguiendo la metodología general descrita en el apartado 5.1.

7. INHIBIDORES DEL METABOLISMO DE LA DHT EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO:

En este estudio se utilizaron homogenizados de cuero cabelludo procedentes de la zona alopecica.

7.1. PROCEDIMIENTO GENERAL:

Las condiciones fueron las mismas que las descritas en el apartado 5.1., salvo que en los tubos de reacción se añadan diversas sustancias potencialmente inhibidoras.

7.1.1. SOLUCIONES DE LOS INHIBIDORES:

Se hicieron soluciones clorofórmicas de los distintos inhibidores a concentraciones adecuadas para conseguir las concentraciones finales deseadas.

7.1.2. ENSAYO DE LA REACCION:

Una vez añadida la $^3\text{H-DHT}$ y evaporada a sequedad en los tubos de ensayo, se les añadian las soluciones clorofórmicas y de nuevo se evaporaron a sequedad. El resto del procedimiento es igual al descrito en el apartado 5.1.

7.1.3. CALCULO DE LAS K_I DE LOS DISTINTOS INHIBIDORES:

Se hizo variando las concentraciones de $^3\text{H-DHT}$ entre 50 y 200 nM, y variando las concentraciones del inhibidor. El cálculo de las K_I se hizo por el método de Lineweaver-Burk.

8. ESTUDIO DE LA GUANIL-CICLASA EN CUERO CABELLUDO
ALOPECICO:

Esencialmente se ha seguido el método de Palmer y col. modificado (118).

8.1. HOMOGENIZADO DEL TEJIDO:

Se realizó según los pasos citados en el apartado 5.1.1.

8.2. FRACCION SOLUBLE:

Se obtuvo según el apartado 5.1.2.

8.3. MEDIO DE INCUBACION:

Se hizo en tampón Tris-ClH pH=7.6 50 mM en el que van disueltos los siguientes componentes a las concentraciones finales que se indican:

Fosfocreatina	3 mM
Creatinfosfoquinasa	15 µg
BSA	15 µg
GTP	0.5 mM
Mercaptoetanol	2 mM
Cafeína	25 mM
Cloruro de Manganeso	3 mM
Cloruro de Calcio	1 mM

8.4. INCUBACION:

La solución del enzima (40 µl) se introducía en tubos Ependorf y se añadían 120 µl del medio de incubación anterior. Se agitaban los tubos y se introducían en un baño termostatzado con agitación a 37°C durante 10 minutos.

Pasado este tiempo, se añadía a cada tubo 10µl de EDTA 0.2 M seguido de agitación y se introducían durante 3 minutos en un baño de agua a ebullición. Posteriormente se

colocaban los tubos durante 10 minutos en un baño de hielo picado en escamas, y por último eran centrifugados a 5,000xg durante 15 minutos.

8.5. ENSAYO DEL GMPc:

Una vez centrifugadas las muestras, se tomaron 100 μ l del sobrenadante que se utilizaron para el ensayo de GMPc, que se realizó con un Kit de Amersham, usando $^3\text{H-GMPc}$ como marcador. La radiactividad se contó en un detector de centelleo líquido Packard Tri Carb 3255, utilizando como líquido de centelleo Unisolve.

El cálculo de los pmoles obtenidos se realizó mediante una recta patrón, utilizando concentraciones conocidas de $^3\text{H-GMPc}$. Obteniendo así unas CPM que nos permitieron calcular el parámetro Co/Cx , siendo Co las CPM que correspondieron a 0 pmoles de $^3\text{H-GMPc}$ y Cx las CPM de cada una de las concentraciones utilizadas de $^3\text{H-GMPc}$, representándose las Co/Cx en función de los pmoles de $^3\text{H-GMPc}$.

8.6. MUESTRAS BIOLÓGICAS UTILIZADAS:

Los estudios se realizaron en las zonas alopecica y occipital del cuero cabelludo humano.

8.7. CINETICA DE LA REACCION:

Se hizo un estudio variando el tiempo de incubación de 5 a 30 minutos, variando la concentración de proteínas de 10 a 100 μg y variando la concentración del sustrato (GTP) de 0.05 a 1.5 mM. Esto se realizó según la técnica general descrita en el apartado 7.4. El cálculo del número de moles fijados así como el de la K_M se hizo por el método de Lineweaver-Burk.

9. EXPRESION Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS:

Salvo en algún estudio cinético, los resultados se han expresado como medias \pm desviación standard. Para analizar y comparar nuestros resultados, se ha utilizado el test unilateral de Wilcoxon para muestras apareadas, y el test bilateral de Mann-Witney en las muestras no apareadas. Asimismo, hemos usado análisis de regresión lineal en el cálculo de las V_{max} y de las K_M .

III. RESULTADOS

1. DATOS CROMATOGRÁFICOS GENERALES:

1.1. Rf DE LOS ESTEROIDES:

En la Fig. 8 se pueden observar los distintos recorridos de los principales esteroides implicados en el metabolismo de la testosterona. Como se ve en la figura, todos los esteroides implicados en nuestro estudio alcanzan un grado de separación suficiente para ser identificados.

En la Tabla 1 se representan los valores medios de los Rf obtenidos para los distintos esteroides (n=42).

1.2. PUREZA CROMATOGRÁFICA DE LOS ISÓTOPOS:

En las figuras 9 y 10 se aprecia la pureza cromatográfica de la $^3\text{H-T}$ y $^3\text{H-DHT}$ respectivamente. La pureza fue siempre superior al 90%.

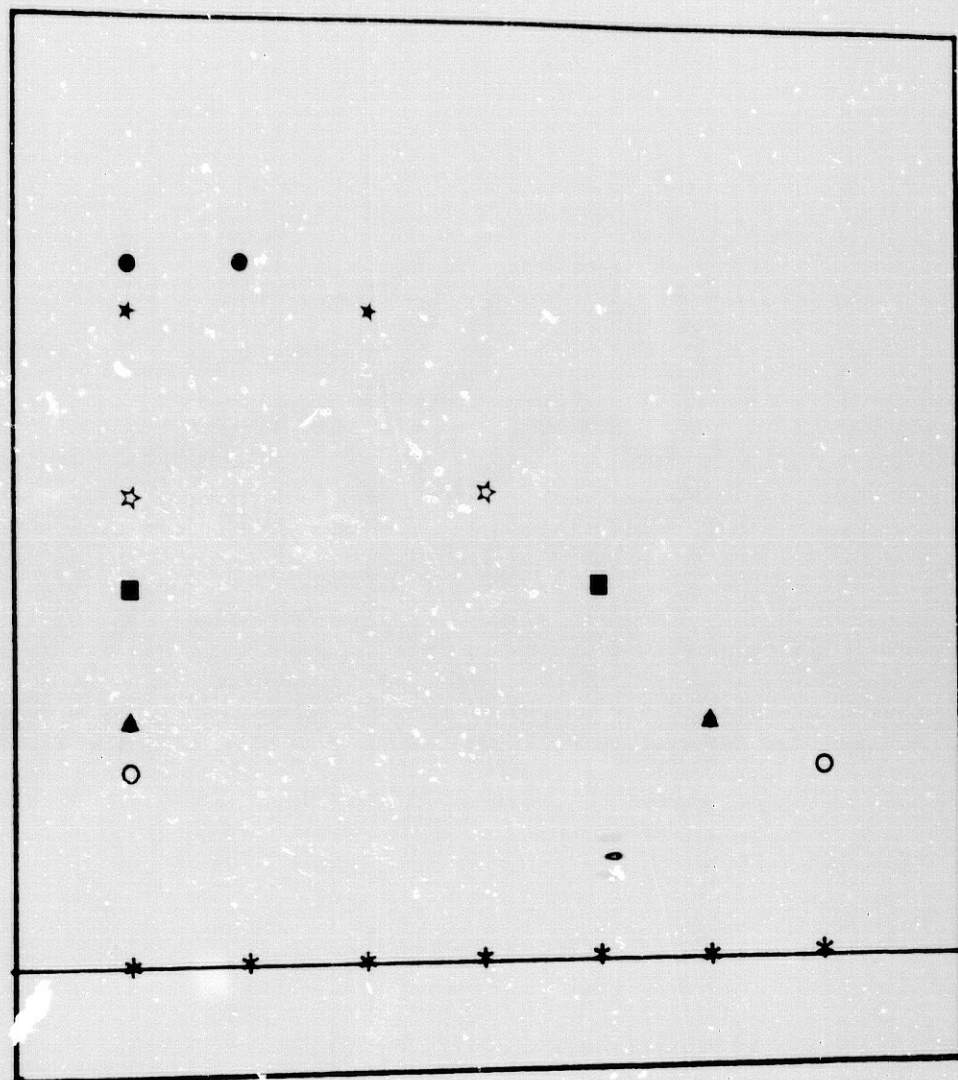


FIG. 8. CROMATOGRAMA DE LA TESTOSTERONA Y DE SUS METABOLITOS EN PLACA DE OXIDO DE ALUMINIO. FASE MOVIL BENCENO:ETANOL (96:4). (○) 3 β -ADIOL, (▲) 3 α -ADIOL, (■) TESTOSTERONA, (☆) DHT, (★) ANDROSTANDIONA Y (●) ANDROSTENDIONA.

ESTEROIDES	R _f
3 β -Androstanodiol	0.25 \pm 0.02
3 α -Androstanodiol	0.31 \pm 0.04
Dihidrotestosterona	0.59 \pm 0.03
Testosterona	0.48 \pm 0.03
Androstandiona	0.82 \pm 0.01
Androstendiona	0.86 \pm 0.01

TABLA 1. R_f OBTENIDOS DE LOS DISTINTOS ESTEROIDES
(n = 42).

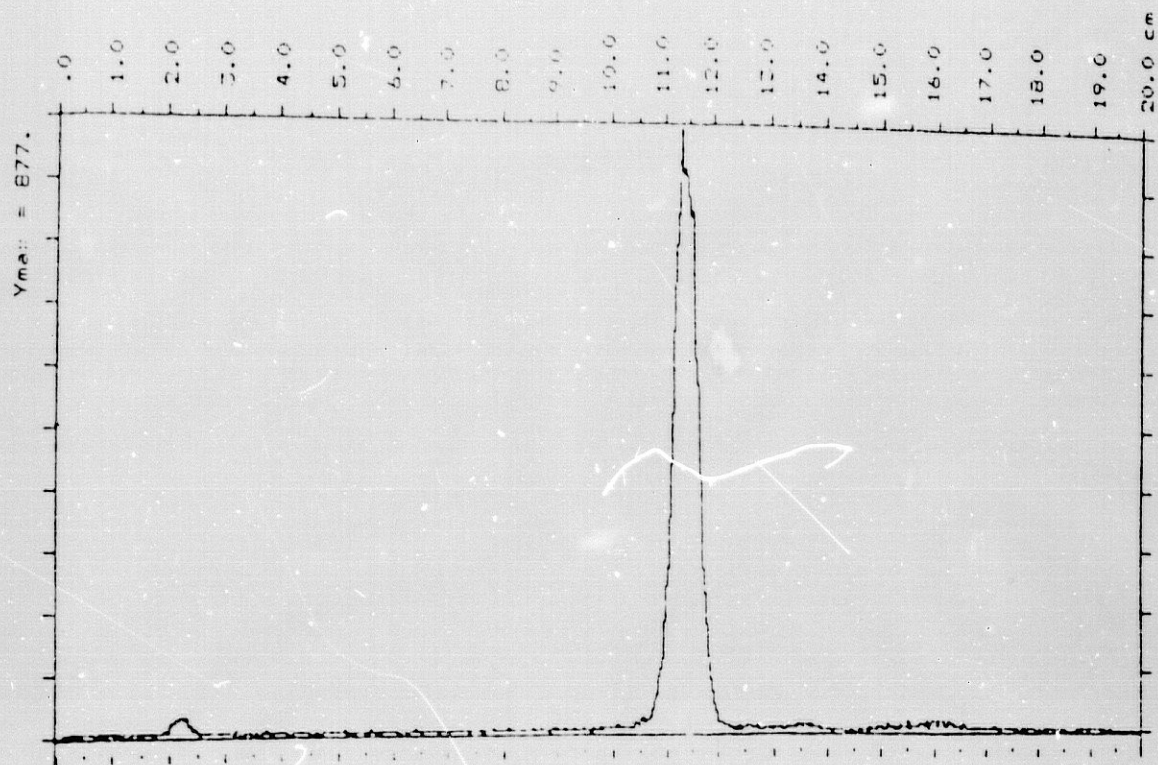


FIG. 9. RADIOCROMATOGRAMA DE LA PUREZA DE LA TESTOSTERONA.

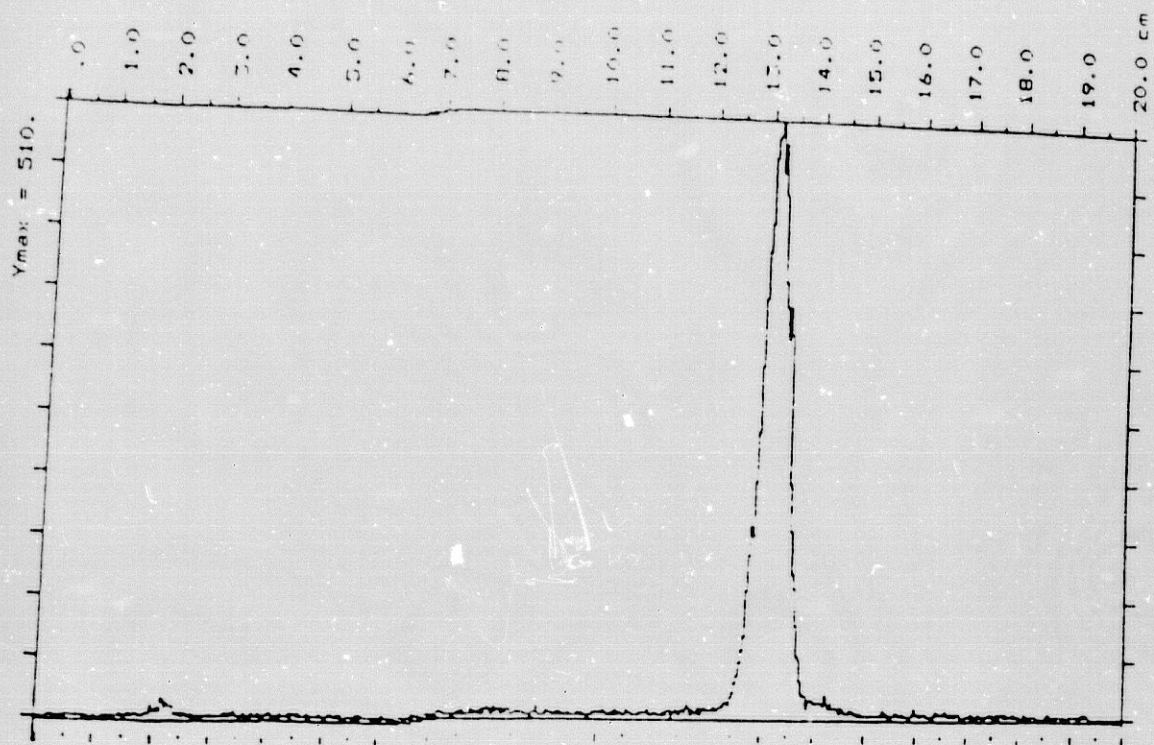


FIG. 10. RADIOCROMATOGRAMA DE LA PUREZA DE LA DHT.

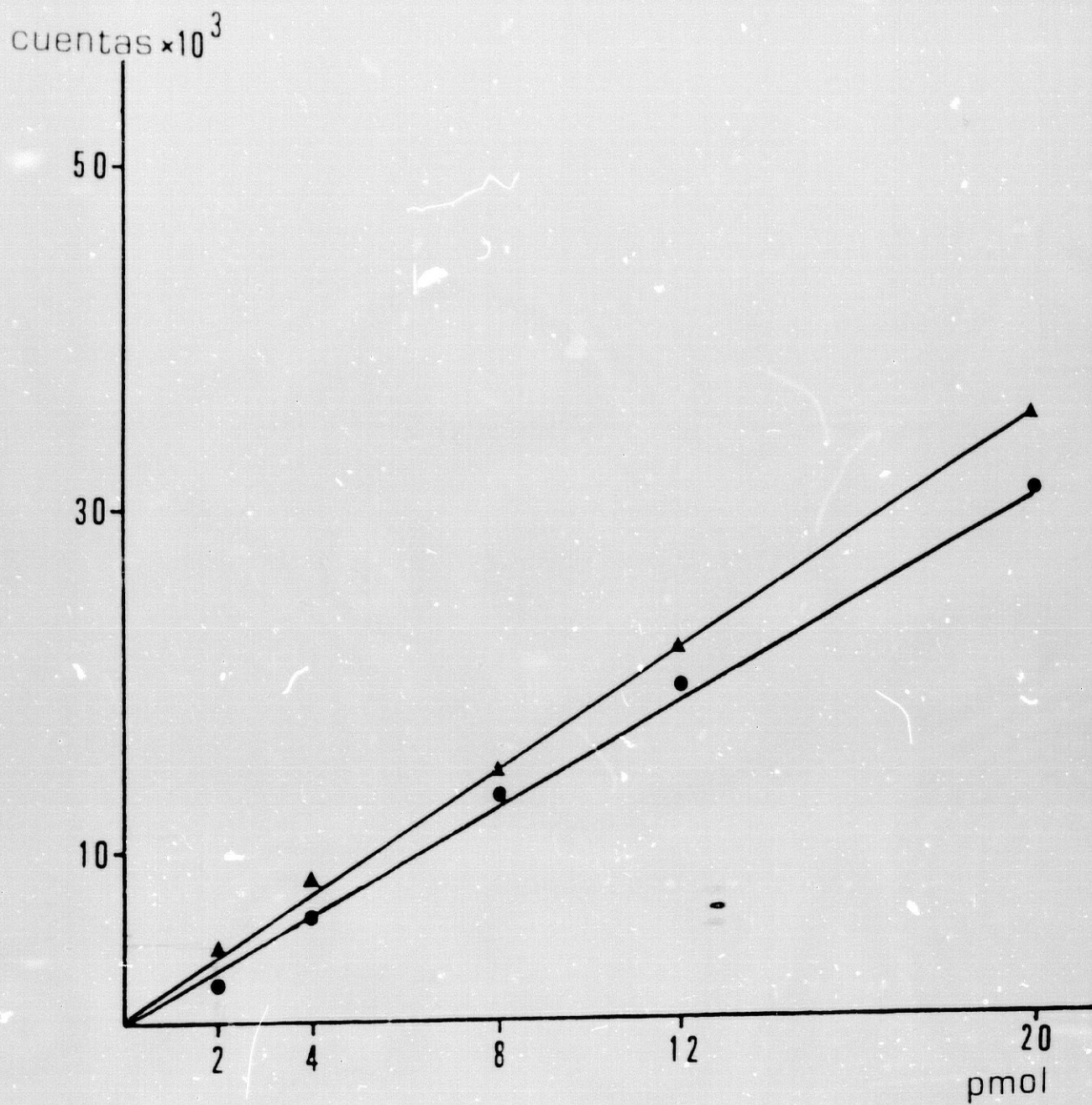


FIG. 11. RECTA PATRON DE LA RADIATIVIDAD DE LA $^3\text{H-T}$ Y DE LA $^3\text{H-DHT}$ DEL RADIOCROMATOGRFO. EN ORDENADAS: CUENTAS $\times 10^3$ OBTENIDAS DURANTE 30 MINUTOS. EN ABSCISAS: PMOL DE $^3\text{H-T}$ (\blacktriangle) Y DE $^3\text{H-DHT}$ (\bullet).

1.3. CALCULO DE LA RADIATIVIDAD:

La Fig. 11 representa la recta patrón de radiactividad para la $^3\text{H-T}$ y $^3\text{H-DHT}$ en nuestro radiocromatógrafo, relacionando las cuentas $\times 10^3$ obtenidas durante 30 minutos con los pmoles de $^3\text{H-T}$ y $^3\text{H-DHT}$.

2. METABOLISMO DE LA TESTOSTERONA EN HOMOGENIZADO DE PROSTATATA:

En la Fig. 12 se muestra un radiocromatograma tipo del metabolismo de la $^3\text{H-T}$ en próstata humana. Como se observa hay una gran conversión a DHT, a la concentración utilizada de 2 nM. La DHT, a su vez, se metaboliza a Adioles.

La Fig. 13, nos muestra el metabolismo de la $^3\text{H-T}$ en próstata en función del tiempo de incubación, expresado en porcentaje de metabolitos formados. A los 60 minutos se ha consumido, prácticamente toda la $^3\text{H-T}$, por lo que se estabiliza la formación de DHT, mientras que los Adioles, que se forman a partir de la DHT, aumentan progresivamente.

En la Fig. 14, se observa esta misma producción de Adioles, expresada en porcentaje, donde se pone de ma

nifiesto que la proporción del 3α -Adiol es de tres a cinco veces superior que la del 3β -Adiol, mostrando ambos una linealidad en su formación con el tiempo de incubación.

En las figuras 15 y 16, se muestran estos mismos resultados expresados en pmol/mg de proteína.

La Fig. 17, muestra la variación del metabolismo de la $^3\text{H-T}$ en función de la concentración proteica. En la misma, se observa una dependencia lineal entre la formación de DHT y Adioles respecto a la concentración de proteínas.

Este tipo de experimentos se ha realizado en tres pacientes. Aunque gráficamente hemos representado los resultados correspondientes a un paciente, las actividades enzimáticas específicas de los tres pacientes, nos dan un valor medio, de 1 ± 0.5 pmol/mg/h para la DHT y de 0.08 ± 0.02 pmol/mg/h para los Adioles.

La determinación de proteínas en próstata nos da un valor medio de 2.5 ± 0.9 mg/ml de homogenizado.

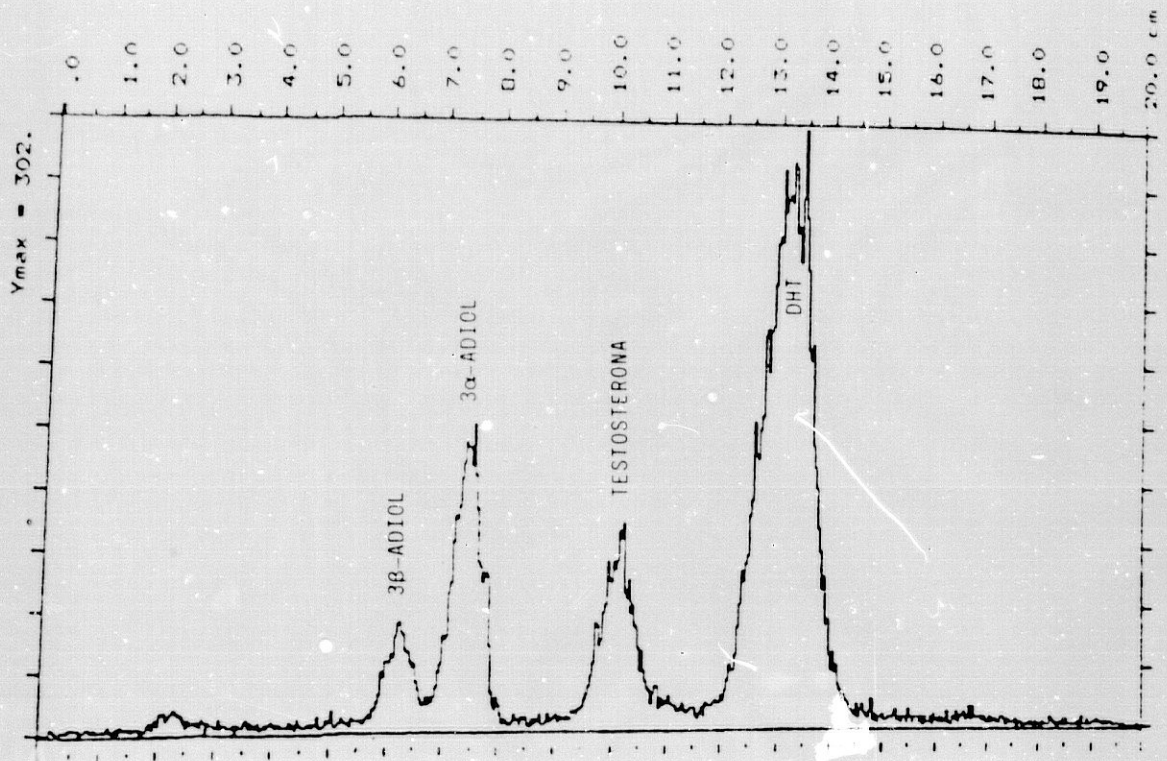


FIG. 12. RADIOCROMATOGRAMA TIPO DEL METABOLISMO DE LA $^3\text{H-T}$ EN PROSTATA HUMANA.

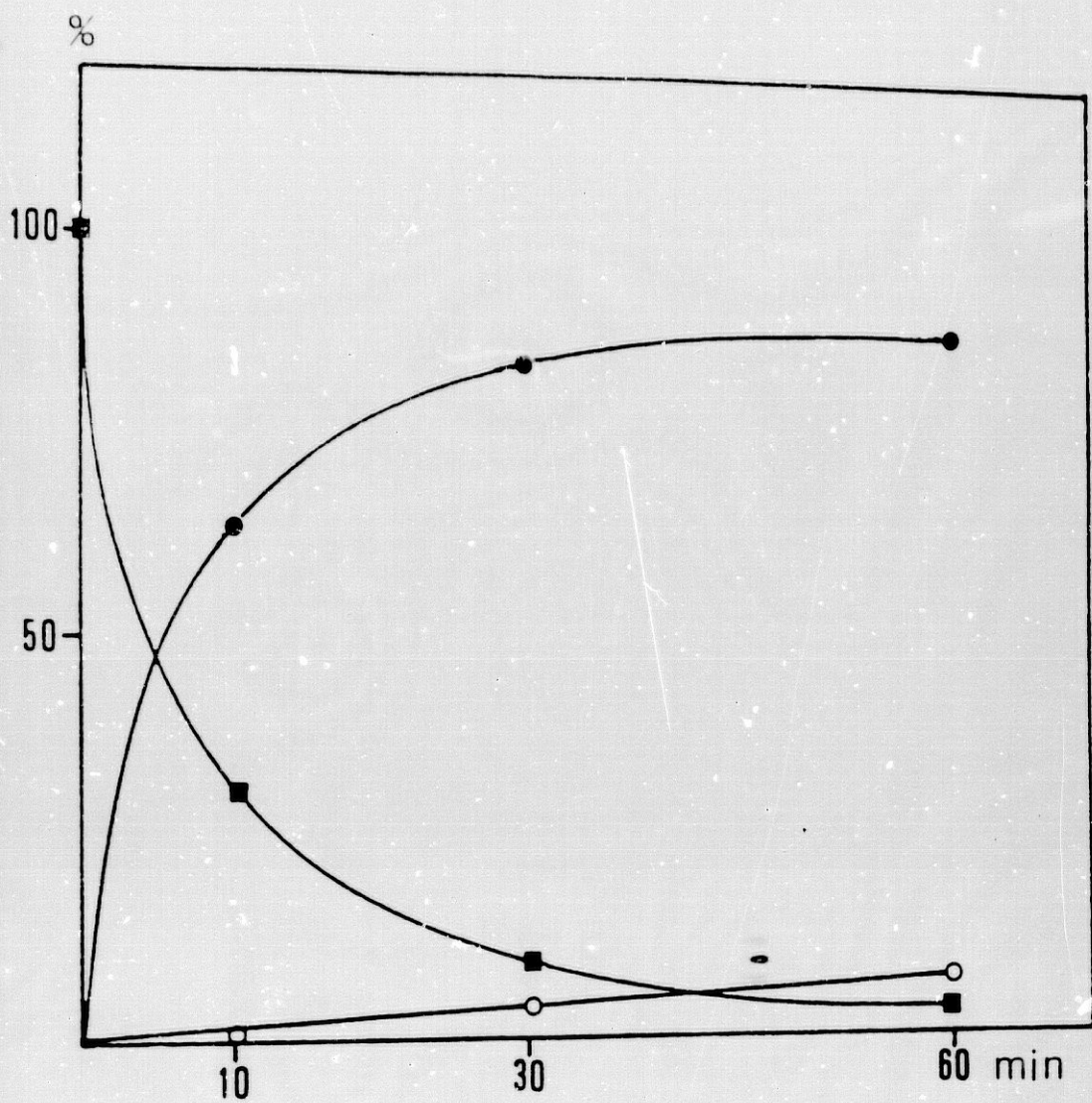


FIG. 13. VARIACION DEL METABOLISMO DE LA TESTOSTERONA RESPECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION EN PROSTATA. 1.5 mg DE PROTEINAS INCUBADAS CON $^3\text{H-T}$ 2 nM A 37°C A TIEMPOS VARIABLES. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA COMO PORCENTAJE DE METABOLITO FORMADO. (■) TESTOSTERONA, (●) DHT Y (○) 3-ADIOLES.

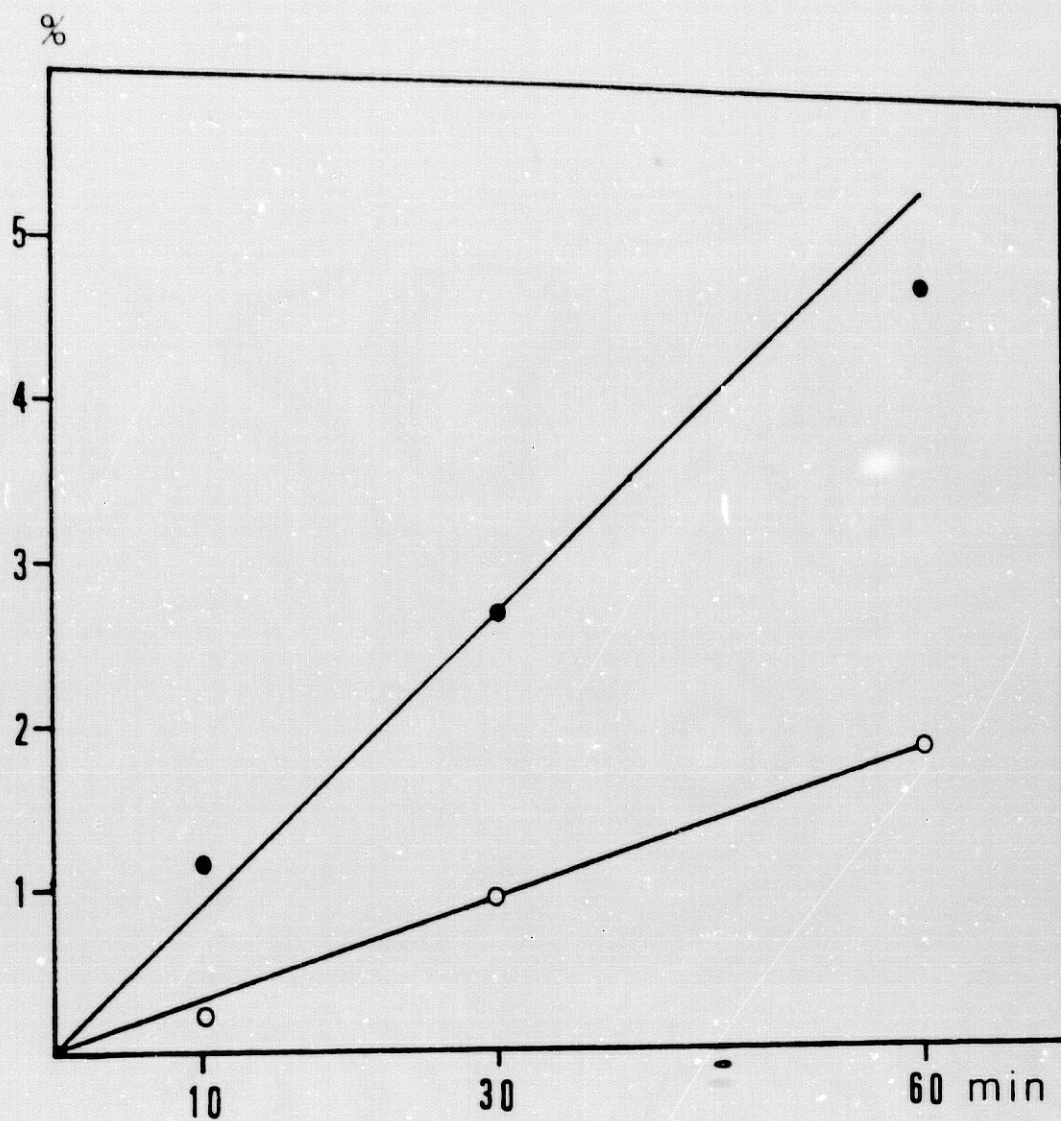


FIG. 14. VARIACION DE LA FORMACION DE 3-ADIOLES RESPECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION EN PROSTATA. 1.5 mg DE PROTEINAS INCUBADOS CON $^3\text{H-T}$ 2 nM A 37°C A TIEMPOS VARIABLES. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA COMO PORCENTAJE DE 3-ADIOLES FORMADOS (●) 3 α -ADIOL Y (○) 3 β -ADIOL.

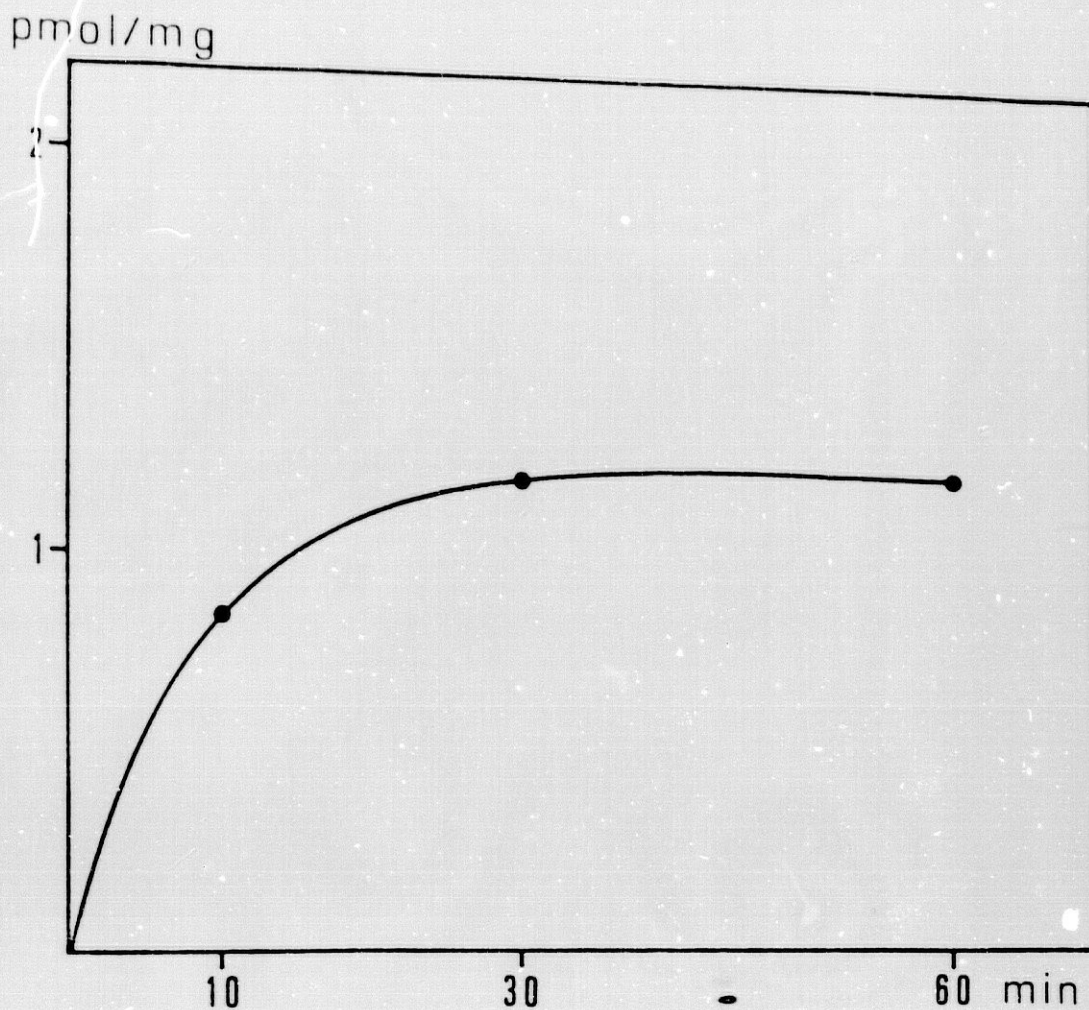


FIG. 15. VARIACION DE LA FORMACION DE DHT RESPECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION EN PROSTATA. 1.5 mg DE PROTEINAS INCUBADOS CON $^3\text{H-T}$ 2nM A 37°C A TIEMPOS VARIABLES. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA COMO PMOL DE DHT FORMADA / mg DE PROTEINA.

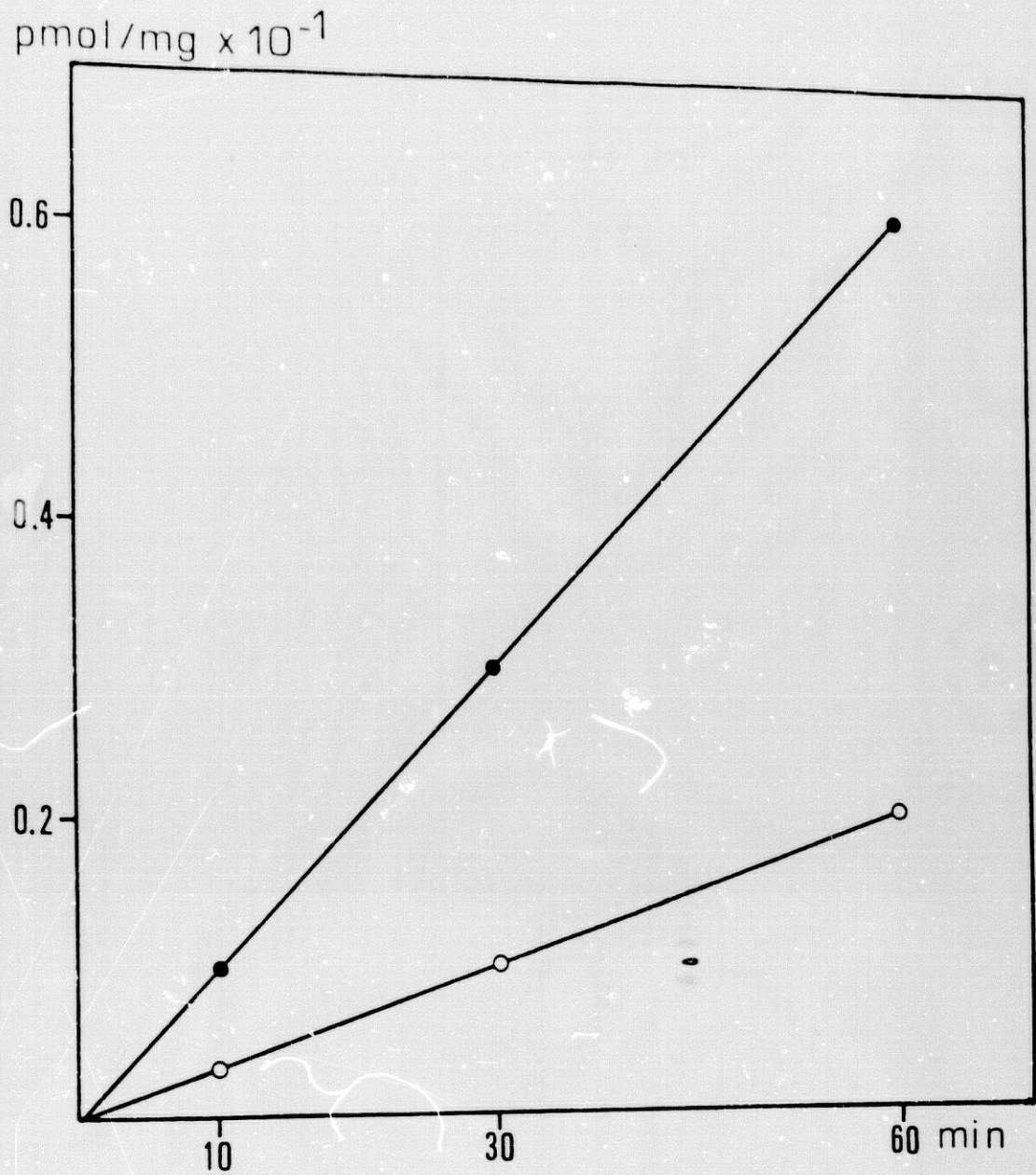


FIG. 16. VARIACION DE LA FORMACION DE 3-ADIOLES RESPECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION EN PROSTATA. 1.5 mg DE PROTEINAS INCUBADOS CON ³H-T 2 nM A 37°C A TIEMPOS VARIABLES. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA COMO PMOL DE ADIOLES FORMADOS / mg DE PROTEINA. (●) 3 α -ADIOL Y (○) 3 β -ADIOL.

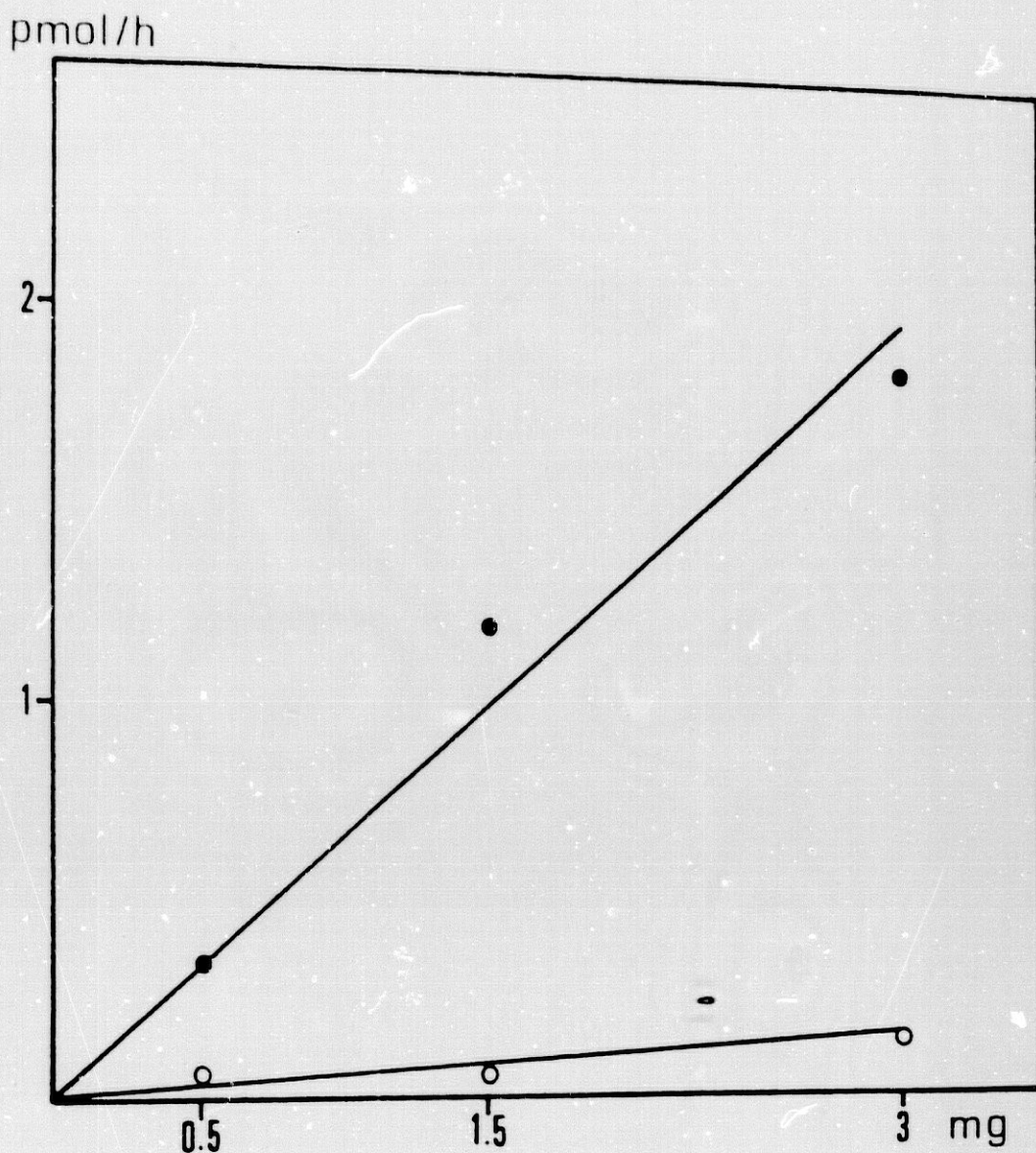


FIG. 17. VARIACION DE LA FORMACION DE DHT Y ADIOLES RESPECTO DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS EN PROSTATA. DISTINTAS CONCENTRACIONES DE PROTEINAS INCUBADAS CON $^3\text{H-T}$ 2 nM A 37°C DURANTE 60 MINUTOS. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA COMO PMOL DE DHT Y ADIOLES FORMADOS / HORA. (●) DHT Y (○) ADIOLES.

3. METABOLISMO DE LA TESTOSTERONA EN HOMOGENIZADO DE CUERO CABELLUDO ALOPECICO:

La Fig. 18 nos muestra un radiocromatograma tipo del metabolismo de la testosterona en cuero cabelludo alopecico. En él observamos únicamente la aparición de DHT. En ciertas biopsias obtuvimos también androstendiona, aunque esto sucedia muy esporádicamente.

En la Fig. 19, se observa la formación de DHT en función del tiempo de incubación, manteniéndose la reacción prácticamente lineal hasta los 30 minutos. En las experiencias sucesivas, las incubaciones se realizaron durante 30 minutos.

La Fig. 20 representa la formación de DHT en función de la concentración de proteínas. En ella se observa la linealidad de la reacción cuando se utilizan concentraciones de proteínas comprendidas entre 100 y 400 μg . Estas experiencias fueron realizadas a una concentración de $^3\text{H-T}$ de 25 μM .

La Fig. 21 es una representación de la formación de DHT al variar las concentraciones de $^3\text{H-T}$ de 5 a 100 μM . Como se ve, el enzima empieza a saturarse a partir de una concentración de 50 μM .

La Fig. 22 es una representación de Lineweaver-Burk de los resultados de la figura anterior. De dicha representación se obtiene un valor de V_{max} de 7.2 nmol/mg/h y una K_M de 12.5×10^{-6} M. ($y = 3.46x + 0.29$; $r = 0.9962$).

Puesto que se han realizado estas experiencias en cuero cabelludo alopecico, de 10 pacientes, mostrando todos ellos unas características cinéticas similares, la Tabla 2 nos muestra las medias de los valores obtenidos para las V_{max} y K_M , siendo éstos de 7.5 ± 2.4 nmol/mg/h y de $(18.8 \pm 12) \times 10^{-6}$ M respectivamente. Como se observa, hay unas grandes desviaciones standard, que son debidas a la gran variabilidad de actividad enzimática que presenta cada paciente.

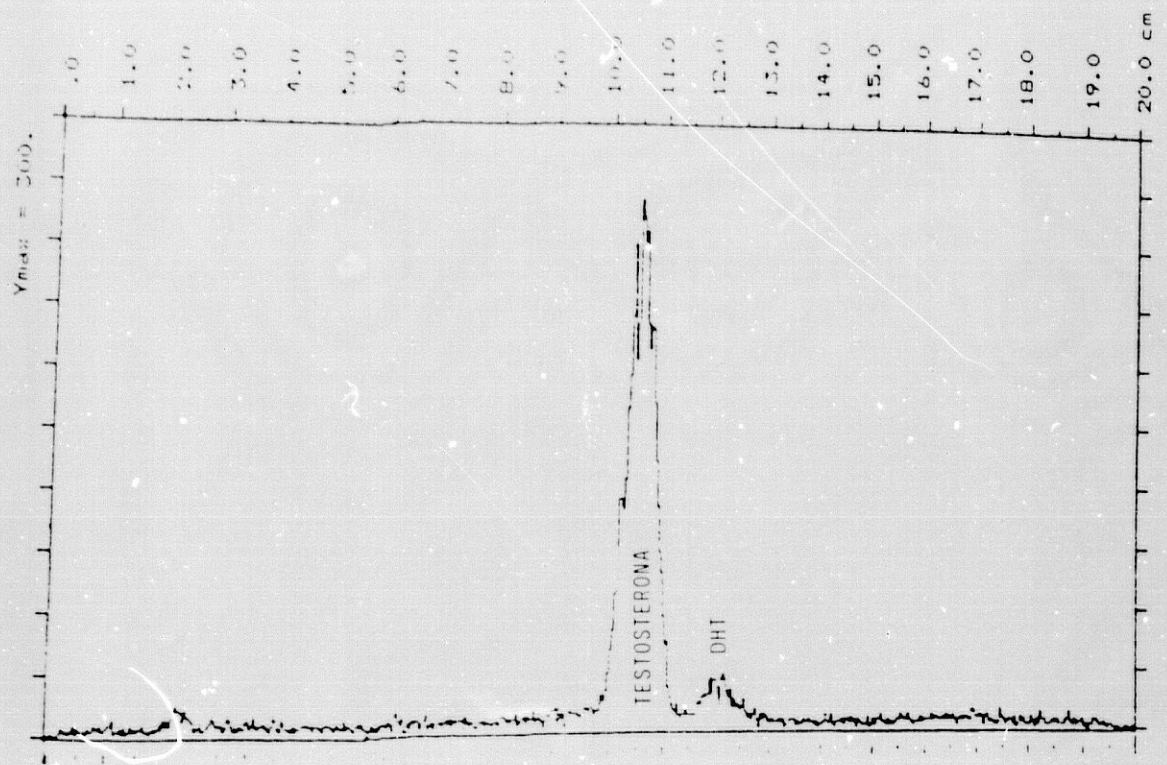


FIG. 18. RADIOCROMATOGRAMA TIPO DEL METABOLISMO DE LA ³H-T EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO.

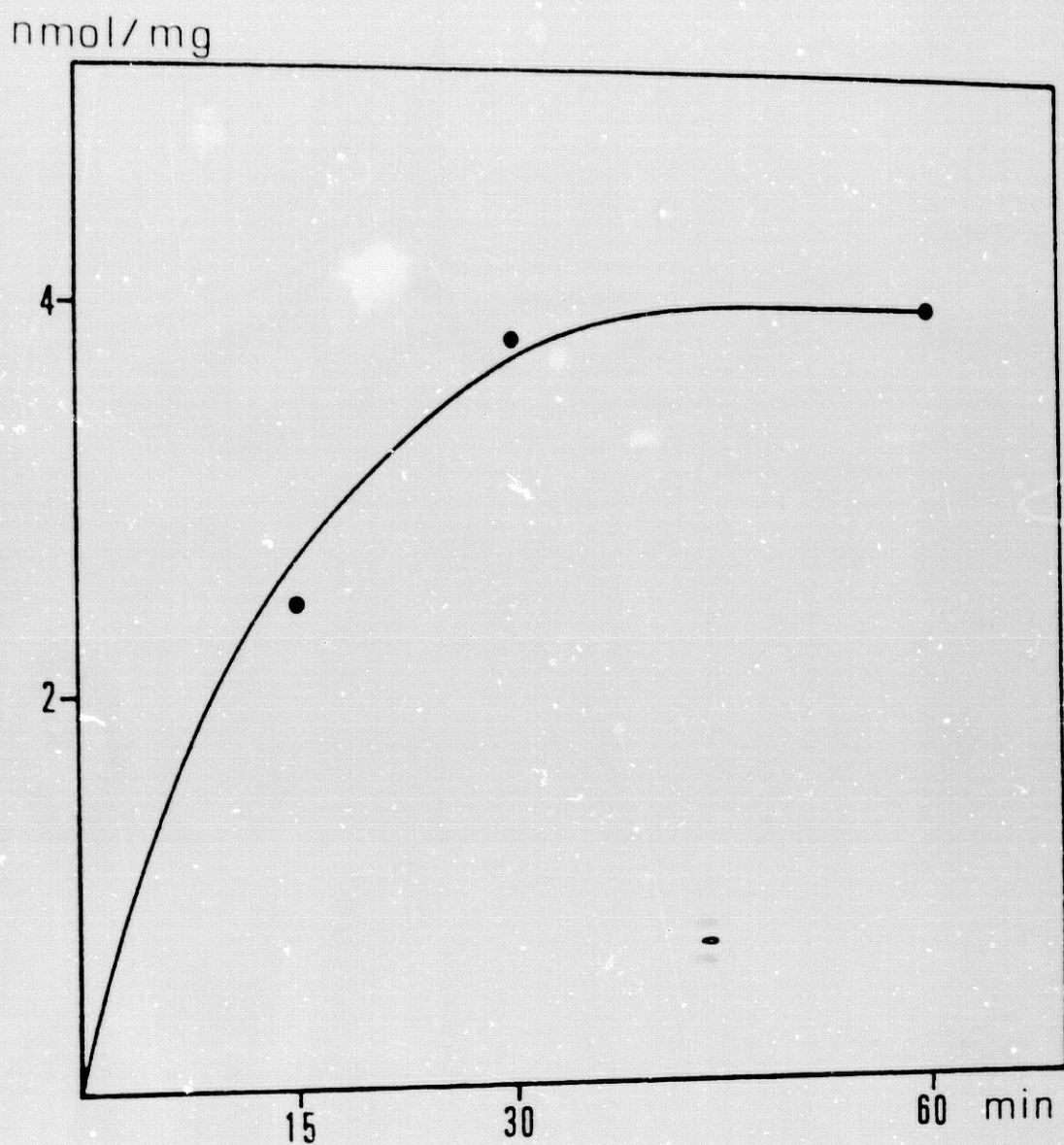


FIG. 19. VARIACION DE LA FORMACION DE DHT RESPECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO. 0.2 mg DE PROTEINAS INCUBADOS CON $^3\text{H-T}$ 25 μM A 37°C A TIEMPOS VARIABLES. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA COMO nmOL DE DHT FORMADA / mg DE PROTEINA.

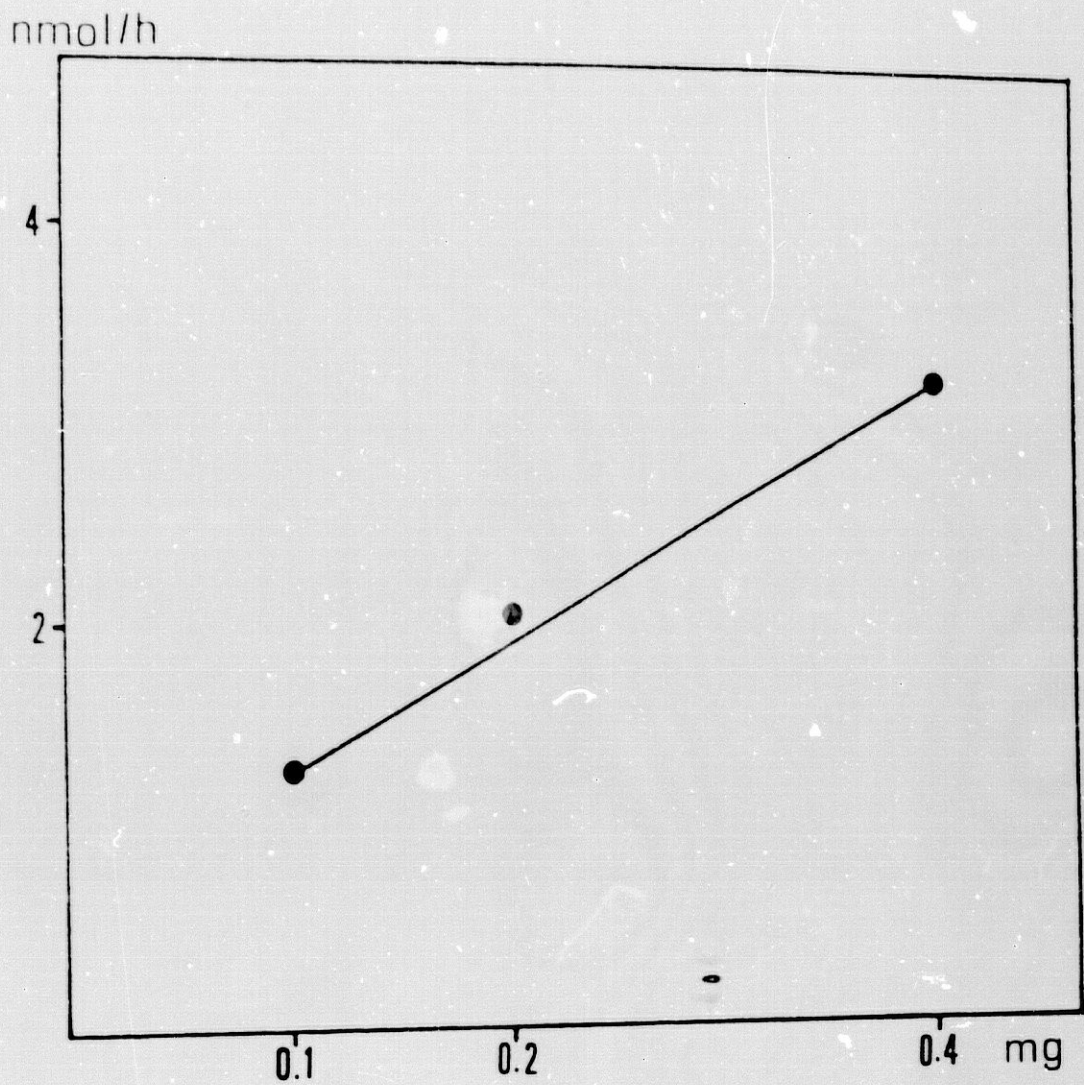


FIG. 20. VARIACION DE LA FORMACION DE DHT RESPECTO DE LA CONCENTRACION PROTEICA EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO. DISTINTAS CONCENTRACIONES DE PROTEINAS INCUBADAS CON $^3\text{H-T}$ 25 μM A 37°C DURANTE 30 MINUTOS. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA COMO nmOL DE DHT FORMADA / HORA.

nmol/mg/h

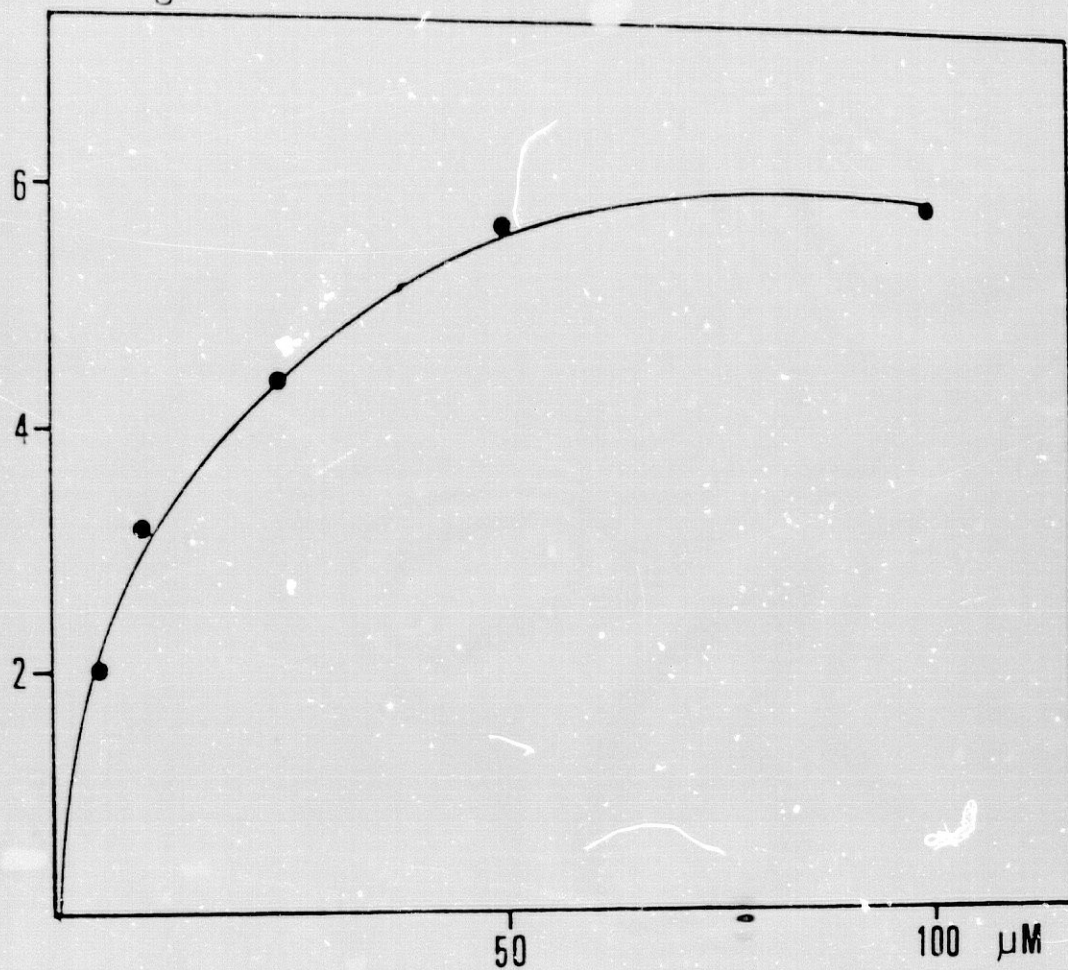


FIG. 21. VARIACION DE LA FORMACION DE DHT RESPECTO DE LA CONCENTRACION DE ³H-T EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO. 0.2 mg DE PROTEINAS INCUBADOS A 37°C DURANTE 30 MINUTOS CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ³H-T. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA EN nMOL DE DHT FORMADA / mg DE PROTEINA / HORA.

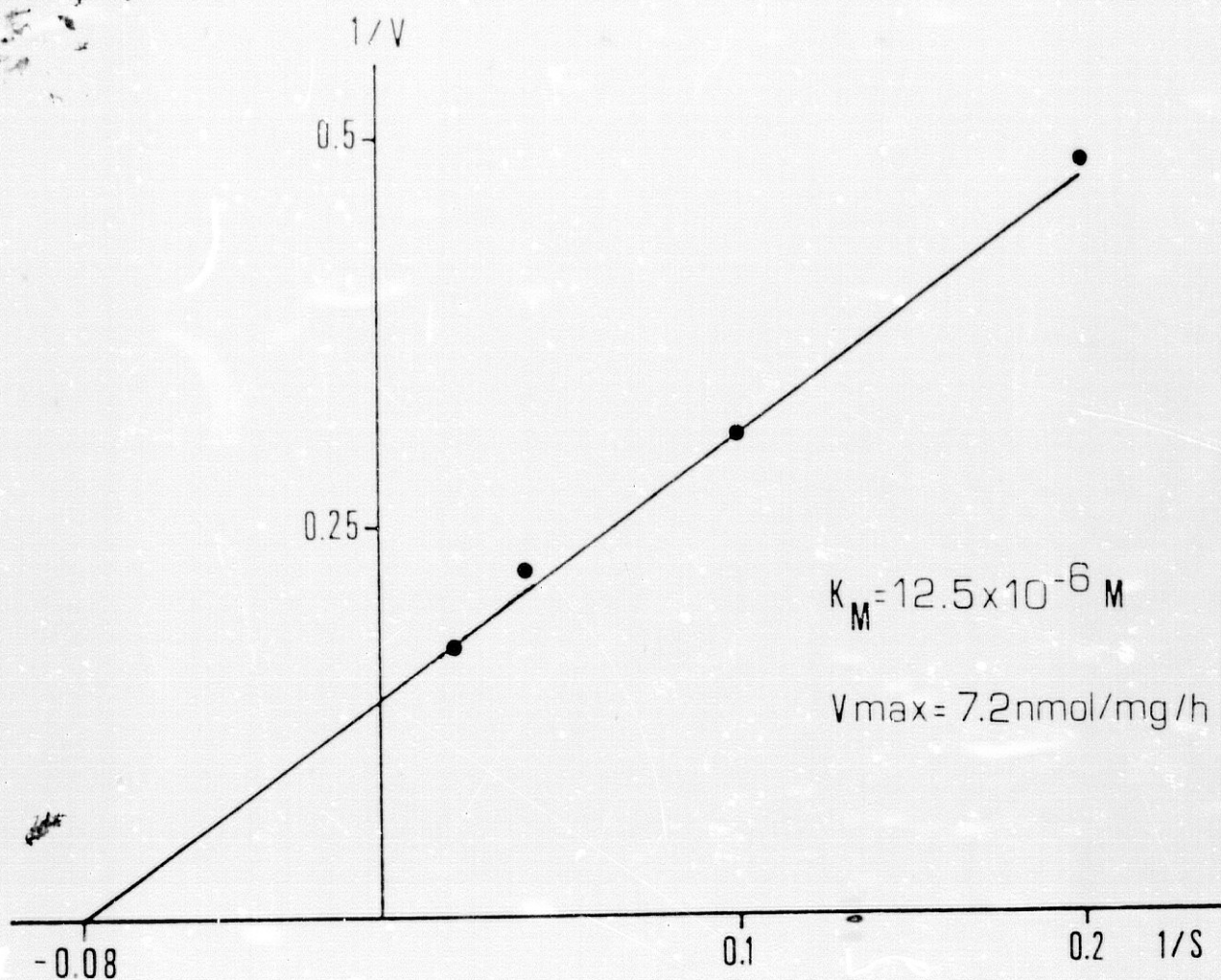


FIG. 22. REPRESENTACION DE LINEWEAVER-BURK DE LOS RESULTADOS DE LA FIGURA ANTERIOR (FIG. 21). EN ORDENADAS: INVERSO DE LA ACTIVIDAD DE FORMACION DE DHT, EXPRESADO EN $\text{nMOL / mg / HORA}^{-1}$. EN ABSCISAS: INVERSO DE LA CONCENTRACION DE $^3\text{H-T}$, EXPRESADO EN μM^{-1} .

Vmax	7.5±2.4 nmol/mg/h
K _M	(18.8±12)×10 ⁻⁶ M

TABLA 2. MEDIAS DE LOS VALORES DE LAS Vmax Y K_M DE LA 5α-R OBTENIDAS EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO (n = 10).

4. COMPARACION DEL METABOLISMO DE LA TESTOSTERONA ENTRE LAS ZONAS ALOPECICA Y NO ALOPECICA DE CUERO CABELLUDO:

Este estudio se ha realizado en siete pacientes, estudiando en cada uno de ellos el metabolismo de la $^3\text{H-T}$ en las zonas alopecica y no alopecica.

La concentración de $^3\text{H-T}$ utilizada en este estudio, fue de 4 nM.

4.1. FORMACION DE DHT.

Los valores de la actividad $5\alpha\text{-R}$, expresada como formación de DHT en la zona alopecica, oscilan entre 0.24 y 0.64, con un valor medio de 0.4 ± 0.12 , cuando los expresamos en pmol/mg de proteína/h. Si expresamos los resultados en pmol/g de tejido/h, los valores oscilan entre 2.2 y 5, con un valor medio de 3.4 ± 0.8 , en la zona alopecica.

En la zona no alopecica, los valores oscilan entre 0 y 0.42, con un valor medio de 0.22 ± 0.10 , todo ello expresado en pmol/mg de proteína/h. Expresados en pmol/g de tejido/h, dichos valores oscilan entre 0 y 2.2, con un valor medio de 1.50 ± 0.6 .

Ya que los resultados expresados en pmol/g de tejido/h, son los que permiten homogenizar más los resultados de una y otra zona, para llevar a cabo los estudios estadísticos, hemos utilizado dichos datos. En este sentido, entre la zona alopecica y no alopecica de cuero cabelludo, existe una diferencia significativa en la formación de DHT ($p < 0.05$).

Estos resultados finales están representados en la Fig. 23.

4.2. FORMACION DE ANDROSTENDIONA:

En este estudio se valora la actividad de la 17β -HSOR, expresada como formación de androstendiona. En este caso observamos que sólo aparecía androstendiona en tres biopsias de la zona no alopecica, siendo siete el número total de biopsias utilizadas; en ninguna de las biopsias de la zona alopecica se obtuvo androstendiona.

En la zona no alopecica, los valores oscilan entre 11.2 y 13, con un valor medio de 12 ± 0.7 pmol/g de tejido/h.

pmol / g / h

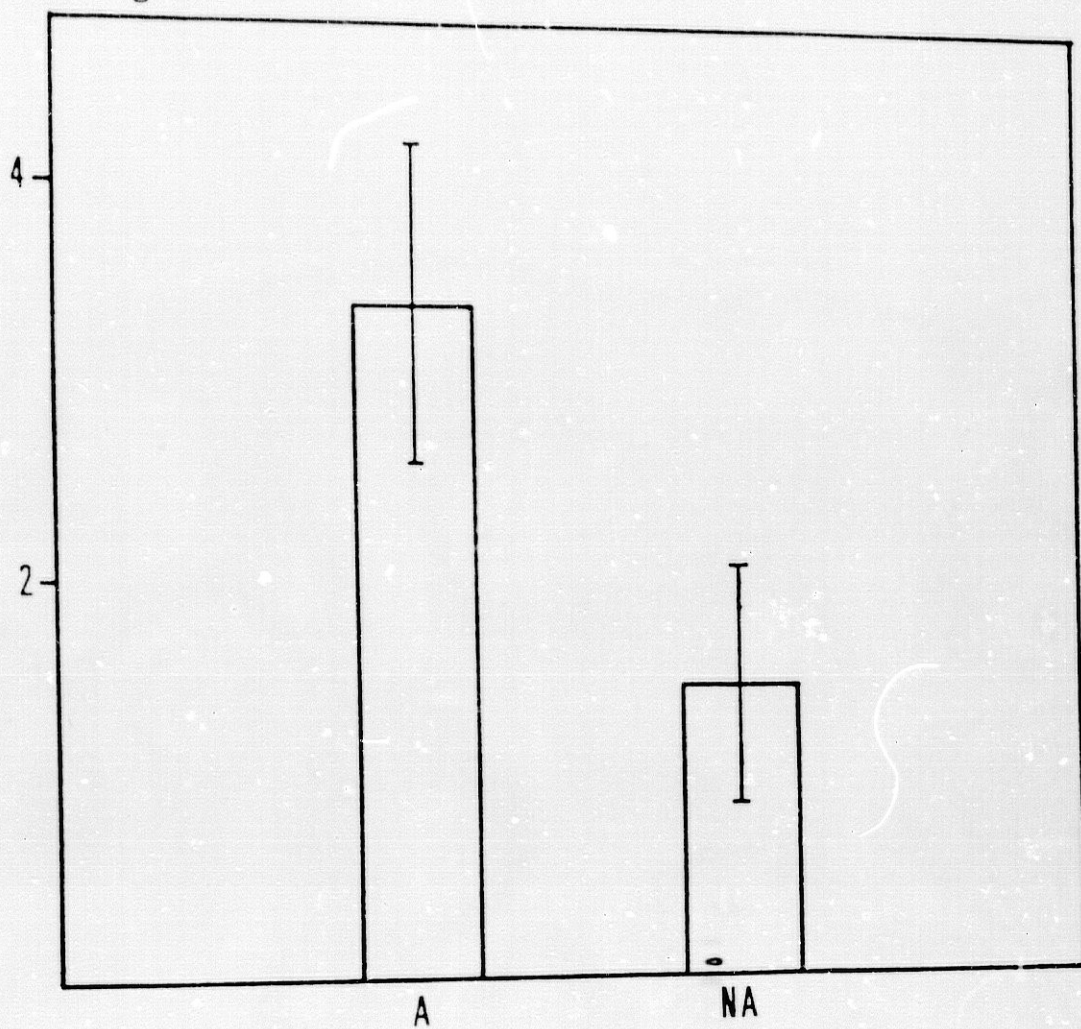


FIG. 23. COMPARACION ENTRE LAS ZONAS ALOPECICA Y NO ALOPECICA DE CUERO CABELLUJO RESPECTO DE LA FORMACION DE DHT. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA COMO PMOL DE DHT / g DE TEJIDO / HORA. LA INCUBACION SE REALIZA DURANTE 30 MINUTOS, UTILIZANDOSE UNA CONCENTRACION DE $^3\text{H-T}$ DE 4 nM. A: ZONA ALOPECICA (n = 7); NA: ZONA NO ALOPECICA (n = 7).

pmol/g/h

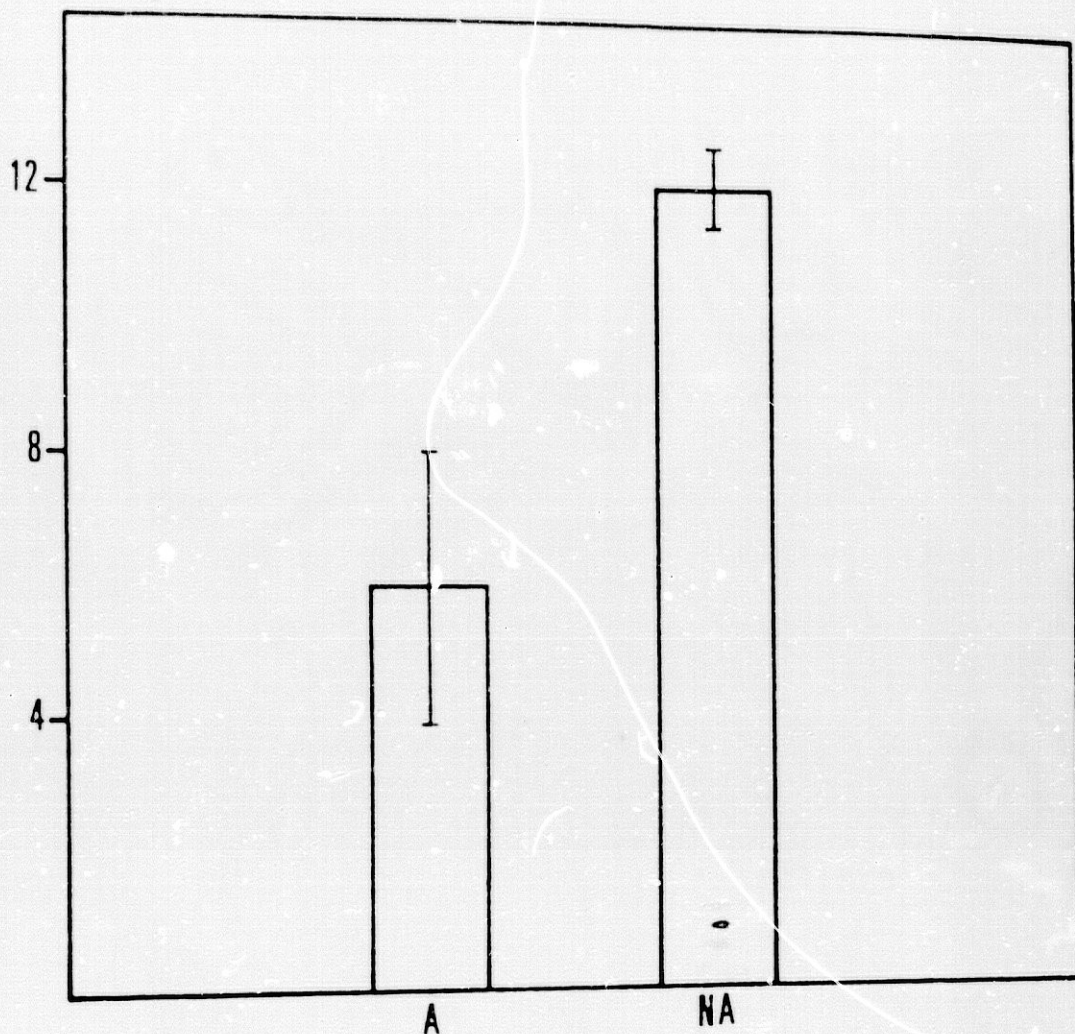


FIG. 24. COMPARACION ENTRE LAS ZONAS ALOPECICA Y NO ALOPECICA DE CUERO CABELLUDO RESPECTO DE LA FORMACION DE ANDROSTENDIONA. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA COMO PMOL DE ANDROSTENDIONA FORMADOS / g DE TEJIDO / HORA. LA INCUBACION SE REALIZA DURANTE 30 MINUTOS, UTILIZANDOSE UNA CONCENTRACION DE $^3\text{H-T}$ DE 4 nM. A: ZONA ALOPECICA (n = 8); NA: ZONA NO ALOPECICA (n = 3).

Si comparamos estos valores con los de biopsias de la zona alopecica, obtenidas de otros pacientes en los que se formaba androstendiona, cuyos valores oscilan entre 3.4 y 10, con un valor medio de 6 ± 2.2 pmol/g de tejido/h, obtenemos una diferencia significativa entre las dos zonas estudiadas ($p < 0.05$). El número de biopsias de la zona alopecica, utilizadas en este estudio comparativo, es de ocho.

Estos resultados están recogidos en la Fig. 24.

5. METABOLISMO DE LA DHT EN HOMOGENIZADO DE CUERO CABELLUDO:

La Fig. 25, representa el radiocromatograma tipo del metabolismo de la ^3H -DHT en cuero cabelludo alopecico. En él se observa la formación de 3α -Adiol y de 3β -Adiol. En algunas biopsias también se obtenía androstendiona.

En la Fig. 26 se representa la formación de Adioles en función del tiempo de incubación, observándose que la reacción es lineal hasta los 60 minutos estudiados. En las experiencias sucesivas el tiempo de incubación fue de 60 minutos.

La Fig. 27 nos muestra la formación de Adioles en función de la concentración de proteínas, presentando la reacción una linealidad hasta los 400 μg , máxima concentración utilizada en nuestros experimentos.

Hemos estudiado también, la influencia que tiene la concentración del cofactor (NADPH) en la formación de Adioles. Como se observa en la Fig. 28, dicha formación es máxima a partir de 0.5 mM; siendo esta concentración la utilizada en nuestros experimentos.

En la Fig. 29 queda reflejada la variación de la formación de Adioles respecto a la concentración utilizada de ^3H -DHT. Como se aprecia en la figura, el enzima comienza a saturarse a 100 μM . En el resto de nuestras experiencias, la concentración de ^3H -DHT utilizada fue de 50 μM .

La Fig. 30 es una representación de Lineweaver-Burk de los resultados de la figura anterior. De dicha representación se obtienen una V_{max} de 12 nmol/mg de proteína/h y una K_M de 17.5×10^{-6} M. ($y = 1.464x + 0.087$; $r = 0.9800$).

Puesto que estas experiencias se han realizado en cuero cabelludo alopecico de ocho pacientes, la Tabla 3 nos muestra las medias de los valores obtenidos para las V_{max} y K_M , siendo estos valores de 15 ± 4.5 nmol/mg de proteína/h y de $(24 \pm 9) \times 10^{-6}$ M respectivamente.

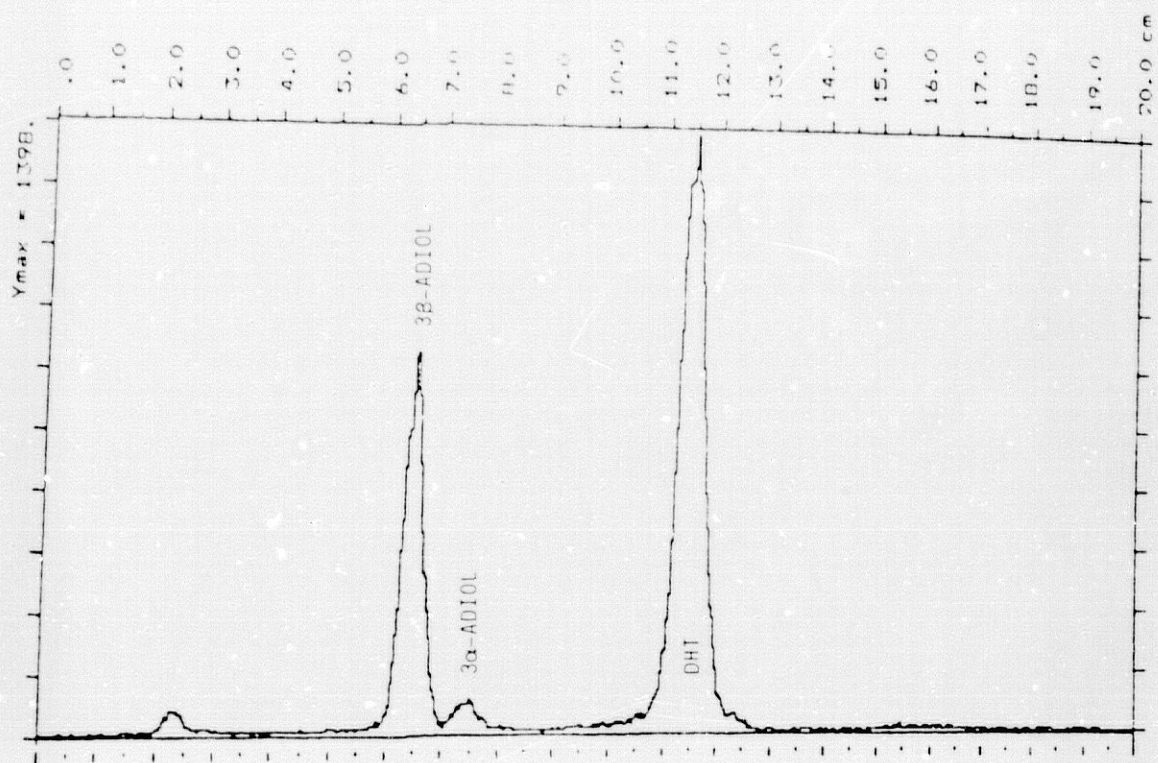


FIG. 25. RADIOCROMATOGRAMA TIPO DEL METABOLISMO DE LA ^3H -DHT EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO.

nmol/mg

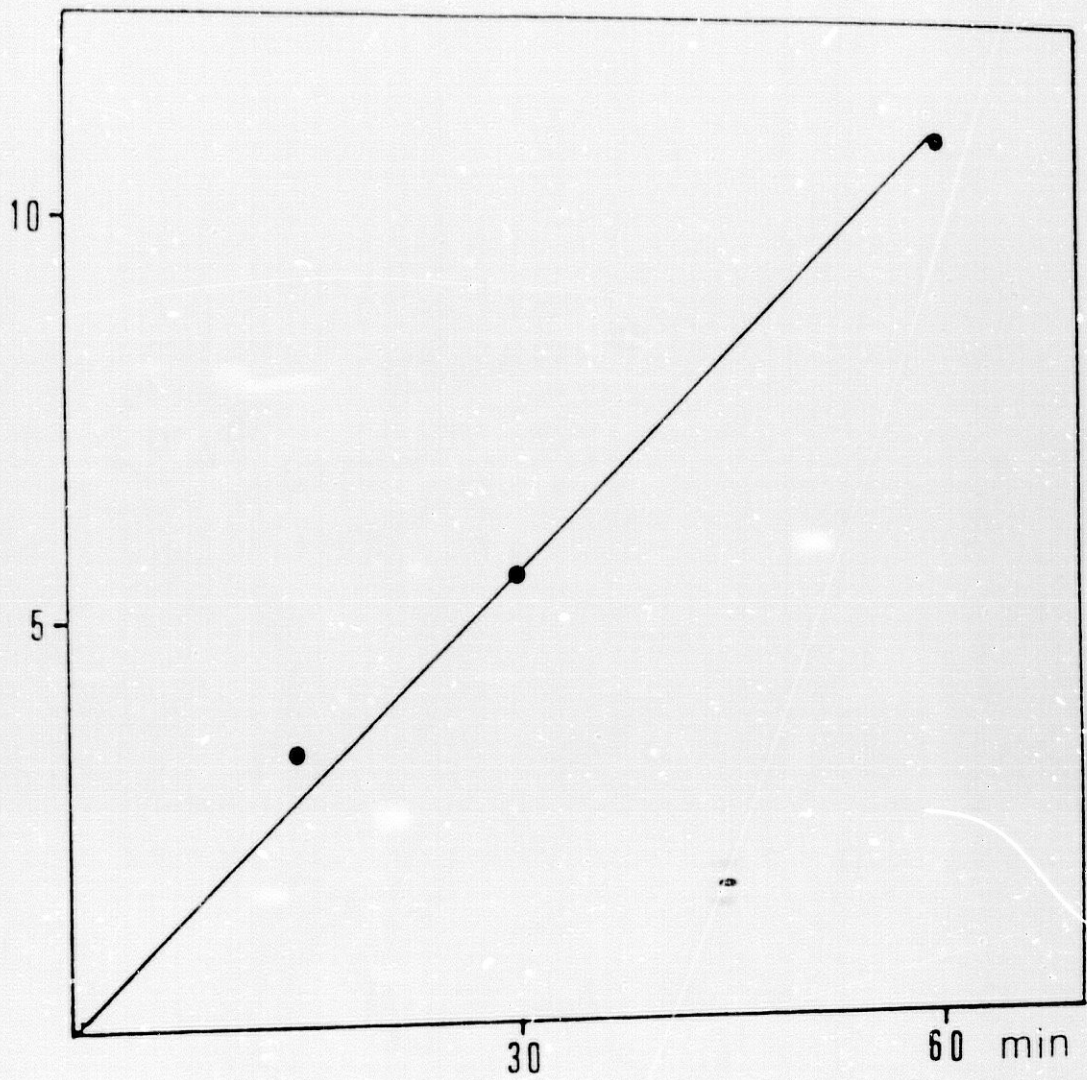


FIG. 26. VARIACION DE LA FORMACION DE ADIOLES EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO RESPECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION. 0.2 mg DE PROTEINAS INCUBADOS CON ^3H -DHT 50 μM A 37°C A TIEMPOS VARIAB.ES. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA COMO nMOL DE ADIOLES FORMADOS / mg DE PROTEINA.

nmol/h

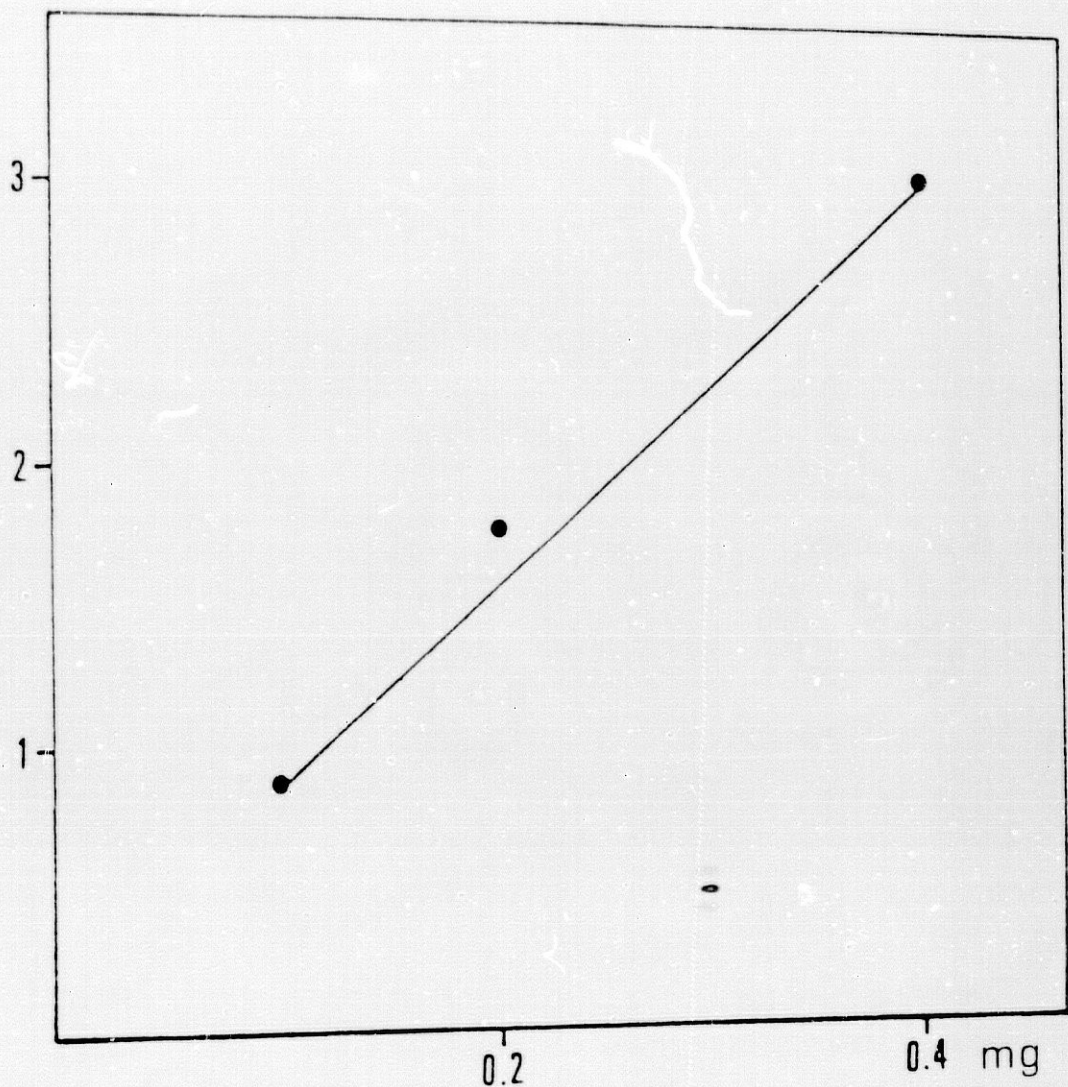


FIG. 27. VARIACION DE LA FORMACION DE ADIOLES EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO RESPECTO DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS. DISTINTAS CONCENTRACIONES DE PROTEINAS INCUBADAS CON ^3H -DHT $50 \mu\text{M}$ A 37°C DURANTE 60 MINUTOS. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA COMO nmOL DE ADIOLES FORMADOS / HORA.

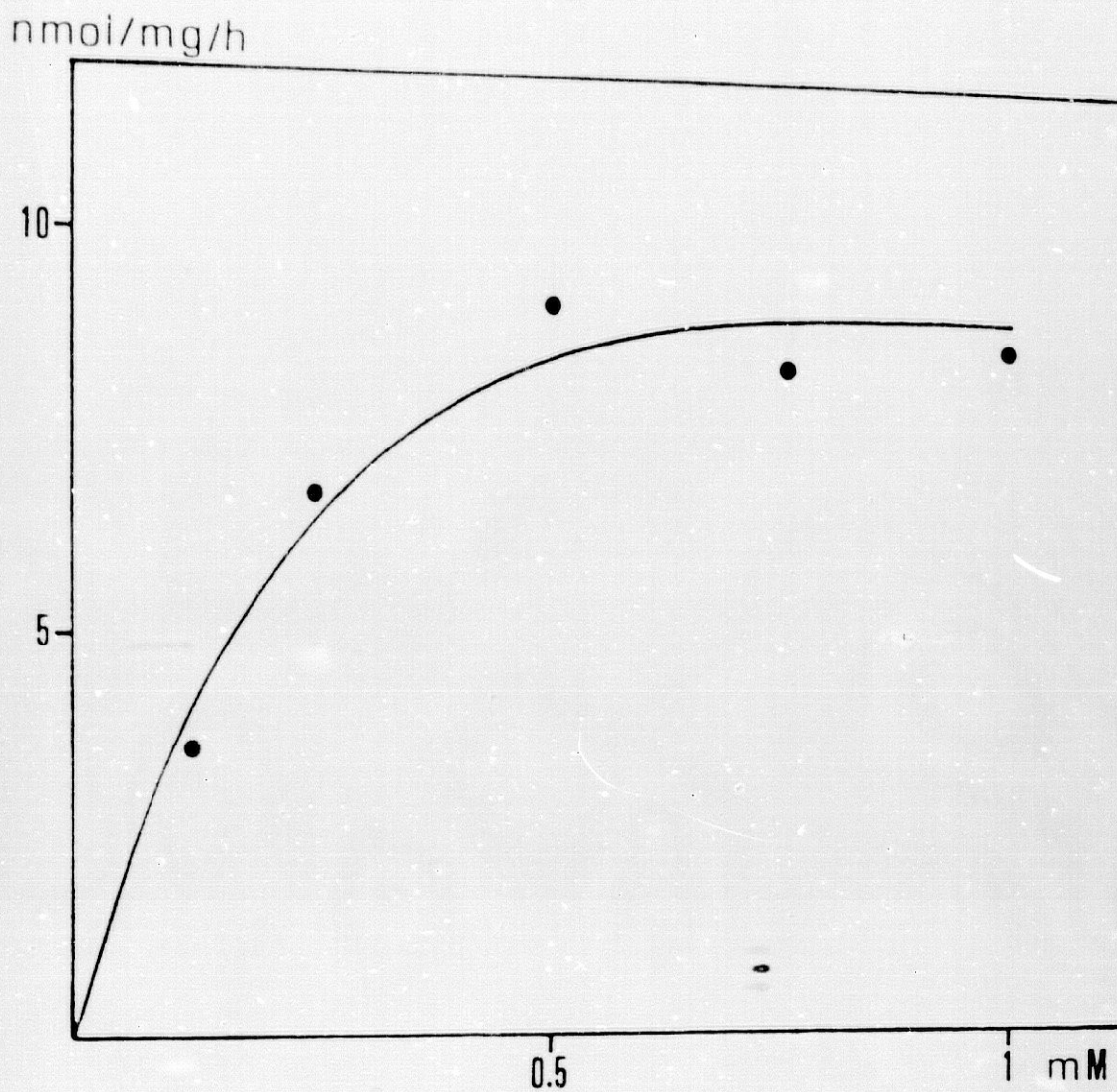


FIG. 28. VARIACION DE LA FORMACION DE ADIOLES EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO RESPECTO DE LA CONCENTRACION DE NADPH. 0.2 mg DE PROTEINAS INCUBADOS CON ^3H -DHT 50 μM A 37°C DURANTE 60 MINUTOS CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE NADPH. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA COMO nmol DE ADIOLES FORMADOS / mg DE PROTEINA / HORA.

nmol / mg / h

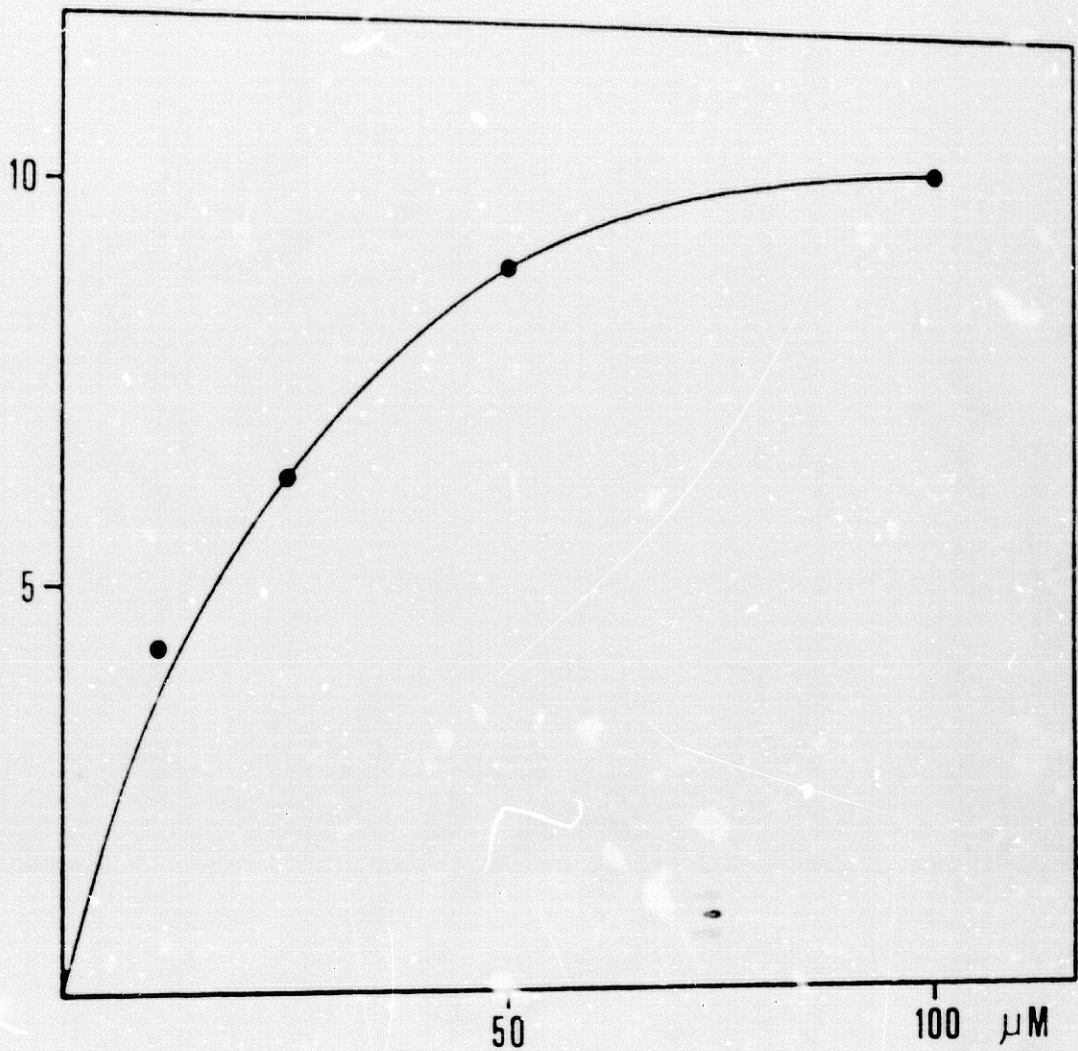


FIG. 29. VARIACION DE LA FORMACION DE ADIOLES EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO RESPECTO DE LA CONCENTRACION DE ³H-DHT. 0.2 mg DE PROTEINAS INCUBADOS A 37°C DURAN 60 MINUTOS CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ³H-DHT. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA EN nmOL DE ADIOLES FORMADOS / mg DE PROTEINA / HORA.

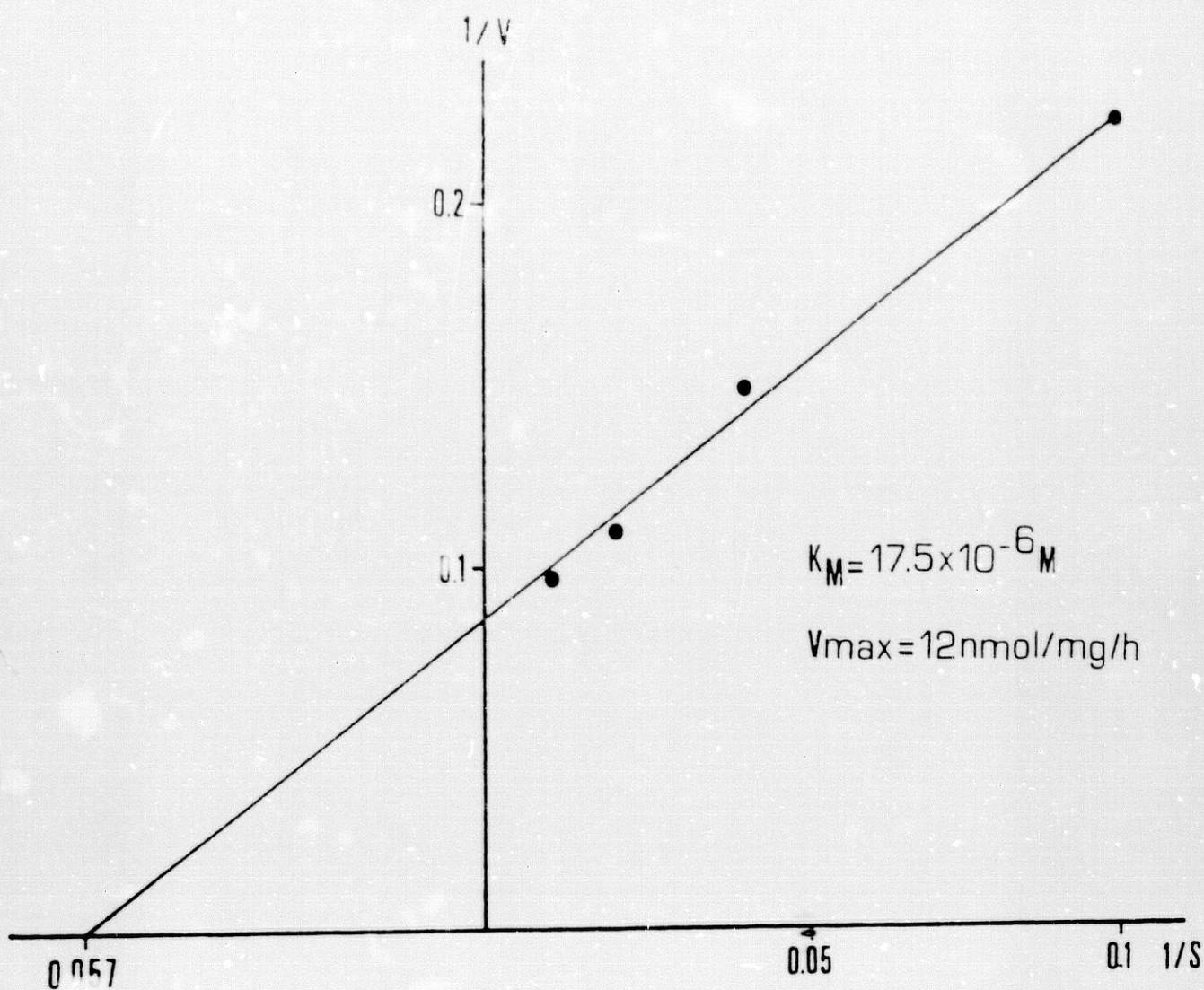


FIG. 30. REPRESENTACION DE LINEWEAVER-BURK DE LOS RESULTADOS DE LA FIGURA ANTERIOR (FIG. 29). EN ORDENADAS: INVERSO DE LA ACTIVIDAD DE FORMACION DE ADIOLES, EXPRESADO EN $\text{nMOL / mg / HORA}^{-1}$. EN ABCISAS: INVERSO DE LA CONCENTRACION DE $^3\text{H-DHT}$, EXPRESADO EN μM^{-1} .

V _{max}	15 ± 4.5 nmol/mg/h
K _M	(24 ± 9) x 10 ⁻⁶ M

TABLA 3. MEDIAS DE LOS VALORES DE LAS V_{max} Y K_M DE LA 3α(β)-HSOR OBTENIDAS EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO (n = 8).

En esta tabla se observan las grandes desviaciones standard, que presentan ambos parámetros, debidas a la gran variación enzimática que hay entre cada una de nuestras biopsias.

En la mayoría de las biopsias encontramos que el 3β -Adiol era el único metabolito. No obstante, en otras biopsias, distintas a las anteriores, encontramos que también se formaba 3α -Adiol. En aquellos casos en los que obteníamos ambos isómeros, la proporción de 3β -Adiol formado fue del $80 \pm 6.2 \%$ y la del 3α -Adiol formado fue del $20 \pm 6.2 \%$, expresada respecto del total de Adicles formados ($n=6$). Este porcentaje, queda reflejado en la Fig. 31.

6. COMPARACION DEL METABOLISMO DE LA DHT ENTRE LAS ZONAS ALOPECICA Y NO ALOPECICA DE CUERO CABELLUDO:

Este estudio se ha realizado en siete pacientes, estudiando en cada uno de ellos el metabolismo de la ^3H -DHT en la zona alopecica y no alopecica.

La concentración de ^3H -DHT utilizada en este estudio fue de 4 nM.

6.1. FORMACION DE ADIOLES:

En este estudio se valora la actividad de la $3\alpha(\beta)$ -HSOR, expresada como formación de Adioles.

Los valores medios obtenidos de Adioles en la zona alopecica y no alopecica, fueron de 1.3 ± 0.2 y 1.1 ± 0.5 pmol/mg de proteina/hora respectivamente, variando estos valores de 1 a 1.7 en la zona alopecica y de 0.5 a 1.8 en la zona no alopecica. Si los resultados los expresamos en pmol/g de tejido/hora, los valores oscilan entre 8.8 y 17.2, con un valor medio de 12.4 ± 2.6 en la zona alopecica, y entre 4.6 y 12.1 con un valor medio de 8.4 ± 2.7 en la zona no alopecica. Utilizando estos últimos resultados para nuestro estudio estadístico, resulta una diferencia significativa entre ambas zonas para la formación de Adioles ($p < 0.05$).

Estos resultados quedan reflejados en la Fig. 32.

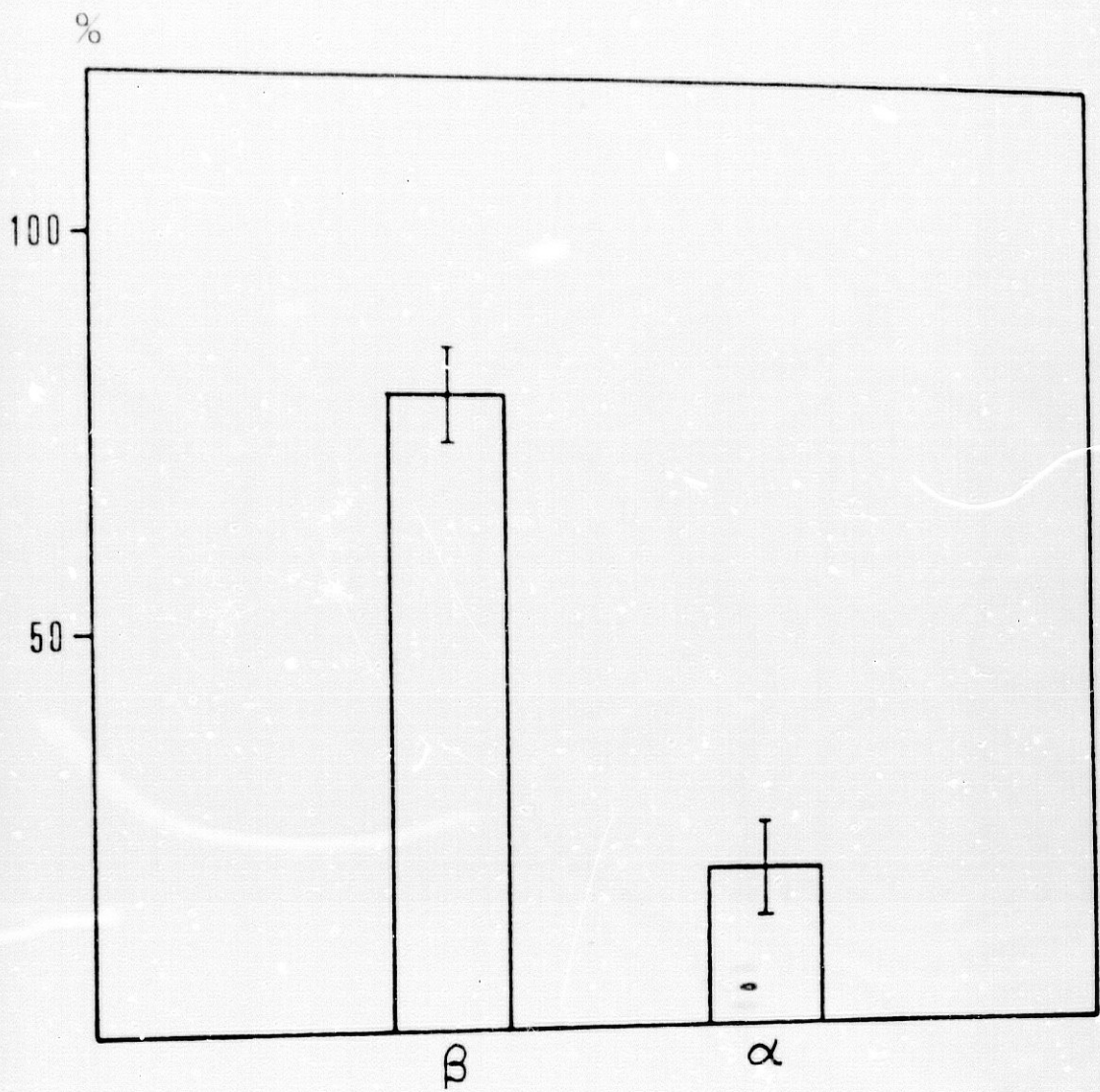


FIG. 31. COMPARACION DE LA FORMACION DE 3α -ADIOL Y DE 3β -ADIOL EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO. EN ORDENADAS: PORCENTAJE DE ADIOLES FORMADOS RESPECTO DEL TOTAL (n = 6).

pmol / g / h

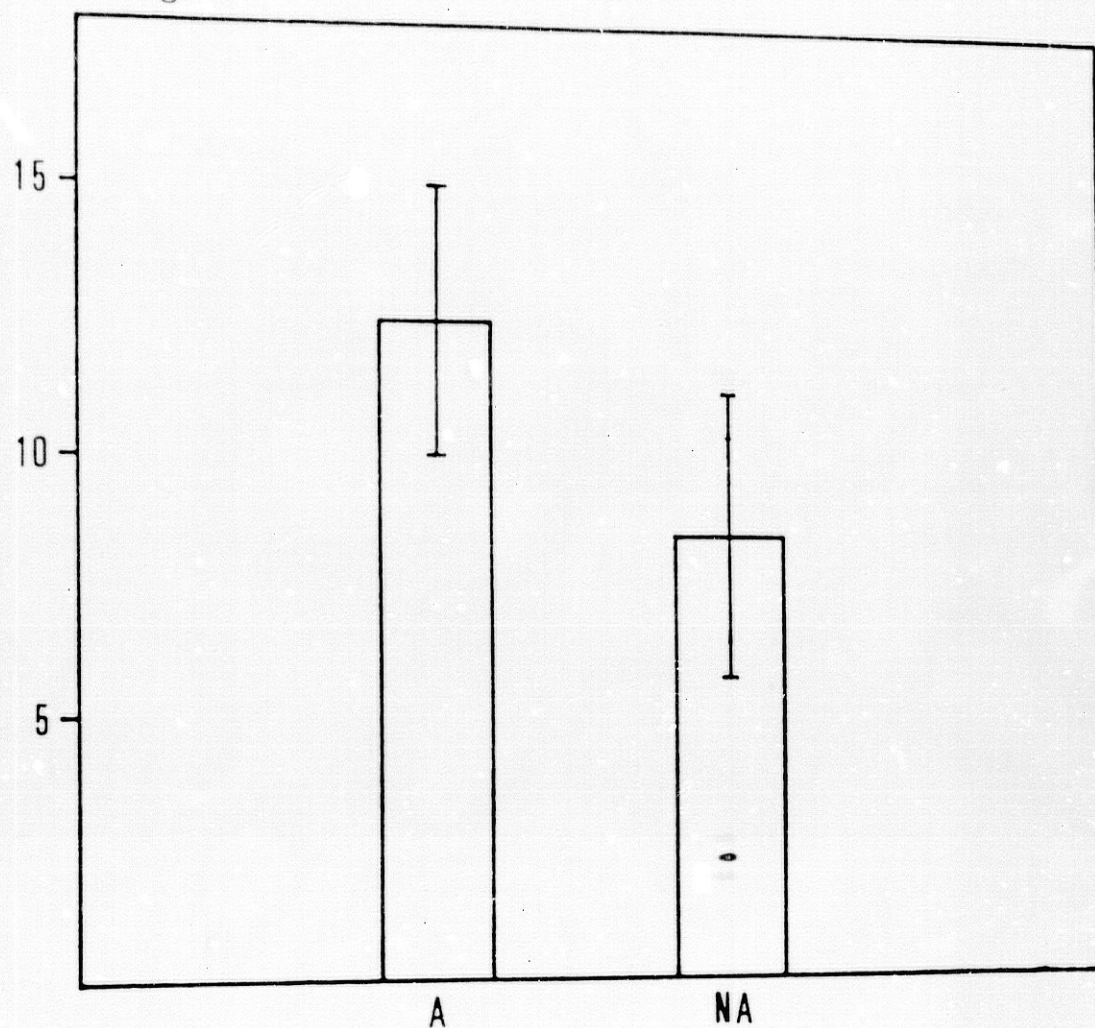


FIG. 32. COMPARACION ENTRE LAS ZONAS ALOPECICA Y NO ALOPECICA DE CUERO CABELLUDO RESPECTO DE LA FORMACION DE ADIOLES. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA COMO PMOL DE ADIOLES FORMADOS / g DE TEJIDO / HORA. LA INCUBACION SE REALIZA DURANTE 60 MINUTOS, UTILIZANDOSE UNA CONCENTRACION DE ^3H -DHT DE 4 nM. A: ZONA ALOPECICA (n = 7); NA: ZONA NO ALOPECICA (n = 7).

6.2. FORMACION DE ANDROSTANDIONA:

En este estudio se valora la actividad enzimática de la 17β -HSOR, expresada como formación de androstandiona.

De las siete biopsias utilizadas en este estudio comparativo, obtuvimos androstandiona en cinco de ellas correspondientes a la zona no alopecica, y en sólo una de las siete correspondientes a la zona alopecica.

En las biopsias que obteniamos androstandiona en las dos zonas, los valores eran de: 5.2 y 15.3 pmol/g de tejido/h, en la zona alopecica y no alopecica respectivamente. Comparando las cinco biopsias en que se formaba androstandiona en la zona no alopecica, con siete biopsias en las que se formaba también androstandiona en la zona alopecica, aunque de distintos pacientes, obteniamos que los valores oscilaban entre 1 y 5, con un valor medio de 2.8 ± 1.4 pmol/g de tejido/h en la zona alopecica, y en la no alopecica oscilan entre 2.3 y 15.3, con un valor medio de 8.1 ± 4.8 pmol/g de tejido/h. Entre ambas zonas existe una diferencia significativa en la formación de androstandiona ($p < 0.05$).

Estos resultados quedan reflejados en la Fig. 33.

pmol / g / h

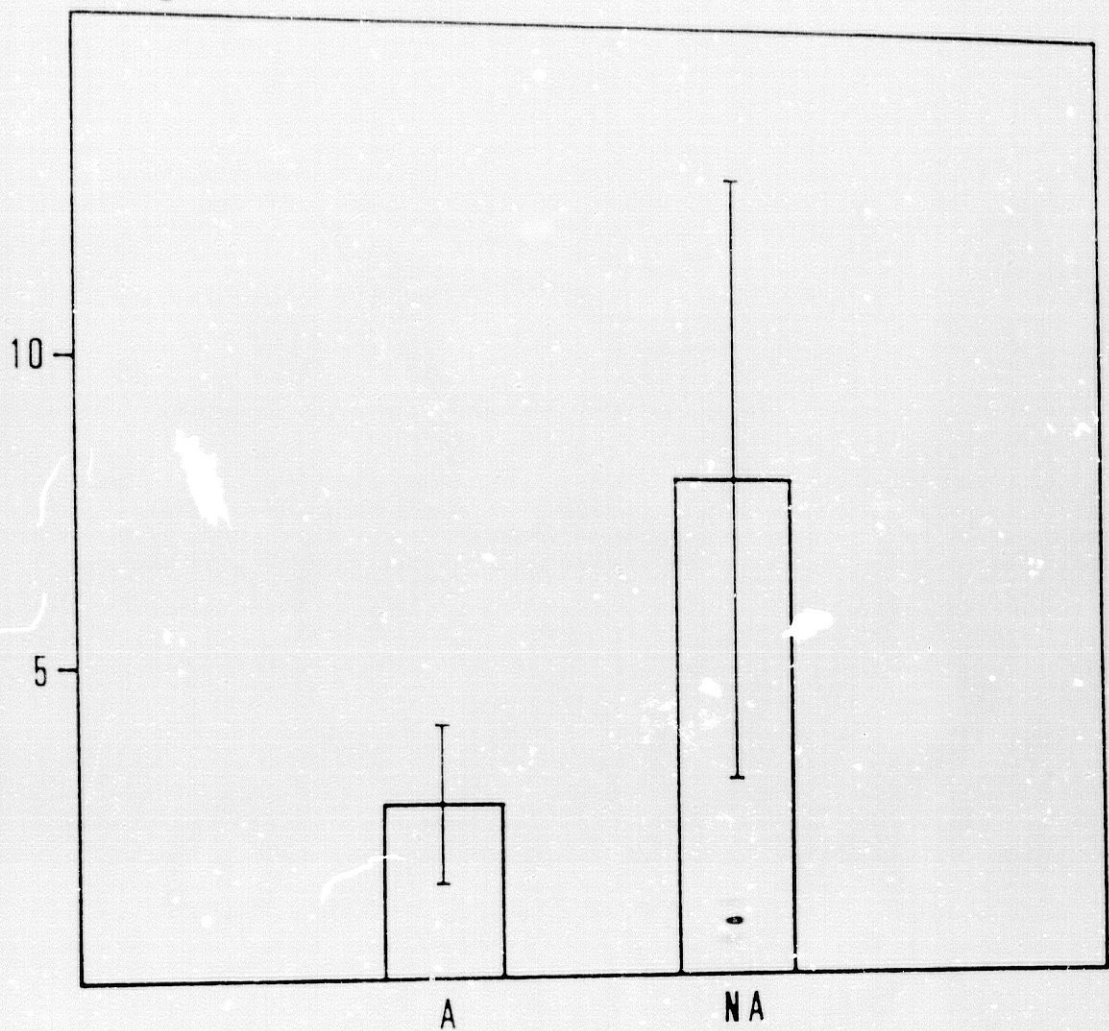


FIG. 33. COMPARACION ENTRE LAS ZONAS ALOPECICA Y NO ALOPECICA DE CUERO CABELLUDO RESPECTO DE LA FORMACION DE ANDROSTANDIONA. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA COMO PMOL DE ANDROSTANDIONA FORMADA / g DE TEJIDO / HORA. LA INCUBACION SE REALIZA DURANTE 60 MINUTOS, UTILIZANDO UNA CONCENTRACION DE ^3H -DHT DE 4 nM. A: ZONA ALOPECICA (n = 7); NA: ZONA NO ALOPECICA (n = 5).

7. INHIBICION DE LA 3 α (β)-HSDR EN LA ZONA ALOPECICA DE CUERO CABELLUDO:

La Fig. 34 es una representación de la formación de Adioles en función de la concentración de $^3\text{H-DHT}$, en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de androstendiona. Como se aprecia en la figura, la androstendiona produce una inhibición enzimática del 80 % al 94 %, a concentraciones comprendidas entre 25 y 200 μM .

En la Fig. 35 se hace una representación de Lineweaver-Burk de los resultados de la figura anterior. En ella se observa una inhibición ~~no~~ competitiva con una K_I de 18×10^{-6} M.

La Fig. 36 representa la inhibición del enzima por la indometacina, cuyas concentraciones varían entre 0.25 y 1 mM, en función de la concentración de $^3\text{H-DHT}$. Como se observa en la figura, la indometacina produce una inhibición del 65 % al 87 % según la concentración utilizada.

La Fig. 37 es una representación de Lineweaver-Burk de los resultados de la figura anterior. De dicha representación se obtiene una K_I de 6×10^{-5} M, resultando la inhibición no competitiva.

pmol/mg/h

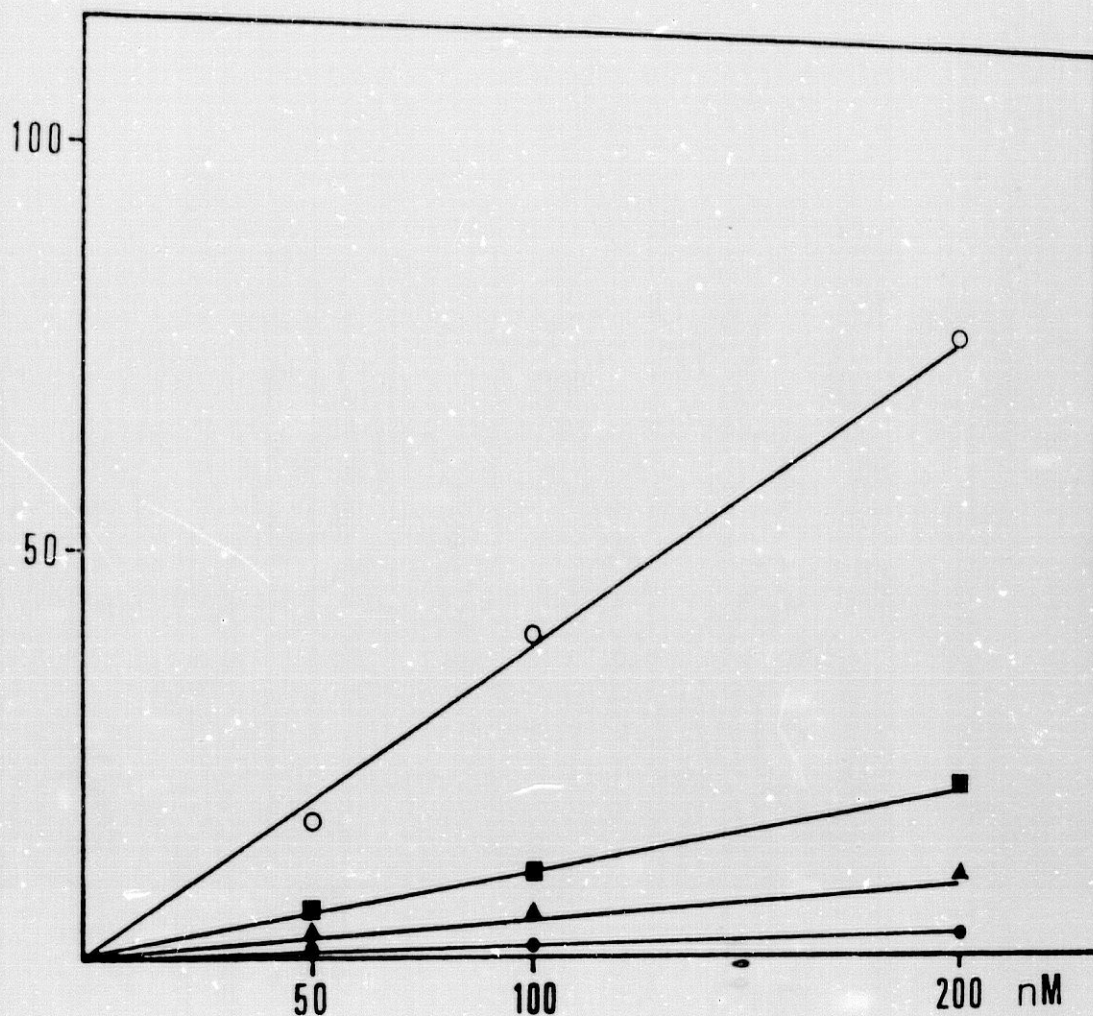


FIG. 34. VARIACION DE LA FORMACION DE ADIOLES EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO RESPECTO DE LA CONCENTRACION DE $^3\text{H-DHT}$, A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ANDROSTENDIONA. 0.2 mg DE PROTEINAS INCUBADOS A 37°C DURANTE 60 MINUTOS CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE $^3\text{H-DHT}$, EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE ANDROSTENDIONA. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA COMO PMOL DE ADIOLES FORMADOS / mg DE PROTEINA / HORA. CONCENTRACIONES DE ANDROSTENDIONA: (○) 0 μM ; (■) 25 μM ; (▲) 50 μM Y (●) 200 μM .

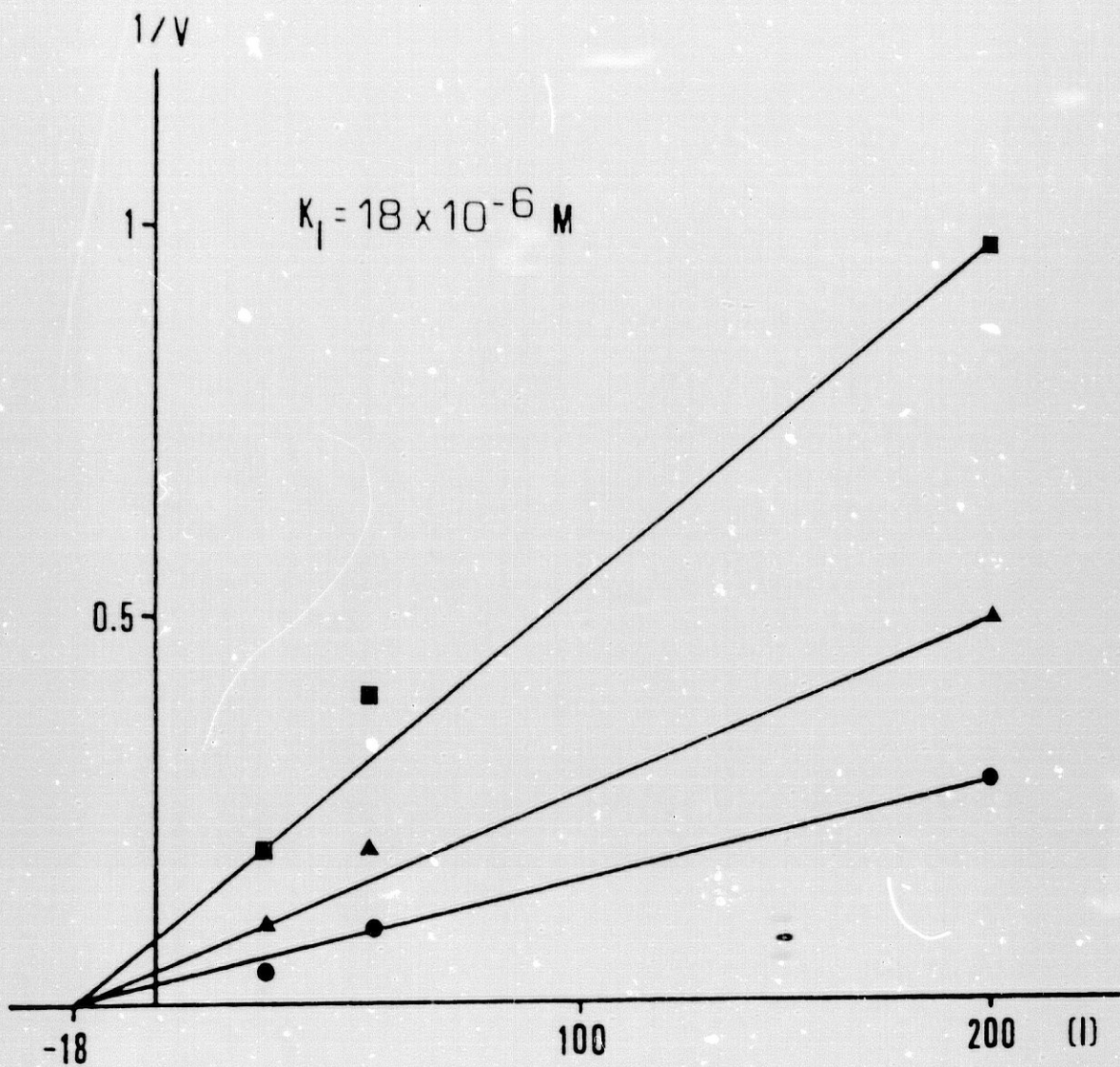


FIG. 35. REPRESENTACION DE LINEWEAVER-BURK DE LOS RESULTADOS DE LA FIGURA ANTERIOR (FIG. 34). EN ORDENADAS: INVERSO DE LA ACTIVIDAD DE FORMACION DE LOS ADIOLES, EXPRESADO EN $\text{PMOL} / \text{mg} / \text{HORA}^{-1}$. EN ABSCISAS: CONCENTRACION DE ANDROSTENDIONA EN μM .
 CONCENTRACIONES DE DHT: (■) 200 nM; (▲) 100 nM Y (●) 50 nM

pmol/mg/h

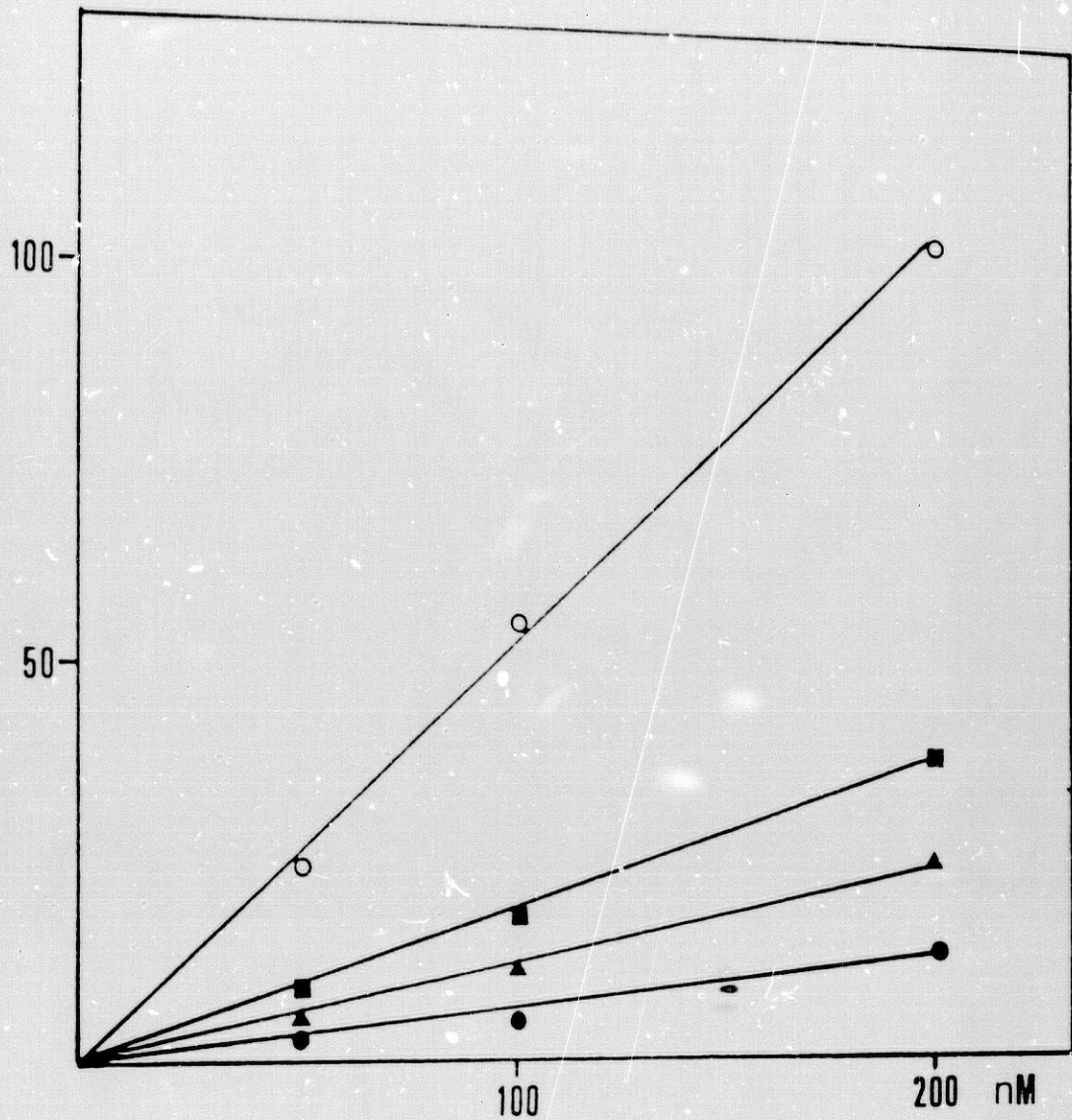


FIG. 36. VARIACION DE LA FORMACION DE ADIOLES EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO RESPECTO DE LA CONCENTRACION DE $^3\text{H-DHT}$, A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE INDOMETACINA. 0.2 mg DE PROTEINAS INCUBADOS A 37°C DURANTE 60 MINUTOS CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE $^3\text{H-DHT}$, EN AUSENCIA Y EN PRESENCIA DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE INDOMETACINA. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA COMO PMOL DE ADIOLES FORMADOS / mg DE PROTEINA / HORA.
CONCENTRACIONES DE INDOMETACINA: (O) 0 mM; (■) 0.15 mM; (▲) 0.5 mM Y (●) 1 mM.

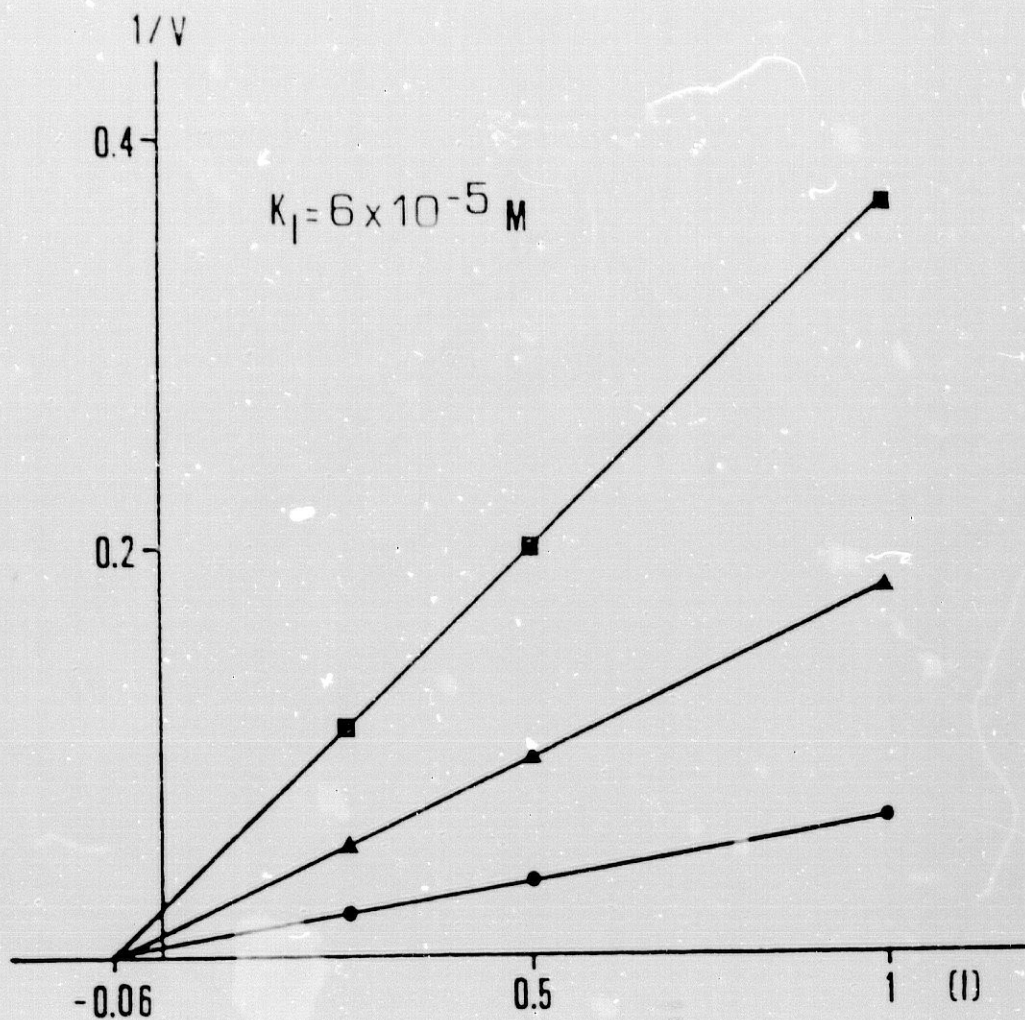


FIG. 37. REPRESENTACION DE LINEWEAVER-BURK DE LOS RESULTADOS DE LA FIGURA ANTERIOR (FIG. 35). EN ORDENADAS: INVERSO DE LA ACTIVIDAD DE FORMACION DE ADIOLES, EXPRESADO EN $\text{PMOL} / \text{mg} / \text{HORA}^{-1}$. EN ABSCISAS: CONCENTRACION DE INDOMETACINA, EXPRESADA EN mM. CONCENTRACIONES DE $^3\text{H-DHT}$: (\bullet) 50 nM; (\blacktriangle) 100 nM Y (\blacksquare) 200 nM.

	K_I
ANDROSTENDIONA	$(18 \pm 4) \times 10^{-6} \text{ M}$
INDOMETACINA	$(6 \pm 1.5) \times 10^{-5} \text{ M}$

TABLA 4. MEDIA DE LOS VALORES DE LAS K_I DE LA ANDROSTENDIONA E INDOMETACINA OBTENIDOS EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO (n = 4).

De las experiencias realizadas en biopsias de la zona alopécica de cuatro pacientes, obtenemos un valor medio para las K_I de $(18 \pm 4) \times 10^{-6}$ M y $(6 \pm 1.5) \times 10^{-5}$ M, para la androstendiona e indometacina respectivamente. Esto queda reflejado en la Tabla 4.

8. GUANILCICLASA EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO:

La Fig. 38 representa la exacta patrón del kit usado en la determinación de la guanilciclase, usando $^3\text{H-GMPc}$ como marcador.

En la Fig. 39 se representa la formación de GMPc en función del tiempo de incubación. La reacción es lineal hasta los 30 minutos estudiados. En nuestros experimentos sucesivos, el tiempo de incubación fue de 10 minutos.

La Fig. 40 representa la formación de GMPc en función de la concentración proteica, siendo la reacción lineal hasta los 100 μg de proteínas estudiados.

La Fig. 41 es una representación de la formación de GMPc en función de la concentración de GTP. Como se observa, el enzima empieza a saturarse a 1 mM. La concentración habitualmente utilizada en nuestras experiencias fue de 0.5 mM.

La Fig. 42 es una representación de Lineweaver-Burk de los resultados de la figura anterior. De dicha representación se obtiene una V_{max} de 17 pmol/mg de proteína/min y una K_M de 62×10^{-5} M ($y = 0.043x + 0.064$; $r = 0.9936$).

Se han realizado estas experiencias en la zona alopécica del cuero cabelludo de diez pacientes, siendo las medias de los valores obtenidos para las V_{max} y K_M de 14 ± 4.2 pmol/mg de proteína/min y de $(59 \pm 11) \times 10^{-5}$ M respectivamente. Estos resultados quedan reflejados en la Tabla 5.

Co/Cx

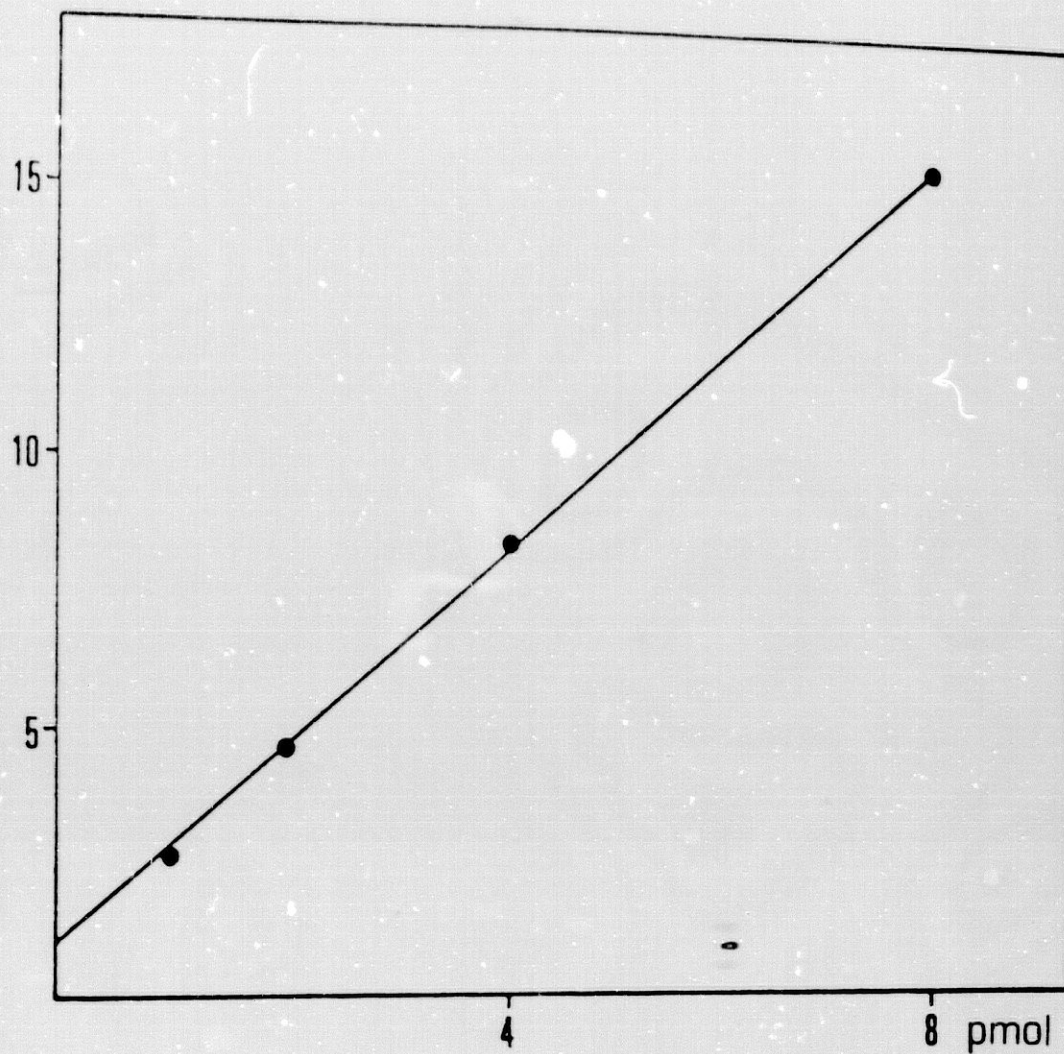


FIG. 38. RECTA PATRON DE $^3\text{H-GMPc}$. EN ORDENADAS: RELACION ENTRE LAS CPM DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE $^3\text{H-GMPc}$. EN ABCISAS: PMOL DE $^3\text{H-GMPc}$.

pmol/mg

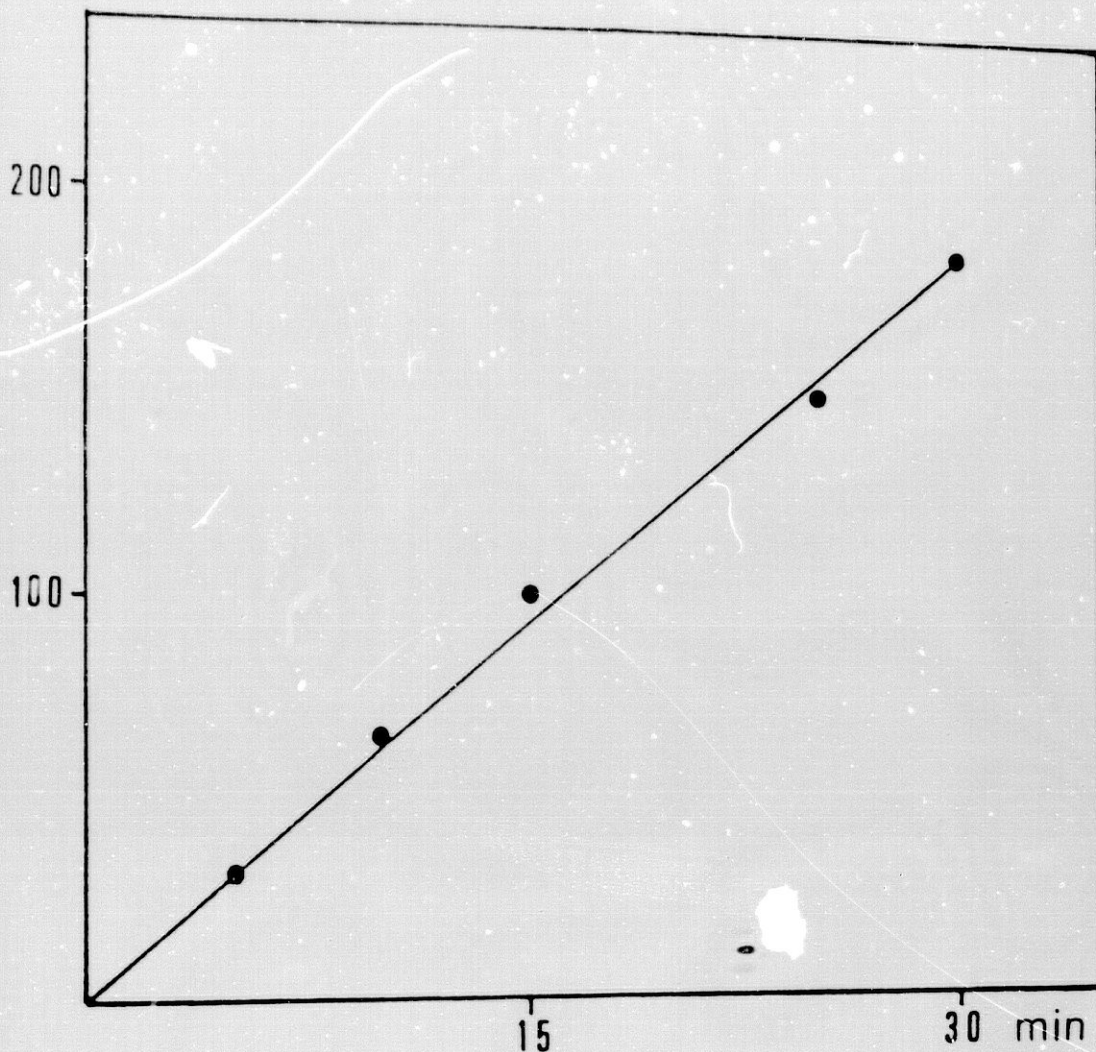


FIG. 39. VARIACION DE LA FORMACION DE GMPc EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO RESPECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION. 100 μ g DE PROTEINAS INCUBADOS A 37°C CON GTP 0.5 mM A TIEMPOS VARIABLES. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA COMO PMOL DE GMPc FORMADO / mg DE PROTEINA.

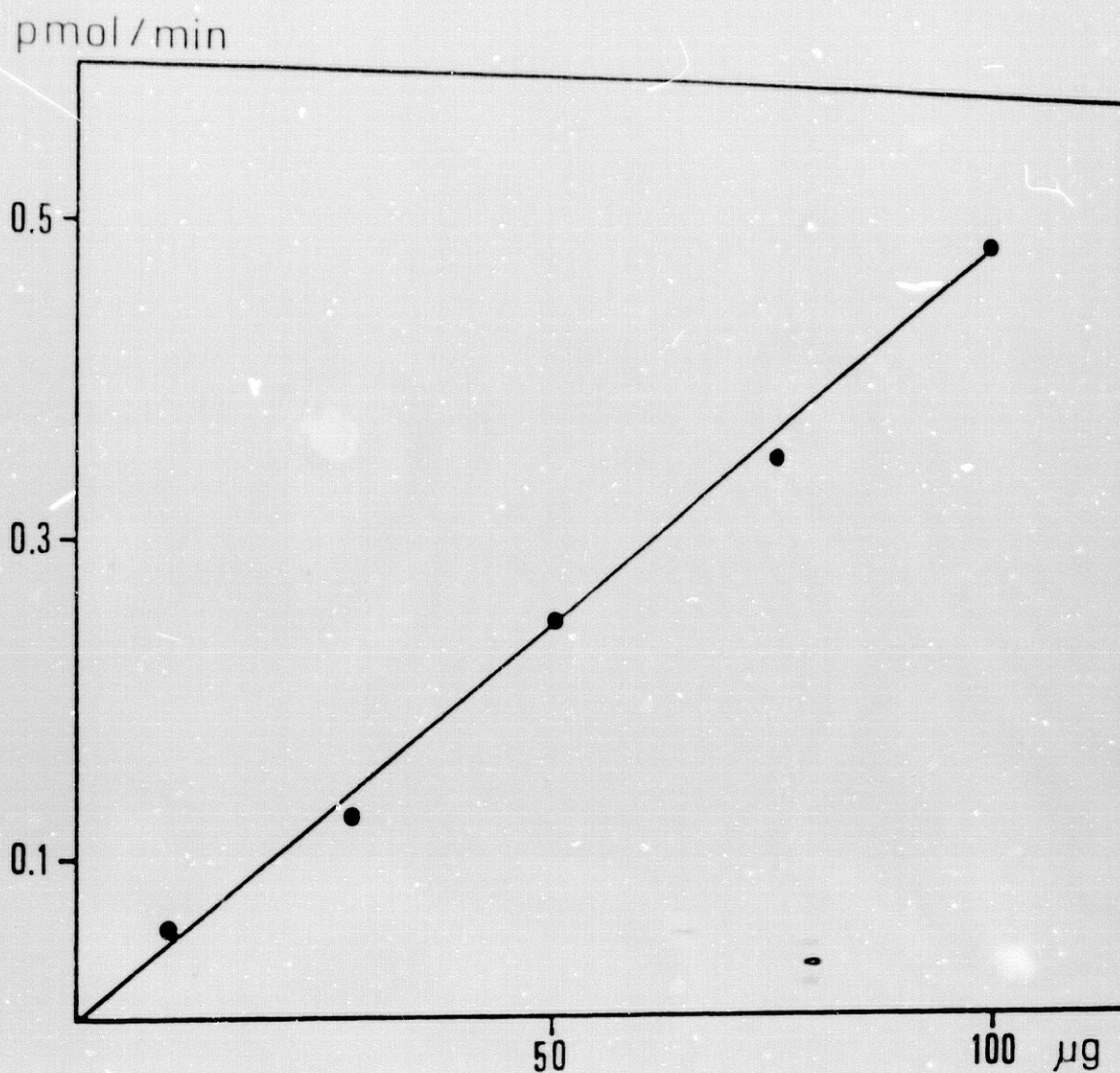


FIG. 40. VARIACION DE LA FORMACION DE GMPc EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO RESPECTO DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS. DISTINTAS CONCENTRACIONES DE PROTEINAS INCUBADAS A 37°C CON GTP 0.5 mM DURANTE 10 MINUTOS. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA COMO PMOL DE GMPc FORMADO / MINUTO

pmol/mg/min

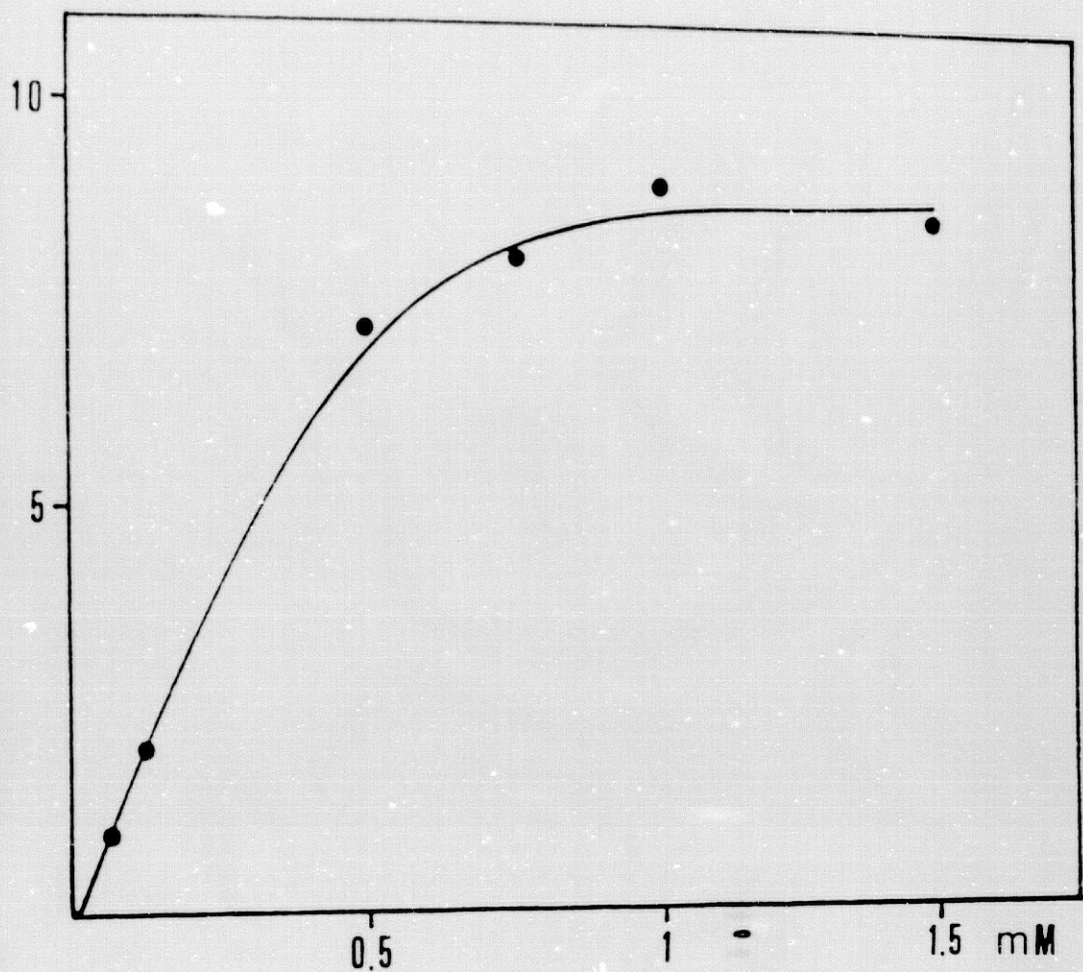


FIG. 41. VARIACION DE LA FORMACION DE GMPc EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO RESPECTO DE LA CONCENTRACION DE GTP. 100 μ g DE PROTEINAS INCUBADOS A 37°C DURANTE 10 MINUTOS CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE GTP. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA COMO PMOL DE GMPc FORMADO / mg DE PROTEINA / MINUTO.

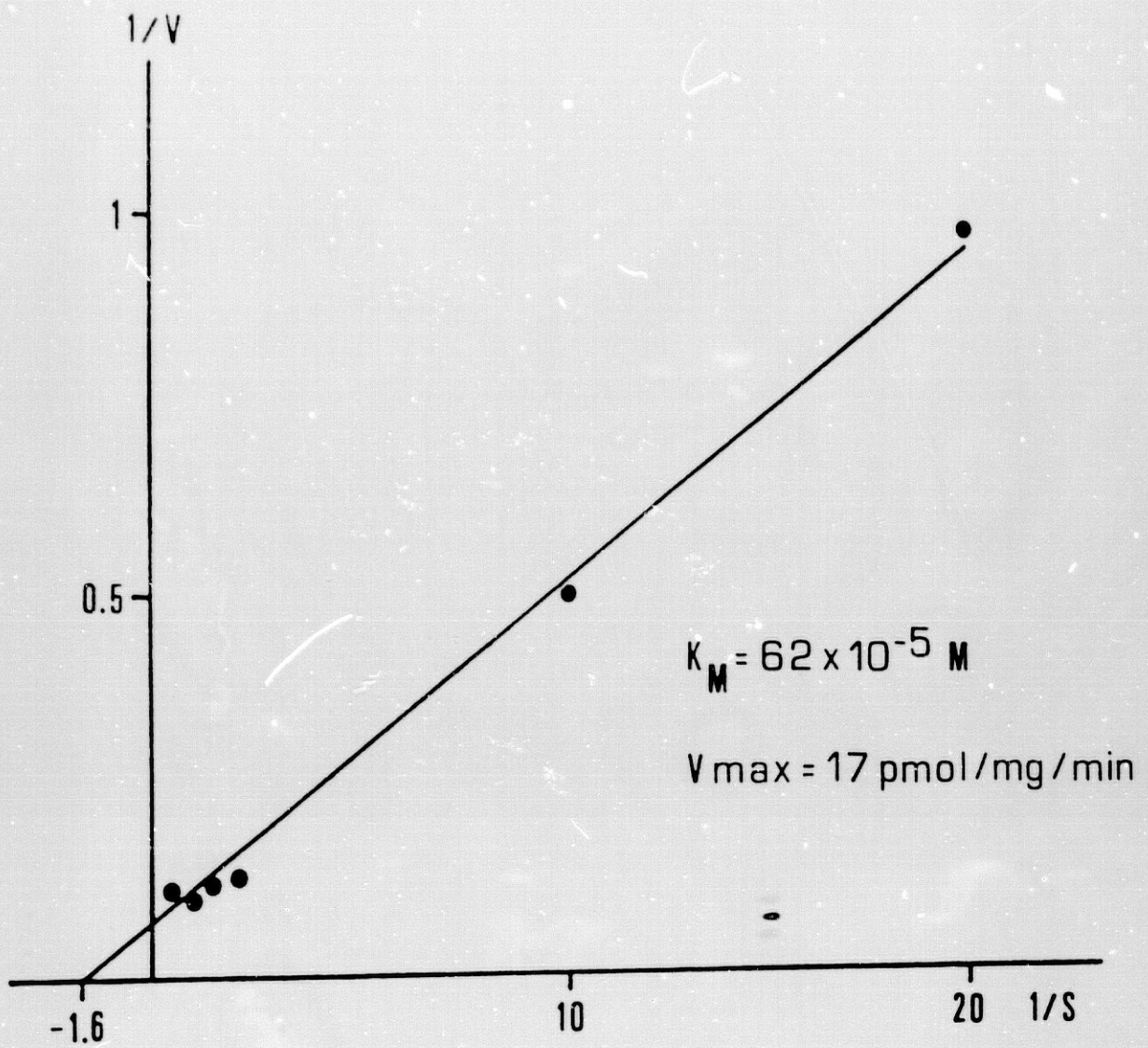


FIG. 42. REPRESENTACION DE LINEWEAVER-BURK DE LOS RESULTADOS DE LA FIGURA ANTERIOR (FIG. 41). EN ORDENADAS: INVERSO DE LA ACTIVIDAD DE FORMACION DE GMPc, EXPRESADO EN PMOL / mg / MINUTO⁻¹; EN ABSCISAS: INVERSO DE LA CONCENTRACION DE GTP, EXPRESADO EN mM⁻¹.

V _{max}	14 ± 4.2 pmol / mg / min
K _M	(59 ± 11) x 10 ⁻⁵ M

TABLA 5. MEDIA DE LOS VALORES DE LAS V_{max} Y K_M DE LA GUANILCICLASA, OBTENIDOS EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO (n = 10).

9. COMPARACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GUANILCICLASA ENTRE LAS ZONAS ALOPECICA Y NO ALOPECICA DEL CUERO CABELLUDO:

En este estudio se ha comparado la actividad enzimática de la guanilciclase de la zona alopecica de 22 pacientes, con la actividad en la zona no alopecica de 8 pacientes.

Los valores de esta actividad oscilan entre 0.15 y 0.7, con un valor medio de 0.38 ± 0.13 en la zona alopecica y de 0.06 a 0.15, con un valor medio de 0.087 ± 0.03 en la zona no alopecica, cuando se expresan en pmol/mg de proteina/min. Si estos valores los expresamos en pmol/g de tejido/min, los valores oscilan entre 37 y 175, con un valor medio de 93.6 ± 35.8 en la zona alopecica y de 50 a 70, con un valor medio de 59.6 ± 7.3 en la zona no alopecica. En este sentido las diferencias entre las dos zonas estudiadas es significativa ($0.01 < p < 0.05$).

Estos resultados quedan reflejados en la Fig. 43.

pmol/g/min

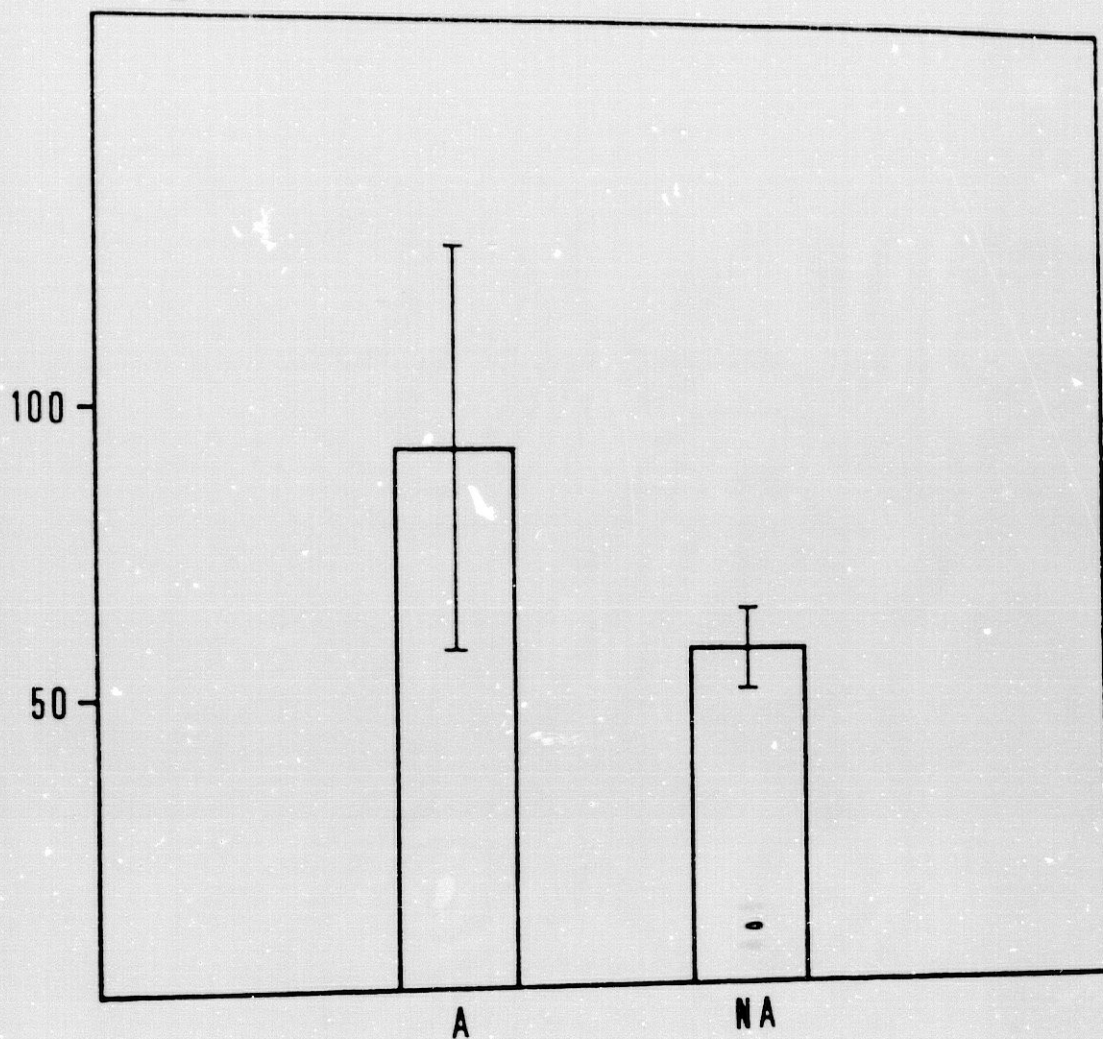


FIG. 43. COMPARACION ENTRE LAS ZONAS ALOPECICA Y NO ALOPECICA DE CUERO CABELLUDO RESPECTO A LA FORMACION DE GMPc. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA COMO PMOL DE GMPc FORMADO / g DE TEJIDO / MINUTO; LA INCUBACION SE REALIZA DURANTE 10 MINUTOS, UTILIZANDO UNA CONCENTRACION DE GTP DE 0.5 mM. A: ZONA ALOPECICA (n = 22) Y NA: ZONA NO ALOPECICA (n = 8).

10. ESTIMULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GUANILCICLASA POR EL 3 β -ADIOL:

En la Fig. 44, se representa el efecto estimulante del 3 β -Adiol en la actividad de la guanilciclase, en la zona alopecica del cuero cabelludo. Como se ve en la figura, el 3 β -Adiol produce un aumento de alrededor del 15 % de dicha actividad, a la concentración de 10 μ M. Al usar esta concentración hemos obtenido un valor medio de estimulación de 14 ± 2 %, en las biopsias de la zona alopecica de tres pacientes.

La determinación de proteínas de las biopsias, da un valor medio de 1.5 ± 0.3 y 0.3 ± 0.01 mg/ml de homogenizado, en las zonas alopecica y no alopecica respectivamente.

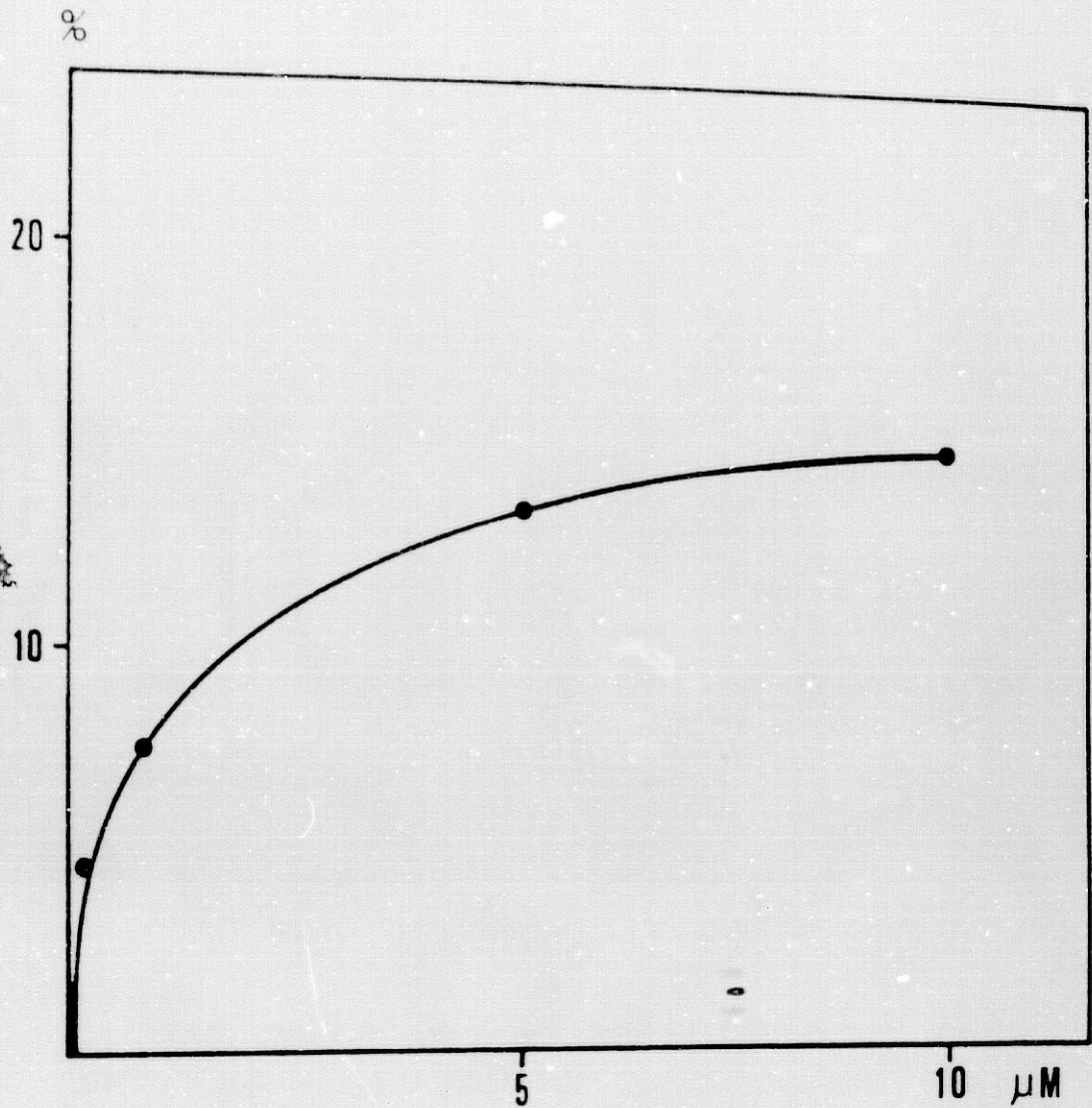


FIG. 44. INFLUENCIA DEL 3 β -ADIOL EN LA FORMACION DE GMPc EN CUERO CABELLUDO ALOPECICO. 100 μ g DE PROTEINAS INCUBADOS A 37°C DURANTE 10 MINUTOS CON GTP 0.5 mM EN PRESENCIA DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE 3 β -ADIOL. LA ACTIVIDAD SE EXPRESA COMO PORCENTAJE DE AUMENTO EN LA FORMACION DE GMPc RESPECTO DE LA ACTIVIDAD BASAL

IV. DISCUSSION

1. DEL MODELO EXPERIMENTAL:

Desde que se tuvo conocimiento que la testosterona necesitaba transformarse en DHT en la célula diana, mediante la acción de la 5α -R, para ejercer su efecto, el metabolismo de la misma ha sido estudiado en una gran variedad de tejidos humanos y animales. La presencia de DHT fue puesta de manifiesto, por primera vez, en próstata de rata a partir de androstendiona (119), y posteriormente Bruchosvky y col. (1), obtuvieron también DHT a partir de testosterona en próstata de rata.

Los estudios iniciales se desarrollaron en tejidos relacionados con la reproducción en el macho (próstata, vesícula seminal, prepucio y escroto), así como en otros tejidos de diferentes especies animales y en el hombre. La producción de DHT variaba en las distintas especies y en los distintos tejidos estudiados, siendo notablemente mayor en los órganos reproductivos(120).

Se han llevado a cabo numerosos estudios utilizando como modelo la piel de distintas zonas del organismo, como ya indicamos en la introducción de esta tesis, lo cual es de un gran interés por ser la piel el órgano más extenso del cuerpo. En el hombre se intentó poner de manifiesto la relación entre el metabolismo de la testosterona, y

ciertas patologías dependientes de los andrógenos, como es el síndrome de feminización testicular. Al comparar dicho metabolismo en pacientes afectados de este síndrome y sujetos normales, se vio que la actividad de la 5 α -R era deficiente en estos pacientes (43). Wilson y col. (32) vieron que en la zona del pubis el metabolismo de la testosterona era normal, mientras que en la piel de los labios mayores, la conversión a DHT era unas tres veces menor comparada con la de sujetos normales. En otro estudio similar, Mauvais y col. (21), demostraron la ausencia total del enzima 5 α -R en pacientes con dicho síndrome.

La piel, se ha utilizado también como modelo experimental para el estudio de otro trastorno dependiente de los andrógenos, como es el hirsutismo idiopático. En un estudio realizado por Kuttan y col. (33) en piel púbica, se comprobó que en el hirsutismo la conversión de la testosterona a DHT era alrededor de diez veces mayor comparada con la de los sujetos normales. Esto mismo fue corroborado por otros autores (122). Más recientemente, Sally y col. (123) utilizaron pelos aislados de la zona púbica de pacientes con hirsutismo, y no obtuvieron diferencias significativas de la 5 α -R en estos pacientes en relación a los sujetos normales. Sin embargo, estos autores observaron una diferencia de la actividad enzimática

de la 17β -HSOR, siendo mayor en los pacientes con hirsutismo. Esto sugiere la importancia de diferenciar el modelo cutáneo del modelo folicular.

En el acné, un sintoma muy generalizado en individuos jóvenes, y directamente relacionado con los andrógenos, existen estudios del metabolismo de la testosterona en piel del rostro, que demuestran que la actividad de la 5α -R es de diez a veinte veces superior respecto a los individuos sin acné (124). Resultados similares han sido puesto de manifiesto por distintos autores.

La importancia atribuida a la 5α -reducción de la testosterona en piel no es unánime. Así otros autores (77,125), afirman que la 5α -reducción de la testosterona no es un paso importante en el mecanismo de acción de los andrógenos en la glándula sebácea. Como ya indicamos en la introducción, en el intento de dilucidar el metabolito activo responsable de los trastornos locales dependientes de los andrógenos, el enzima $3\alpha(\beta)$ -HSOR se propone por algunos autores como alternativa para esclarecer dichas alteraciones. En los últimos años, este enzima ha sido estudiado también en diversas zonas del cerebro (126,127), demostrándose la preponderancia de este enzima respecto a la 5α -R, y comprobándose que su localización en el mismo, era principalmente en el bulbo olfatorio y tubérculo

olfatorio (128). Esto es de particular importancia, ya que tanto la testosterona como sus metabolitos afectan a la conducta por su interacción con los diferentes tejidos neuronales del cerebro, y su localización es importante para determinar sus acciones (27,129,130).

Asimismo, la piel y anejos han sido también utilizados como modelo experimental en numerosos trabajos de cuantificación del receptor androgénico, especialmente en fibroblastos (53,131,132,133).

Por último, la piel ha sido utilizada por algunos autores, como modelo experimental para el estudio de la actividad de la guanilciclase. La mayoría de estos estudios van encaminados a la búsqueda de una relación entre los niveles de GMPc y la presencia de psoriasis, encontrándose que en las áreas de epidermis con psoriasis, el GMPc estaba aumentado (134,135).

Vemos pues que la piel es un interesante modelo experimental. Siendo nuestro objetivo estudiar la posible alteración de los andrógenos en la ASM, se ha utilizado como material de trabajo, biopsias de cuero cabelludo de sujetos con dicha alteración. En nuestro modelo experimental la actividad metabólica estudiada se desarrolla fundamentalmente en la glándula sebácea. Las biopsias de cuero cabelludo de estos pacientes, presentan una gran

proporción de glándulas sebáceas hipertrofiadas; mientras que los folículos pilosos en dichas biopsias se encuentran muy atrofiados.

Asimismo se ha utilizado próstata humana para la puesta a punto del método de análisis del metabolismo, al ser ésta un tejido utilizado por muchos autores como modelo experimental.

El hecho de haber utilizado únicamente modelos humanos y descartar los modelos animales para el desarrollo de este trabajo, tiene un doble interés: 1) como modelo en sí mismo y 2) como posible punto de partida para desarrollar nuevas tendencias terapéuticas no sólo en la ASM, sino en todos los casos de alteración del metabolismo androgénico.

2. DEL METODO:

2.1. METABOLISMO:

Vamos a diferenciar en este apartado dos consideraciones referentes al mismo:

1. Condiciones de la reacción enzimática.
2. Técnicas cromatográficas.

2.1.1. CONDICIONES DE LA REACCION ENZIMATICA:

En primer lugar nos referiremos a la distribución celular de los enzimas. La 5α -R es una enzima localizada en el retículo endoplásmico. La mayoría de los autores, para estudiar la actividad de dicho enzima, trabajan con el homogenizado total del tejido y nosotros optamos también por trabajar en estas condiciones. En cuanto a la $3\alpha(\beta)$ -HSOR, aunque su localización está en el citoplasma celular, decidimos trabajar con el homogenizado total, que no sólo contiene la actividad de la fracción soluble correspondiente, sino toda la actividad del enzima. Esto concuerda con lo realizado por otros autores, que

obtuvieron más actividad con el homogenizado total en estudios en próstata (136), además ello tiene la ventaja de que con el mismo tejido, obtenemos los dos datos (5α -R y $3\alpha(\beta)$ -HSOR). En un trabajo realizado por Lundmo y col. (137) en vesícula seminal de rata, se puso de manifiesto la existencia de dos $3\alpha(\beta)$ -HSOR, una particulada, dependiente de NADH y otra soluble dependiente de NADPH.

Hay una gran diversidad en los distintos estudios realizados, tanto en piel como en otros tejidos, en cuanto al tampón utilizado y la presencia o no de cofactores, llegando a afirmar Hay y col (42), que la obtención de un metabolito u otro depende de la elección del tampón utilizado. Así estos autores obtuvieron 3β -Adiol cuando incubaban con testosterona en presencia de tampón Tris-ClH conteniendo distintos cofactores, y no lo obtenían cuando incubaban con Krebs-Ringer sin cofactores.

El pH es otro de los factores a tener en cuenta. Nosotros hemos utilizado tampón fosfato sódico a pH 6.6, pH óptimo para la valoración del metabolismo de la testosterona según manifiestan Monsalve y col. (138).

Asimismo puede influir en los resultados la concentración de sustrato utilizada. Hay y col. (42) obtuvieron 3β -Adiol cuando utilizaban $^3\text{H-T}$ 500 nM, y no lo obtenían a concentraciones de 3.5 μM . Resultados similares obtuvieron

Stewart y col. (38), en estudios realizados en cuero cabelludo y espalda, en los que obtenían 3β -Adiol a partir de $^3\text{H-T}$, únicamente cuando utilizaban concentraciones bajas de sustrato.

Nosotros hemos optado por hacer dos tipos de experiencias, acerca del punto anterior:

1. Con el fin de mantener las condiciones ortodoxas necesarias para trabajar con enzimas, especialmente en el sentido de disponer de sustrato suficiente para que el producto de la reacción no supere el 5 %, utilizamos un lote de experiencias con $^3\text{H-T}$ y $^3\text{H-DHT}$ de 25 μM y 50 μM respectivamente. No obstante, hay que tener en cuenta que estas elevadas concentraciones, están muy por encima de las concentraciones fisiológicas de las hormonas en los tejidos. Por ello, y especialmente en las experiencias comparativas entre las zonas alopecica y no alopecica, utilizamos:

2. Concentraciones de $^3\text{H-T}$ y $^3\text{H-DHT}$ de 4 nM. De este modo reproducimos más fielmente las condiciones fisiológicas y obtenemos un mayor porcentaje de metabolitos que, aunque no nos sirve para establecer características cinéticas, si son de gran utilidad para poner de relieve las diferencias entre las dos zonas.

Después de todo lo expuesto, se observa que las condiciones experimentales influyen notablemente en los resultados, especialmente en lo que se refiere al estudio del metabolismo, que es lo que constituye nuestro trabajo central. Por ello, es muy probable que modificando las condiciones experimentales obtuviéramos resultados diferentes. Sin embargo, como nuestro objetivo fundamental es el estudio comparativo entre las zonas alopecica y no alopecica de cuero cabelludo, manteniendo las mismas condiciones, nos permite hacer dicha comparación.

2.1.2. TECNICAS CROMATOGRAFICAS:

Las técnicas empleadas en la separación de esteroides, son las técnicas cromatográficas comunes, siendo las mayormente utilizadas las de: cromatografía en capa fina, cromatografía de gas y cromatografía líquida. Dentro de éstas, hemos elegido la cromatografía en capa fina por cuatro motivos fundamentales:

1. Porque es el método mas ampliamente utilizado por la mayoría de los autores.
2. Porque permite una adecuada separación de los distintos metabolitos.

3. Por su sencillez y economía, y

4. Especialmente porque para analizar los metabolitos radiactivos, disponiendo de un radiocromatógrafo eran prácticamente el único método válido.

En la cromatografía en capa fina, la mayoría de los autores utilizan placas de silicagel, y como solventes cloroformo:metanol (2:1). Sin embargo, con este sistema no consiguen una adecuada separación de ciertos metabolitos, tales como la DHT y androsterona y los isómeros 3α y 3β de los Adioles. Nosotros pudimos comprobar que efectivamente no se conseguía la separación antes mencionada, por lo que desechamos este sistema, ya que uno de nuestros objetivos era poder obtener una adecuada separación de ambos Adioles.

Algunos autores como Wilson y col. (32) y Smith y col. (139), en sus estudios del metabolismo de andrógenos en piel humana y corazón de rata respectivamente, utilizaron dos técnicas cromatográficas complementarias. Así utilizan la cromatografía en capa fina en silicagel, seguida de una cromatografía de gas, lo que les permite una adecuada separación de DHT y androsterona, aunque no consiguen la separación del 3α y 3β Adioles. En otros trabajos, se consigue la separación de los dos isómeros mediante sucesivas cromatografías en capa fina, utilizando

distintos solventes (140). Isaac y col. (141) consiguen separar la DHT de la androsterona, y el 3 α y 3 β Adioles, al utilizar sucesivas cromatografías en dos tipos de placa, una de silicagel y otra de óxido de aluminio.

Nosotros hemos modificado este último sistema, utilizando placas de óxido de aluminio, y realizando la cromatografía en dos ascensos en benceno:etanol (96:4). Hemos logrado así, la separación antes citada. Esto mismo consiguieron Morfin y col. (136) en sus estudios del metabolismo de andrógenos en próstata humana.

Por otra parte, la disponibilidad del radiocromatógrafo, ha representado para nuestro trabajo un avance tecnológico muy importante. Por un lado, el poder hacer un seguimiento de los distintos metabolitos directamente, sin necesidad de rascar fragmentos del cromatograma e introducirlos en viales de centelleo, como se tiene que hacer habitualmente, significando un ahorro considerable de tiempo y dinero. En segundo lugar, el poder de discriminación de dicho equipo, superior a 0.25 milímetros, le da un poder de resolución que permite distinguir esteroides con valores de Rf muy próximos. Tengamos en cuenta que habitualmente la técnica de rascado de placas, se lleva a cabo en fragmentos de 5 milímetros de longitud, lo cual es motivo frecuente de solapamiento entre los

distintos esteroides. En este sentido pues, el poder de resolución del radiocromatógrafo sería 20 veces superior a la técnica de rascado de placas. Finalmente todo ello hace innecesario, una vez standarizada la técnica, realizar las clásicas y engorrosas comprobaciones de recristalización de los productos cromatografiados.

Por otra parte, la posibilidad de controlar todas las variables del proceso de detección de la radiactividad: grosor de la placa, altura de la cámara de ionización de la superficie de la placa, flujo de gas, tiempo de exposición, etc., hace posible que podamos transformar las cuentas obtenidas en el radiocromatógrafo en moles, como vimos en el apartado correspondiente de material y métodos.

Dadas las dificultades para obtener suficiente cantidad de tejido en las muestras procedentes de la zona occipital, el poder disponer de esta técnica tan sensible, específica y fiable, nos ha representado una solución a dicho problema.

2.2. GUANILCICLASA:

La bondad del kit de ^3H -GMPc, por el que determinamos el GMPc formado, no vamos a ponerla en duda. Solamente haremos algunos comentarios de las sustancias presentes en el estudio "in vitro" de la reacción enzimática.

La actividad de la guanilciclase necesita de la presencia de cationes, siendo el manganeso esencial para dicha actividad (142). El calcio se vio que no era efectivo en la actividad particulada de la guanilciclase en hígado de rata, sin embargo, el calcio produce una estimulación del 10 al 40 % de la actividad soluble de la guanilciclase, cuando se utiliza con concentraciones óptimas de manganeso (143). Esta misma estimulación también ocurre con el estaño y el níquel. Otros metales, como el zinc, mercurio y cobre, resultan inhibidores.

La presencia de agentes reductores en los estudios "in vitro", son necesarios para prevenir la "activación espontánea" y subsiguiente inactivación que sufre la guanilciclase, al sufrir una oxidación en presencia de aire. Esta activación fue puesta de manifiesto por primera vez, por Böhme y col. (144), viendo estos autores que se podía prevenir en presencia de agentes reductores. A conclusiones similares se llegaron en otros trabajos. Así,

White y col. (145) estudiando la actividad de la guanilciclase en hígado de rata, vieron que esta activación es termodependiente, mostrando un máximo de actividad a los 37°C. La presencia en la reacción de 2-mercaptoetanol, y otros reductores tiólicos, como el ditiotreitól, glutatión y cisteína, previenen dicha "activación" por oxidación.

La presencia de cafeína en la reacción, es necesaria para inhibir a la fosfodiesterasa, enzima que cataliza la reacción de la degradación del GMPC a GMP. Esta degradación del GMPC ha sido puesta de manifiesto en mamíferos, bacterias y plantas. Siendo la única excepción los linfocitos y monocitos de mamíferos. En este sentido, las metilxantinas son unos efectivos inhibidores.

3. DE LOS RESULTADOS:

3.1. METABOLISMO:

Las experiencias realizadas en próstata humana y cuero cabelludo, demuestran la capacidad de dichos tejidos para metabolizar testosterona y DHT.

Los resultados en próstata nos demuestran la gran formación de DHT, y la formación de Adioles a partir de la DHT, siendo mucho mayor la proporción del 3α -Adiol respecto del 3β -Adiol. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores. Así Schweikert y col. (146) obtienen una gran formación de DHT y pocos Adioles, como únicos metabolitos. En cuanto a los Adioles, la mayoría de los autores coinciden en la mayor obtención del 3α respecto del 3β -Adiol (147,148).

Referente al cuero cabelludo, nos encontramos en primer lugar con la incapacidad total que presentan algunas biopsias para metabolizar testosterona, así como una gran variedad en la actividad específica de cada una de ellas. Esto queda reflejado en las grandes desviaciones standard, tanto de las V_{max} como de las K_M obtenidas, que concuerda

con lo referido por otros autores, y es atribuible a las variaciones interindividuales.

En la mayoría de las biopsias de la zona alopécica, incubadas en presencia de testosterona, obtenemos como único metabolito la DHT. En ciertas biopsias también obtenemos androstendiona. La presencia de este último metabolito es prácticamente constante en la zona no alopécica.

La obtención de DHT y androstendiona, como únicos metabolitos, ha sido puesta también de manifiesto por otros autores en piel humana. En otros trabajos realizados en piel, se ha observado además la presencia de Adioles (149,150), aunque la DHT se mantiene como principal metabolito. Sin embargo, Sansone y col. y Sharp y col. (151,152), en sus estudios en pelo de cuero cabelludo y piel respectivamente, obtuvieron androstendiona como metabolito principal.

En nuestros ensayos con ^3H -DHT, observamos como dato más significativo, que el 3β -Adiol es el principal metabolito formado, mientras que el 3α -Adiol, que no siempre se obtiene, resulta ser un 20 ± 6.2 % del total de los Adioles obtenidos; esto sucede tanto en la zona alopécica como en la no alopécica.

En ciertas biopsias de la zona alopecica obtenemos también androstandiona, mientras que en la zona no alopecica, su aparición es prácticamente constante, aunque las variaciones en los distintos individuos son muy notorias.

Serafini y col. y Stewart y col. (150,38), obtienen también como principal metabolito en sus estudios en piel humana, el 3β -Adiol, aunque las incubaciones las realizan con $^3\text{H-T}$.

Las K_M y V_{max} obtenidas en nuestras incubaciones con $^3\text{H-T}$, son muy similares a las obtenidas por otros autores en los estudios de piel humana.

Nosotros encontramos un valor para la K_M de la $5\alpha\text{-R}$ de 12×10^{-6} M, muy próximo a los encontrados por Takayasu y col. (34,153) en piel humana: 22×10^{-6} M y 24×10^{-6} M respectivamente. Otros autores, sin embargo, obtienen unas K_M más bajas: 22×10^{-8} M y 11×10^{-7} M (154,155).

Sin embargo, nuestros valores de V_{max} y K_M para la $3\alpha(\beta)\text{-HSOR}$, son superiores a los encontrados en la literatura (154,155).

En nuestros estudios comparativos del metabolismo androgénico de las zonas alopecica y no alopecica de cuero cabelludo, nos encontramos con que entre ambas zonas existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto

a la producción de DHT y Adioles (3β -Adiol), siendo mayor en la zona alopécica.

Bingham y col. (37) encontraron que la reducción de testosterona en cuero cabelludo alopécico es mayor que en cuero cabelludo sin alopecia y sugieren que este hecho puede estar relacionado con el número de glándulas sebáceas presentes en cada tipo de piel. Sin embargo, Stewart y col. (38), al comparar el metabolismo de la testosterona entre la piel de la espalda y el cuero cabelludo, no encontraron diferencias en la actividad enzimática de ambas zonas.

En nuestros resultados, la actividad de la 17β -HSOR, enzima encargada de la oxidación de la testosterona y DHT, es superior en la zona no alopécica con respecto a la zona alopécica, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

Basados en la literatura consultada, así como lo expuesto anteriormente en esta discusión, cabría pensar que el metabolito activo de la testosterona sería la DHT o el 3β -Adiol.

3.2. RECEPTOR:

En estudios previos realizados en nuestro Departamento, se demostró que no existía un receptor específico citoplasmático para la DHT en biopsias de cuero cabelludo alopecico. Estos resultados nos hacen pensar que posiblemente sea el 3β -Adiol el metabolito responsable de la alopecia, y en la posibilidad de que éste se una específicamente a una proteína citoplasmática para ejercer su acción.

Nosotros hemos buscado el posible receptor al 3β -Adiol sin llegar a conclusiones definitivas (resultados no mostrados). Hemos realizado experiencias en suero sanguíneo para cuantificar la fijación del ^3H - 3β -Adiol a las proteínas séricas, concretamente a la SHBG, y a su vez en la fracción soluble de cuero cabelludo.

En suero sanguíneo, cuando el desplazamiento del ^3H - 3β -Adiol fijado se realiza con 3β -Adiol frío a concentraciones 1,000 veces superiores a las del radiactivo, obtuvimos una fijación específica con una cinética de saturación habitual en este tipo de reacciones, presentando una K_d de 33×10^{-9} M y un número máximo de sitios de fijación (n) de 80 fmol/mg de proteína. Al hacer estas experiencias en la fracción soluble de cuero cabelludo,

desplazando el ^3H - 3β -Adiol con 3β -Adiol a concentración 100 veces superior al radiactivo, obtenemos una cinética de fijación similar a la descrita en suero sanguíneo, saturándose a la concentración de 25 nM, con una K_M de 5.5×10^{-9} M y $n = 21.3$ fmol/mg de proteína.

Estos resultados nos llevan a pensar que la fijación del 3β -Adiol en la fracción soluble sería debida a la SHBG. Sin embargo, cuando el desplazamiento del ^3H - 3β -Adiol se hace a una concentración 1,000 veces superior de 3β -Adiol, no se puede valorar la fijación específica, produciéndose un fenómeno inverso al habitual. En efecto, el 3β -Adiol frío en lugar de desplazar la fijación del ^3H - 3β -Adiol, lo que hace es aumentar dicha fijación, de tal manera que es imposible obtener una saturación de la cinética de fijación a las concentraciones del 3β -Adiol soluble en el citosol. Por ello fue imposible poder calcular exactamente la capacidad de fijación del sistema (156).

Todo ello demostraría que el 3β -Adiol es capaz de modificar el estado de agregación de un receptor citosólico, como se ha descrito en otros tejidos para la DHT (157), y que a medida que aumenta la concentración del esteroide la desagregación de dicho receptor es mayor, lo que explicaría el aumento progresivo de la fijación. Todo

ello apoyaría la existencia de un receptor para el 3 β -Adiol exclusivamente, y no para otros esteroides.

De la bibliografía consultada respecto de la existencia de un receptor específico para el 3 β -Adiol, solamente tenemos conocimiento de la presencia del mismo, en la fracción microsomal de próstata de rata (78), el cual presenta una K_d de $(6.5 \pm 4.4) \times 10^{-10}$ M y $n = 8.1 \pm 6$ fmol / mg de proteína, sin haber encontrado ninguna descripción de un receptor soluble al 3 β -Adiol.

3.3. GUANILCICLASA:

Como decíamos en la introducción de esta tesis, los nucleótidos cíclicos (AMPC y GMPc) juegan un papel importante en los procesos de traducción del mecanismo de acción de los andrógenos. En este sentido se ha descrito que la testosterona y sus metabolitos estimulan la actividad de la guanilciclase (79), poniendo así de manifiesto el papel mediador del GMPc.

Los efectos observados en las células, mediados por los nucleótidos cíclicos, tras la estimulación con andrógenos, muy probablemente son independientes de los efectos mediados por el complejo andrógeno-receptor. Es

decir, el andrógeno (o sus metabolitos activos) al entrar en la célula diana desencadenaría, al menos, dos tipos de procesos:

1. Fenómenos derivados de la acción sobre el núcleo por el complejo andrógeno-receptor, y
2. Procesos derivados del aumento del nucleótido cíclico (GMPc).

Esta hipótesis permitiría comprender por qué muchos antiandrógenos no consiguen inhibir todos los procesos celulares mediados por los andrógenos. En efecto, los denominados antiandrógenos son sustancias que bloquean el receptor androgénico citoplasmático, con lo cual impiden el desarrollo de los procesos celulares debidos al complejo andrógeno-receptor; pero no obstante, se ha comprobado que estos antiandrógenos no son capaces de bloquear algunos procesos celulares promovidos también por los andrógenos (158). Por lo tanto, estos procesos celulares no bloqueados podrían depender directamente de la estimulación de la guanilciclase, con el consiguiente aumento de GMPc, que obviamente, el antiandrógeno no ha podido bloquear.

Por todo ello vemos que los nucleótidos cíclicos cobran una especial relevancia en el mecanismo de acción de

los andrógenos y por tanto, pueden ser también causa de algunas desviaciones del funcionalismo hormonal local.

De la bibliografía consultada podemos concluir que no existen estudios previos sobre el papel de la guanilciclase en la secreción sebácea ni, por tanto, sobre posibles alteraciones de dicha actividad enzimática en la ASM. Por ello, nos decidimos a incluir en esta tesis algunas experiencias encaminadas al estudio de la actividad de este enzima en piel de cuero cabelludo, comparando la zona alopecica con la no alopecica del mismo sujeto.

Los resultados que presentamos de la actividad enzimática en biopsias de cuero cabelludo deben considerarse, pues, originales en el sentido de describir las características de la guanilciclase en este tejido. De todos modos, las características del enzima (afinidad) son similares a las encontradas por otros autores en distintos tejidos (159,160), aunque las V_{max} , varían lógicamente en los distintos tejidos utilizados. Sin embargo, nuestra V_{max} es muy similar a las encontradas por Lad y col. (159) en neutrófilos humanos, y Vesely y col. (161) en sus estudios de páncreas, hígado, riñón y cerebelo.

En cualquier caso, dando por supuesto que la guanilciclase y, por tanto, el GMPc juegan un papel importante en el mecanismo de acción de los andrógenos en la

glándula sebácea de las muestras analizadas por nosotros, lo más importante de nuestros resultados es la diferencia observada, de dicha actividad enzimática, entre las zonas alopecica y no alopecica.

En efecto, hemos podido comprobar que esta actividad es significativamente superior en la zona alopecica, lo cual estaría de acuerdo con una mayor actividad androgénica en dicha zona cutánea.

Anteriormente hemos expuesto los resultados del metabolismo de la DHT, en los que se pone de manifiesto la mayor actividad de la 3β -HSOR de la zona alopecica. Por tanto, es evidente que habrá una mayor producción del 3β -Adiol en dicha zona. Además, como hemos visto en la Fig. 44, el 3β -Adiol es capaz de estimular la actividad de la guanilciclase en un 15 %, lo que nos hace suponer que dicho metabolito muy probablemente actuará, aunque sea parcialmente, a través de la estimulación de la guanilciclase.

3.4. INHIBIDORES:

Si aceptamos que el 3β -Adiol es el metabolito activo de la testosterona, en estos tejidos, una de las vías

terapéuticas en el tratamiento del exceso de la secreción sebácea, y de los trastornos del desarrollo folicular que de ella se derivan, sería la utilización de inhibidores de la 3β -HSOR.

Mauvais y col. (162), concluyeron que la DHT no juega un papel importante en la secreción sebácea y, por tanto, los inhibidores de la 5α -R podían ser un fracaso en el tratamiento de dicha hipersecreción. En este sentido, se conseguiría una inhibición más específica con la utilización de inhibidores del metabolito activo, el 3β -Adiol.

En nuestro caso, hemos observado que la androstendiona, progesterona (resultados no presentados) e indometacina inhiben a la $3\alpha(\beta)$ -HSOR por un mecanismo no competitivo. Tanto la androstendiona, como la progesterona, ya han sido descritas como inhibidores competitivos de la 5α -R en distintos tejidos (138,163-165), pero no hemos encontrado en la literatura consultada la inhibición por indometacina.

La androstendiona puede ser considerada como un freno fisiológico en estos procesos. Por una parte, como hemos apuntado anteriormente, inhibe la formación del 3β -Adiol, que consideramos responsable del exceso de secreción sebácea. En segundo lugar, su formación en la zona afectada está disminuida respecto de la zona no alopécica.

En resumen, con todo lo expuesto en esta discusión, se puede tener una visión mas completa de la etiopatogenia de la ASM y de la seborrea en general.

En la glándula sebácea, el primer paso sería un aumento de la captación de la testosterona unida a la SHBG, seguido de un aumento de la biotransformación de la testosterona a DHT, que a su vez se metabolizaría a 3β -Adiol. El 3β -Adiol aumentaría la secreción sebácea, y este aumento, estaría favorecido por la disminución de la 17β -HSOR, freno fisiológico de la mencionada secreción. Esto provocaría la hipertrofia de la glándula sebácea, que sería la responsable de la atrofia del folículo piloso, no solamente por impedimento mecánico, sino también por la presencia de un exceso de lípidos, que podrían contribuir impidiendo el normal desarrollo de los folículos.

El hecho de que el 3β -Adiol fuera realmente el metabolito activo de la testosterona, implicaría la existencia de un receptor soluble a dicho esteroide, tal como hemos comentado anteriormente. Por otra parte, el 3β -Adiol actuaría paralelamente por un segundo mecanismo: por la estimulación de la guanilciclase.

V. CONCLUSIONES

1. Las biopsias de cuero cabelludo en pacientes con hipertrofia seboreica masculina, son un excelente modelo experimental para investigar las desviaciones del metabolismo local de andrógenos.

2. En nuestras experiencias hemos demostrado que la testosterona se convierte en DHT y androstendiona, tanto en zonas con hipertrofia sebácea como en zonas con secreción sebácea normal. La actividad enzimática responsable muestra grandes variaciones interindividuales.

3. La actividad 5α -R de la zona alopécica es significativamente superior a la actividad de dicho enzima en la zona no alopécica, mientras que la actividad 17β -HSOR, en cambio, es significativamente superior en la zona no alopécica.

4. Hemos demostrado también, que la DHT se transforma en $3\alpha(\beta)$ -Adioles, por la acción de la $3\alpha(\beta)$ -HSOR y también en androstandiona por la acción de la 17β -HSOR. Dichas actividades enzimáticas son también muy variables de un individuo a otro.

5. En todos los tejidos estudiados, la actividad $3\alpha(\beta)$ -HSOR es superior para el isómero β , siendo dicha actividad más elevada en los tejidos alopecicos con hipertrofia sebácea, mientras que la actividad 17β -HSOR es superior en las zonas no alopecicas.

6. De los esteroides estudiados, el único que presenta una actividad compatible con la existencia de un receptor soluble específico en la glándula sebácea, es el 3β -Adiol.

7. La actividad de la guanilciclase es patente en todas las muestras estudiadas, siendo netamente superior en las zonas alopecicas con hipertrofia sebácea. Dicha actividad es inducible por el 3β -Adiol.

8. Resultados previos, junto con los aquí expuestos, refuerzan la hipótesis de que el 3β -Adiol sería el verdadero metabolito activo de la testosterona, directamente responsable de la secreción sebácea. La mayor actividad del sistema 3β -HSOR sería la causa de la hipertrofia sebácea y la consiguiente seborrea.

9. La androstendiona es capaz de inhibir la actividad de la 3β -HSOR, con una K_I similar a la K_M del enzima. Este hecho junto con la mayor actividad 17β -HSOR observada en la zona no alopecica, sugiere que la androstendiona sería el frenador fisiológico de la secreción sebácea.

10. Así pues la hipertrofia sebácea de la ASM sería debida a un desequilibrio entre la actividad de la 3β -HSOR y la 17β -HSOR, a favor de la primera, lo cual generaría un aumento de 3β -Adiol, responsable directo de dicha hipertrofia.

11. Estos resultados junto con otros obtenidos previamente, demostrarían que estas desviaciones enzimáticas serían al menos simultáneas, si no secundarias, a un fenómeno de mayor captación de SHBG unida a la testosterona circulante a nivel de la glándula sebácea hipertrófica.

12. Los estudios de inhibición de la 3β -HSOR, no sólo permiten obtener la conclusión 9., sino que abren una nueva vía de abordaje para el tratamiento de los trastornos androgénicos locales, debidos al exceso de actividad de dicho enzima. De esta manera se obtendría un efecto mucho más selectivo sobre el proceso afectado, que con los fármacos utilizados actualmente como inhibidores de la 5α -R.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Bruchovsky, N., Wilson, J.D.: The conversion of testosterone to 5 α -androstane-17 β -ol-3-one by rat prostate in vivo and in vitro. *J Biol Chem*, 1968, 243:2012-2021.
2. Parvinen, M., Hurne, P., Niemi, M.: Penetration of exogenous testosterone, pregnenolone, progesterone and cholesterol into the seminiferous tubules of rats. *Endocrinology*, 1970, 87:1082-1084.
3. Bardin, C.W.: Pituitary-testicular axis. In: Yen, S. & Jaffe, R. eds.: *Reproductive endocrinology*. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1978:110-125.
4. Eik-Nes, K.B.: Biosynthesis and secretion of testicular steroids. In: Hamilton, D.W. & Greep R.O. eds.: *Handbook of Physiology: Endocrinology: Male reproductive system*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1975:95-116.
5. Mahoudeau, J.A., Barding, C.W., Lipsett, M.B.: The metabolic clearance rate and origin of plasma dihydrotestosterone in man and its conversion to the 5 α -androstane-3 α -diol. *J Clin Invest*, 1971, 50:1338-1344.
6. Eik-Nes, K.B., Hall, P.F.: The action of pregnant mare serum on the production of testosterone in vivo and in vitro. *J Reprod Fertility*, 1965, 9:233-241.
7. Eik-Nes, K.B.: Synthesis and secretion of androstendione and testosterone. In: Eik-Nes, K.B. ed.: *The androgens of the testis*. New York: Dekker, 1970:10-14.
8. Connell, J.M., Eik-Nes, K.B.: Testosterone production by rabbit testis slices. *Steroids*, 1966, 12:507-516.
9. Eik-Nes, K.B.: Secretion of testosterone in anesthetized dogs. *Endocrinology*, 1962, 71:101-106.
10. Eik-Nes, K.B.: Factors controlling the secretion of testicular steroids in the dog. *J Reprod Fertility*, 1967, suppl. 2:125-141.
11. Eik-Nes, K.B.: Production and secretion of testicular steroids. *Recent Progr Hormone Res*, 1971, 27:517-535.
12. Rosner, W., Smith, R.N.: Isolation and characterization of the testosterone-estradiol binding globulin from human plasma: Use of a novel affinity column. *Biochemistry*, 1975, 14:4813-4820.

13. Iqbal, M.J., Jhonson, M.W.: Purification and characterization of human sex hormone binding globulin. *J Steroid Biochem*, 1979, 10:535-540.
14. Mickelson, K.E., Teller, C.D., Petra, P.H.: Characterization of the sex steroid binding protein of human pregnancy serum. Improvements in the purification procedure. *Biochemistry*, 1978, 17:1409-1415.
15. Mischke, W., Weise, H.C., Grasslin, D., Rusch, R., Tamm, J.: Isolation of highly purified sex hormone binding globulin (SHBG): Evidence for microheterogeneity. *Acta Endocrinol*, 1979, 90:737-742.
16. Rosner, W.: The binding of steroid hormones in human serum. In: Jamieson, G.A., Greenwalt, T.J. & Liss A.R. eds.: Trace components of plasma, isolation and clinical significance. Vol. V. New York: Alan R. Liss, Inc., 1976:337-395.
17. Nisula, B.C., Dunn, F.J.: Measurement of the testosterone binding parameters for both testosterone-estradiol binding globulin and albumin in individual serum samples. *Steroids*, 1979, 34:771-791.
18. Vermeulen, A., Verdonck, L., Van der Straeten, M., Orie, N.: Capacity of the testosterone binding globulin in human plasma and influence of specific binding of testosterone on its metabolic clearance rate. *J Clin Endocrinol Metab*, 1969, 29:1470-1480.
19. Lobl, T.J.: Androgen transport proteins: physical properties, hormonal regulation, and possible mechanism of TeBG and ABP action. *Arch Andrology*, 1981, 7:133-151.
20. Wagner, R.K.: Extracellular steroid binding proteins. Properties, discrimination, assay and clinical application. *Acta Endocrinol*, 1978, suppl., 218:5-73.
21. Bradlow, H.L., Gillete, P.N., Gallagher, T.F., Kappas, A.: Studies in porphyrin. II Evidence for a deficiency of steroid Δ^4 -5 α -reductase activity in acute intermittent porphyria. *J Exp Med*, 1973, 138:754-763.

22. Bradlow, H.L., Anderson, K., Kappas, A.: Differences between cutaneous and hepatic steroid Δ^4 -5 α -reductase in patients with acute intermittent porphyria. In: Dos, M. & Lahn, M. eds.: Porphyrins in Human Diseases. Basel: S. Karger, 1976:173-178.
23. Lipsett, M.B., Wilson, H., Kirschner, M.A., Korenman, S.G., Fishman, L.M., Safarty, G.A., Bardin, C.W.: Studies on Leydig cell physiology and pathology: Secretion and metabolism of testosterone. *Recent Prog Horm Res*, 1966, 22:245-281.
24. Kochakian, C.D.: Definition of androgens and protein anabolic steroids. *Pharmacol Ther*, 1975, 1:149-177.
25. Bardin, C.W., Bullock, L.P., Mills, N.C., Lin, Y.C., Jacob, S.T.: The role of receptors in the anabolic action of androgens. *Receptors Horm Action*, 1978, 2:83-103.
26. Boyar, R. M.: Control of the onset of puberty. *Ann Rev Med*, 1978, 29:509-520.
27. Simon, N.G., Walen, R.E.: Hormonal regulation of aggression: Evidence for a relationship among genotype receptor binding, and behavioral sensitivity to androgen and estrogen. *Aggressive Behavior*, 1984, 12:255-266.
28. Krieger, N.R., Scott, R.G., Jurman, M.E.: Testosterone 5 α -reductase in rat brain. *J Neurochem*, 1983, 40:1460-1464
29. Wilson, J.D.: Gonadal hormones and sexual behavior. In: Martini, L. & Besser, G.M. eds.: *Clinical Neuroendocrinology*, Vol. II. New York: Academic Press, 1982:1-19.
30. Sachs, B.D., Pollak, E.I., Kreiger, M.S., Barfield, M.J.: Sexual behavior: normal male patterning in androgenized female rats. *Science*, 1973, 181:770-772.
31. Anderson, K.M., Liao, S.: Selective retention of dihydrotestosterone by prostate nuclei. *Nature*, 1968, 219:277-279.
32. Wilson, J.D., Walker, J.A.: the conversion of testosterone to dihydrotestosterone by skin slices of man. *J Clin Invest*, 1969, 48:371-379.

33. Kutteen, F., Mauvais-Jarvis, P.: Testosterone 5 α -reduction in the skin of normal subjects and of patients with abnormal sex development. *Acta Endocrinol*, 1975, 79:164-176.
34. Takayasu, S., Wakimoto, H., Itani, S., Sano, Y.: Activity of testosterone 5 α -reductase in various tissues of human skin. *J Invest Dermatol*, 1980, 74:187-191.
35. Schweikart, H.U., Wilson, J.D.: Regulation of human hair growth by steroid hormones. 1. Testosterone metabolism in isolated hairs. *J Clin Endocrinol Metab*, 1974, 38:811-827.
36. Miyazaki, M., Takayasu, S., Karakawa, T., Aono, T., Kurachi, D., Matsumoto, K.: Activity of testosterone 5 α -reductase in the hair follicles of women with polycystic ovaries. *J Endocrinol*, 1978, 78:445-446.
37. Bingham, K.D., Shaw, D.A.: The metabolism of testosterone by human male scalp skin. *J Endocrinol*, 1973, 57:111-121.
38. Stewart, M.E., Pochi, P.E., Strauss, J.S., Wotiz, H.H., Clark, S.J.: In vitro metabolism of ³H-testosterone by scalp and back skin: conversion of testosterone into 5 α -androstane-3 β -17 β -diol. *J Endocrinol*, 1977, 72:385-390.
39. Robel, P., Lasnitzki, I., Baulieu, E.-E.: Hormone metabolism and action: testosterone and metabolites in prostate organ culture. *Biochimie*, 1971, 53:81-96.
40. Schmidt, H., Giba-Tziampiri, O., Rottech, G.V., Voigt, K.D.: Metabolism and mode of action of androgens in target tissue of male rats. IV. Mode of action of 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol at a cellular level on seminal vesicles and prostates of rats. *Acta Endocrinologica*, 1973, 73:599-611.
41. Ebling, F.J., Ebling, E., McCaffery, V., Skinner, J.: The responses of the sebaceous gland of the hypophysectomized-castrated male rat to 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol. *J Invest Dermatol*, 1973, 60:183-187.
42. Hay, J.B., Hodgins, M.B.: Metabolism of androgens by human skin in acne. *Br J Dermatol*, 1974, 91:123-133.

43. Northcutt, R.C., Island, D.P., Little, G.W.: An explanation for the target organ unresponsiveness to testosterone in the testicular feminization syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 1969, 29:422-425.
44. Adachi, K., Kano, M.: Adenyl cyclase in human hair follicles. Its inhibition by dihydrotestosterone. *Biochem Biophys Res Commun*, 1970, 41:884-890.
45. Takayasu, S., Adachi, K.: The conversion of testosterone to 17β -hydroxy- 5α -androstan-3-one (dihydrotestosterone) by human hair follicles. *J Clin Endocrinol Metab*, 1972, 34:1098-1101.
46. Adachi, K., Takayasu, S., Takashima, I., Kano, M., Kondo, S.: Human hair follicles: metabolism and its control mechanism. *J Soc Cosmet Chem*, 1970, 21:901-924.
47. Adachi, K.: The metabolism and control mechanism of human hair follicles. *Curr Probl Dermatol*, 1973, 5:37-78.
48. Fazekas, A.G., Lanthier, A.: Metabolism of androgens by isolated beard hair follicles. *Steroids*, 1971, 18:367-379.
49. Sutherland, E.W., Robison, G.: The role of cyclic 3'-5'-AMP in responses to catecholamines and other hormones. *Pharmacol Rev*, 1966, 18:145-161.
50. Sutherland, E.W., Robinson, G.A., Butcher, R.W.: Some aspects of the biological role of adenosin 3'-5'-monophosphate (cyclic AMP). *Circulation*, 1968, 37:279-306.
51. Maes, M., Sultan, C.H., Zerhouni, N., Rothwell, S.W., Migeon, C.J.: Role of testosterone binding to the androgen receptor in male sexual differentiation patients with 5α -reductase deficiency. *J Steroid Biochem*, 1979, 11:1385-1391.
52. Keenan, B.S., Meyer, W.J., Hadjian, A.J., Migeon, C.J.: Androgen receptor in human skin fibroblasts: Characterization of a specific 17β -hydroxy- 5α -androstan-3-one protein complex in cell sonicates and nuclei. *Steroids*, 1975, 25:535-542.

53. Kaufman, M., Pinsky, L.S., Schwartz, A., Long-Simpson, L.: Possible implications of de comparative dissociative behavior of testosterone and 5 α -dihydrotestosterone-receptor complexes formed by human skin fibroblasts. *J Steroid Biochem*, 1983, 19:561-565.
54. Liao, S.: Molecular action of androgens. In: Litwazk, G. ed.: *Biochemical action of hormones*. New York: Academic Press, 1977:351-406.
55. Mainwaring, W.I.P., Mangan, F.R.: A study of the androgen receptors in a variety of androgen-sensitive tissues. *J Endocrinol*, 1973, 59:121-139.
56. Rennie, P.S., Van Doorn, E., Bruchovsky, N.: Methods for estimating the concentration of different forms of androgen receptor in rat ventral prostate. *Mol Cell Endocrinol*, 1977, 9:145-157.
57. Wilson, E.M., French, F.S.: Effects of proteases and proteases inhibitors on the 4.5 S and 8 S androgen receptor. *J Biol Chem*, 1979, 254:6310-6319.
58. Chang, C.H., Rowley, D.R., Lobl, T.J., Tindall, D.J.: Purification and characterization of androgen receptor from steer seminal vesicle. *Biochemistry*, 1982, 21:4102-4109.
59. Bardin, C.W., Catterall, J.F.: Testosterone: a major determinant of extra genital sexual dimorphism. *Science*, 1981, 211:1285-1294.
60. Chan, L., O'Malley, B.W.: Mechanism of action of the sex steroid hormones. *N Engl J Med*, 1976, 294:1322-1328; 1372-1381; 1430-1437.
61. Chan, L., O'Malley, B.W.: Steroid hormone action: Recent advances. *Ann Int Med*, 1978, 89:694-701.
62. Muldoon, T.G.: Regulation of steroid hormone receptor activity. *Endocrinol Rev*, 1980, 1:339-364.
63. Bardin, C.W., Brow, T.R., Mills, N.C., Gupta, C., Bullock, L.P.: The regulation of the β -glucuronidase gene by androgens and progestens. *Biol Reprod*, 1978, 18:74-83.

64. Pajunen, A.E.I., Isomaa, V.V., Jänne, O.A., Bardin, C.W.: Androgenic regulation of ornithine decarboxylase activity in mouse kidney and its relationship to changes in cytosol and nuclear androgen receptor concentrations. *J Biol Chem*, 1982, 257:8190-8198.
65. Swank, R.T., Paigen, K., Davey, R., Chapman, V., Labarca, C.: Genetic regulation of mammalian glucuronidase. *Recent Prog Horm Res*, 1978, 34:401-436.
66. Barthe, P.L., Bullock, L.P., Howszowicz, I., Bardin, C.W.: Submaxillary gland epidermal growth factor: A sensitive index of biologic androgen action. *Endocrinology*, 1974, 95:1019-1025.
67. Ebling, F.J.: The action of testosterone and estradiol on the sebaceous glands and epidermis of the rat. *J Embryol Exptl Morphol*, 1957, 5:74-82.
68. Ebling, F.J.: The action of testosterone on the sebaceous gland and epidermis in castrated and hypophysectomized male rats. *J Endocrinol*, 1957, 15:297-306.
69. Lapierre, C.: Changes induced in the sebaceous glands by sex hormones applied locally to the skin of the mouse. *C Rend Soc Biol*, 1953, 147:1302-1306.
70. Archibald, A., Shuster, S.: Measurement of sebum secretion in the rat. *J Dermatol*, 1970, 82:146-151.
71. Ebling, F.J.: The action of an antiandrogenic steroid 17 α -methyl-B-nortestosterone on sebum secretion in rats treated with testosterone. *J Endocrinol*, 1967, 38:181-185.
72. Ebling, F.J., Skinner, J.: The measurement of sebum production in rats treated with testosterone and estradiol. *Br J Dermatol*, 1967, 79:386-388.
73. Hamilton, J.B.: Male hormone substance: a prime factor in acne. *J Clin Endocrinol Metab*, 1941, 1:570-592.
74. Strauss, J.S., Kligman, A., Pochi, P.E.: The effect of androgens and estrogens on human sebaceous glands. *J Invest Dermatol*, 1962, 39:139-156.

75. Hamilton, J.B., Mestler, G.E.: Low values for sebum in eunuchs and oophorectomized women. *Proc Soc Exp Med Biol*, 1963, 112:374-378.
76. Pochi, P.E., Strauss, J.S.: Sebaceous gland function before and after bilateral orchiectomy. *Arch Dermatol*, 1963, 88:729-731.
77. Cooper, M.I., McGibbon, D., Wilson, F.D., Shuster, S.: Androgenic control of the human sebaceous gland. *J Invest Dermatol*, 1979, 72:267.
78. Robel, P., Blondeau, J.-P., Baulieu, E.-E.: Androgen receptors in rat ventral prostate microsomes. *Biochim Biophys Acta*, 1974, 373:1-9.
79. Vesely, D.L.: Testosterone and its precursors and metabolites enhance guanylate cyclase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76:3491-3494.
80. Jenkins, J.S., Ash, S.: The metabolism of testosterone by skin in normal subjects and in testicular feminization. *J Endocrinol*, 1971, 49:515-520.
81. Walsh, P.C., Madden, J.D., Harrod, M.J., Goldstein, J.L., McDonald, P.C., Wilson, J.D.: Familial incomplete male pseudohermaphroditism type 2. Decreased dihydrotestosterone formation in pseudovaginal perineoscrotal hypospadias. *N Engl J Med*, 1974, 291:944-949.
82. Moore, R.J., Griffin, J.E., Wilson, J.D.: Diminished 5 α -reductase activity in extracts of fibroblasts cultured from patients with familial incomplete male pseudohermaphroditism type 2. *J Biol Chem*, 1975, 250:7168-7172.
83. Gardo, S., Papp, Z.: Clinical variations of testicular intersexuality in a family. *J Med Gen*, 1974, 11:267-270.
84. Imperato-McGinley, J., Guerrevo, L., Gautier, T., Peterson, R.E.: Steroid 5 α -reductase deficiency in man: inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science*, 1974, 186:1213-1215.

85. Hamilton, J.B.: I Coarse sternal hairs, a male secondary sex character that can be measured quantitatively: The influence of sex age and genetic factors. II Other sex-differing characters: Relationship to age, to one mother, and values of coarse sternal hairs. In: Montagna, W. & Dobson, R.C. eds.: *Advances in Biology of Skin. Hair Growth*. Vol 9. Oxford: Pergamon Press, 1969:129-151.
86. Hamilton, J.B.: Male hormone stimulation in prerequisite and an incitant in common baldness. *Amer J Anat*, 1942, 71:451-480.
87. Myers, R.J., Hamilton, J.B.: Regeneration and rate of growth of hairs in man. *Ann NY Acad Sci*, 1951, 53:562-568.
88. Saitoh, M.: Rate of hair growth. In: Montagna, W. & Dobson, R.C. eds.: *Advances in Biology of Skin. Hair Growth*. Vol 9. Oxford: Pergamon Press, 1969:183-201.
89. Winter, J.S.D., Faiman, C.: Pituitary-gonadal relations in female children and adolescents. *Pediat Res*, 1973, 7:948-953.
90. Tanner, J.M., Whitehouse, R.H.: Growth and growth hormone. Pecile A. & Müller E.E. eds. Amsterdam: Excerpta Medica, 1972:429-432.
91. Hamilton, J.B.: Biology of hair growth. Montagna, W. & Ellis R.A. eds. New York: Academic Press, 1958:399-412.
92. Cittadini, E., Barreca, P.: Androgens and antiandrogens. Martini, L. & Motta, M. eds. New York: Raven Press, 1977.
93. Greene, R.S.: Anatomical variation in the amount and composition of human skin surface lipid. *J Invest Dermatol*, 1970, 54:240-247.
94. Emanuel, S.: Quantitative determinations of the sebaceous glands function with particular mention of method employed. *Acta Dermato-Venerol*, 1936, 17:444-456.
95. Emanuel, S.: Mechanism of the sebum secretion. *Acta Dermato-Venerol*, 1938, 19:1-15.

96. Kligman, A.M., Shelley, W.B.: An investigation of the biology of human sebaceous gland. *J Invest Dermatol*, 1958, 30:99-125.
97. Montagna, W., Ford, D.M.: Histology and cytochemistry of human skin. *Arch Dermatol*, 1969, 100:328-335.
98. Ponten, B.: Grafted skin. Observations on innervation and other qualities. *Acta Chir Scan*, 1960, suppl. 257:1-78.
99. Pochi, P.E., Strauss, J.S.: Endocrinologic control of the development and activity of the human sebaceous gland. *J Invest Dermatol*, 1974, 62:191-201.
100. Strauss, J.S., Pochi, P.E.: The hormonal control of human sebaceous glands. In: Montagna, W, & Ellis, R.A. eds.: *Advances in Biology of Skin. Vol IV. The Sebaceous Glands*. Oxford: Pergamon Press, 1963:220-254.
101. Ebling, F.J.: The effects of cyproterone acetate and oestradiol upon testosterone stimulated sebaceous activity in the rat. *Acta Endocrinol*, 1973, 72:361-365.
102. Shuster, S. Thody, A.J.: The control and measurement of sebum secretion. *J Invest Dermatol*, 1974, 62:172-190.
103. Mauvais-Jarvis, P. Kuttann, F., Baudot, N.: Inhibition of testosterone conversion to dihydrotestosterone in men treated percutaneously by progesterone. *J Clin Endocrinol Metab*, 1974, 38:142-147.
104. Voigt, W., Hsia, S.L.: Further studies on testosterone 5 α -reductase of human skin : Structural features of steroids inhibitors. *J Biol Chem*, 1973, 248:4280-4285.
105. Goolomadi, S.K., Evered, D., Shuster, S.: Thyroid disease and sebaceous function. *Br Med J*, 1976, 1:432-433.
106. Burton, J.L., Libman, L.J., Cunliffe, W.J., Wilkinson, R., Hall, R., Shuster, S.: Sebum secretion in acromegaly. *Br Med J*, 1972, 1:406-408.
107. Thody, A.J., Shuster, S.: A study of the relationship between the thyroid gland and sebum secretion in the rat. *J Endocrinol*, 1972, 54:239-244.

108. Cooper, M.F., Thody, A.J., Shuster, S.: Hormonal regulation of cutaneous lipogenesis: effects on hypophysectomy, posterior-hypophysectomy and alpha-melanocyte-stimulating hormone treatment. *Biochim Biophys Acta*, 1974, 360:193-204.

109. Thody, A.J., Cooper, M.F., Bowden, P.E., Meddis, D., Shuster, S.: Effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone and testosterone on cutaneous and modified sebaceous gland in the rat. *J Endocrinol*, 1976, 71:279-288.

110. Thody, A.J., Meddis, D., Shuster, S.: The sebotropic action in adult rats of alpha-melanocyte-stimulating hormone given in foetal or early life. *J Endocrinol*, 1977, 72:28.

111. Cooper, M.F., Bowden, P.E., Meddis, D., Thody, A.J., Shuster, S.: Effects of testosterone and alpha-melanocyte-stimulating hormone on preputial gland sebaceous activity. *Biochem Soc trans*, 1977, 4:798-800.

112. Burton, J.L., Shuster, S., Cartlidge, M.: The sebotropic effect of pregnancy. *Acta Dermato-Vener* 1975, 55:11-13.

113. Shuster, S., Thody, A.J., Goolomali, S.K., Burton, J.L., Plummer, N.A., Bates, D.: Melanocyte-stimulating hormone and parkinsonism. *Lancet i*, 1973, :463-465.

114. Burton, J.L., Cartlidge, M., Shuster, S.: Effect of 1-DOPA on the seborrhoea of parkinsonism. *Br J Dermatol*, 1973, 88:475-479.

115. Thody, A.J., Shuster, S.: The anterior pituitary and sebum secretion in the rat. *J Endocrinol*, 1972, 54:519-520.

116. Moore, R.J., Wilson, J.D.: Hormon action. Part A. In: O'Malley, B.W. & Hardman, J.G. eds.: *Methods in enzymology*. Vol XXXVI. New York: Academic Press, 1975:466-474.

117. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193:265-275.

118. Palmer, G.C., Palmer, S.J., Legendre, J.L.: Guanylate cyclase - cyclic GMP in mouse cerebral cortex and cerebellum: Modification by anticonvulsants. *Exp Neurol*, 1981, 71:601-614.
119. Pearlman, W.H., Pearlman, M.R.J.: The metabolism in vivo of Δ^4 -androst-3,17-dione- 3 H; its localization in the ventral prostate and other tissues of the rat. *J Biol Chem*, 1961, 236:1321.
120. Gloyne, R.E., Wilson, J.D.: A comparative study of the conversion of testosterone to 17 β -hydroxy-5 α -androst-3-one (dihydrotestosterone) by prostate and epididymus. *J Clin Endocrinol*, 1969, 29:970.
121. Mauvais-Jarvis, P., Bercovici, J.R., Gauthier, F.: In vivo studies on testosterone metabolism by skin of normal males and patients with the syndrome of testicular feminization. *J Clin Endocrinol Metab*, 1968, 29
122. Mowszowicz, I., Melanitou, E., Doukani, A., Wright, F., Kuttan, F., Mauvais-Jarvis, P.: Androgen binding capacity and 5 α -reductase activity in pubic skin fibroblasts from hirsute patients. *J Endocrinol Metab*, 1983, 56:1209-1213.
123. Sally, P., Glickman, M.D., Rosenfield, R.L.: Androgen metabolism by isolated hairs from women with idiopathic hirsutism is usually normal. *J Invest Dermatol*, 1984, 82:62-66.
124. Sansons, G., Reisner, R.M.: Differential rates of conversion of testosterone to DHT in acne in normal human skin. A possible pathogenic factor in acne. *J Invest Dermatol*, 1971, 56:366-372.
125. Randall, V.A., Ebling, F.J.: In the metabolism of testosterone to 5 α -dihydrotestosterone required for androgen action in the skin. *Brit J Dermatol*, 1982, 23:47-53.
126. Celotti, F., Massa, R., Martini, L.: Metabolism of sex steroids in the central nervous system. *Endocrinology*; 1979, 1:41-53.
127. Martini, L.: The 5 α -reduction of testosterone in the neuroendocrine structures. Biochemical and physiological implications. *Endocrinol Rev*, 1982, 3:1-25.

128. Krieger, N.R., Scott, R.G.: 3 α -hydroxysteroid oxidoreductase in rat brain. *J Neurochem*, 1984, 42:887-890.
129. Erulkar, S.D., Kelley, D.B., Jurman, M.E., Zemlan, F.P., Schneider, G., Krieger, N.R.: Modulation of the neuronal control of the clasp reflex in male *Xenopus laevis* by androgens: A multidisciplinary study. *Proc Natl Acad Sci-USA*, 1981, 78:5876-5880.
130. Maclusky, N.J., Naftolin, F.: Sexual differentiation of the central nervous system. *Science*, 1981, 211:1294-1318.
131. Kaufman, M., Pinsky, L.: The dissociation of testosterone and 5 α -dihydrotestosterone-receptor complexes formed within cultured human genital skin fibroblasts. *J Steroid Biochem*, 1983, 18:121-125.
132. Kaufman, M., Pinsky, L., Hollander, R., Bailey, J.D.: regulation of the androgen receptor by androgen in normal and androgen-resistant genital skin fibroblasts. *J Steroid Biochem*, 1983, 18:383-390.
133. Eil, C., Lippman, M.E., De Moss, E.V., Loriaux, D.L.: Androgen receptor characteristics in skin fibroblasts from men with pubertal macromastia. *Clin Endocrinol*, 1983, 19:223-230.
134. Marcelo, C.L., Duell, E.A., Stawiski, M.A., Anderson, T.F., Voorhees, J.J.: Cyclic nucleotide levels in psoriatic and normal keratinized epidermis. *J Invest Dermatol*, 1979, 72:20.
135. Cantieri, J.S., Graff, G., Goldberg, N.D.: Cyclic GMP metabolism in psoriasis: Activation of soluble epidermal guanylate cyclase by arachidonic acid and 12-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid. *J Invest Dermatol*, 1980, 74:234.
136. Morfin, R.F., Di Stefano, S., Bercovici, J.P., Floch, H.H.: Comparison of testosterone, 5 α -dihydrotestosterone and 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol metabolisms in human normal and hyperplastic prostates. *J Steroid Biochem*, 1978, 9:245-252.

137. Lundmo, P.I., Sunde, A., Tveter, K.J.: Metabolism of androgens in the seminal vesicles and the different lobes of the prostate in young mature rats. *J Steroid Biochem*, 1985, 22:513-519.
138. Monsalve, A., Blaquier, J.A.: Partial characterization of epididimal 5 α -reductase in the rat. *Steroids*, 1977, 30:41-51.
139. Smitch, K., Krieg, M., Schwien, S.: In vitro metabolism of 5 α -dihydrotestosterone to 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol in rat heart, diaphragm, skeletal muscle and bulbocavernosus/levator ani: Enzyme characterization and quantification. *J Steroid Biochem*, 1980, 13:917-924.
140. Liukao, L.W., Crosswell, M.J., Weisz, J.: Steroid metabolism by the lung: Conversion of dihydrotestosterone to 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol by rat lung tissue in vitro. *Endocrinology*, 1979, 104:664-666.
141. Isaac, J.T., Coffey, S.D.: Changes in dihydrotestosterone metabolism associated with the development of canine benign prostatic hyperplasia. *Endocrinology*, 1981, 108:445-453.
142. Nakazawa, K., Sano, M., Saito, T.: Subcellular distribution and properties of guanylate cyclase in rat cerebellum. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 444:563-570.
143. Chrisman, T.D., Garbers, D.L., Parks, M.A., Hardman, J.G.: Characterization of particulate and soluble guanylate cyclases from rat lung. *J Biol Chem*, 1974, 250:374-381.
144. Böehme, E., Jung, R., Mechler, I. 1974, *Methods Enzymol.* 38C:199-202. Citado en: Nelson, D., Goldberg, N., Haddox, M.K.: Cyclic GMP metabolism and involvement in biological regulation. *Ann Rev Biochem*, 1977, 46:823-896.
145. White, A.A., Crawford, K.H., Patt, C.S., Lad, P.J.: Activation of soluble guanylate cyclase from rat lung by incubation or by hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, 1976, 251:7304-7312.

146. Schweiker, H., Totzauer, P., Rohr, H.-P., Bartsch, G.: Correlated biochemical and sterological studies on testosterone metabolism in the stromal and epithelial compartment of human benign prostatic hyperplasia. *J Urol*, 1985, 134:403-407.
147. Sirett, D.A.N., Quivy, J.I., Foret, D., Jacquemyns, C.F.R., Rousseau, G.G.: Effects of dicyclohexane derivatives on androgen metabolism in the rat prostate. *J Steroid Biochem*, 1985, 23:497-501.
148. Chung, K.W.: Effect of ethanol on androgen metabolism and receptors in the rat ventral prostate. *Res Commun Subs Abuse*, 1985, 6:47-57.
149. Mowszowicz, I., Kirchhoffer, M.O., Kuttan, F., Mauvais-Jarvis, P.: Testosterone 5 α -reductase activity of skin fibroblasts, increase with serial subcultures. *Mol Cell Endocrinol*, 1980, 17:41-50.
150. Serafini, P., Ablan, F., Lobo, R.A.: 5 α -reductase activity in the genital skin of hirsute women. *J Clin Endocrinol Metab*, 1985, 60:349-354.
151. Sansone-Bazzano, G., Reisner, R.M., Bazzano, G.: Metabolism of testosterone by isolated human hair follicles. *Clin Res*, 1971, 19:169.
152. Sharp, F., Hay, J.B., Hodgings, M.B.: Metabolism of androgens in vitro by human foetal skin. *J Endocrinol*, 1976, 70:491-499.
153. Takayasu, S., Adachi, K.: The in vivo and in vitro conversion of testosterone to 17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-one (dihydrotestosterone). *Endocrinol*, 1971, 90:73-80.
154. Hudson, R.W.: Kinetic studies of the synthesis and metabolism of dihydrotestosterone in hyperplastic and malignant human prostatic tissues. *Fert Steril*, 1981, 36:722-725.
155. Braun, B.E., Krieg, M.: Sexual activity influences organ weight and androgen metabolism of rat prostate, bulbocavernosus/levator ani muscle and kidney. *J Steroid Biochem*, 1983, 19:1763-1768.

156. Caballero, M.J., Puerto, A.M., Mallol, J.: Contribución a la fisiopatología androgénica. *Rev Farmacol Clin Exp*, 1985, 2:285.
157. Foekens, J.A., Mulder, E., Vrij, L., Van der Molen, M.J.: Purification of the androgen receptor of sheep seminal vesicle. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982, 104:1279-1286.
158. Jänne, O.A., Bardin, C.W.: Androgen and antiandrogen receptor binding. *Ann Rev Physiol*, 1984, 46:107-118.
159. Lad, P.M., Glovsky, M.M., Richards, J.H., Smiley, P.A., Backstrom, B.: Regulation of human neutrophil guanylate cyclase by metal ions, free radicals and the muscarinic cholinergic receptor. *Mol Immunol*, 1985, 22:731-739.
160. Amechi, D.A., Butterworth, P.J., Thomas, P.J.: Effects of gonadal steroids on guanylate cyclase activity in the developing and adult brain. *Brain Res*, 1985, 342:158-161.
161. Vesely, D.L.: Cation dependence substance P. Activation of the enzyme guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Comm*, 1985, 128:141-147.
162. Mauvais-Jarvis, P., Kuttann, F., Mowszowicz, I.: *Hirsutismo*, 1981. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.
163. Wilson, J.D.: Dihydrotestosterone formation in cultured human fibroblasts: Comparison of cells from normal subjects and patients with familial incomplete male pseudohermaphroditism. Type II. *J Biol Chem*, 1975, 250:3498-3504.
164. Perel, E., Daniilescu, D., Kindler, S., Kharlip, L., Killinger, D.W.: The formation of 5α -reduced androgens in stromal cells from human breast adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab*, 1986, 62:314-318.
165. Danzo, B.J., Eller, B.C.: The effects of various steroids on testosterone metabolism by the sexually mature rabbit epididymis. *Steroids*, 1985, 44:435-445.

VII. ABREVIATURAS

ICSH: Hormona estimulante de las células intersticiales.
HCG: Gonadotropina coriónica humana.
FSH: Hormona foliculo-estimulante.
ATP: Adenosin trifosfato.
AMPc: Adenosin monofosfato cíclico.
GTP: Guanosin trifosfato.
GMPc: Guanosin monofosfato cíclico.
DNA: Acido desoxiribonucleico.
mRNA: Acido ribonucleico mensajero.
BSA: Seroalbúmina bovina.
SHBG: Sex hormon binding globulin.
MSH: Hormona estimulante de los melanocitos.
DHT: Dihidrotestosterona: 17β -hidroxi 5α -androstan 3-ona.
T: Testosterona: 17β -hidroxi 4-androsten 3-ona.
A: Androstendiona: 4-androsten 3,17-diona.
 5α -A: Androstandiona: 5α -androstan 3,17-diona.
An: Androsterona: 3α -hidroxi 5α -androstan 17-ona.
IsoAn: Isoandrosterona: 3β -hidroxi 5α -androstan 17-ona.
ABP: Androgen binding protein.
PBP: Prostate binding protein.
 $3\alpha(\beta)$ -Adiol: 5α -androstan $3\alpha(\beta)$, 17β -diol.
 $3\alpha(\beta)$ -HSOR: $3\alpha(\beta)$ -hidroxiesteroide oxidoreductasa.
 17β -HSOR: 17β -hidroxiesteroide oxidoreductasa.
 5α -R: 5α -reductasa.