Respuesta *in vitro* de fibroblastos de piel genital humana a andrógenos

Mireya Fernández G.¹; Ximena Vivanco W.²;
Marcela Palma M.³; Ana María Pino Z.⁴

"In vitro" response of fibroblasts from genital skin to androgens

Defects of androgen receptor gene (Xc 11-12) lead to cellular insensitivity to these steroids. Androgen action is currently measured "in vitro" in cultures of fibroblasts from genital skin, since expression of the androgen receptor occurs in these cells. This method has not been usually available in Chile. This work was aimed to develop and apply a method to study androgen binding and response properties in normal 46XY, hypospadias and androgen insensitive individuals. Cell cultures of our subjects showed the typical properties of fibroblasts, and their androgen binding indicators were similar to those previously reported. Mean dissociation constant was $4.02 \pm 3.4 \times 10^{-10}$ M. Mean maximal binding capacity in normal controls (41.3 ± 23 fmol/mg prot.) was not different from that of patients with hypospadias or androgen insensitivity (39.3 ± 32 y 34.1 ± 20 , respectively), but binding after androgen treatment for 24 h was significantly higher in controls than in both kinds of patients. Thus, this method seems to be valuable to identify some useful criteria in the diagnosis of defects in androgen action.

(Key words: androgen insensitivity, androgen receptor, insensitivity diagnosis, fibroblasts culture.)

Para la diferenciación masculina se requiere la acción de los andrógenos testosterona (T) y 5 α -dihidrotestosterona (DHT), que determinan el fenotipo masculino al nacimiento (masculinización) y el desarrollo sexual secundario en la pubertad (virilización). El efecto de los andrógenos en las células sensibles es mediado por el receptor de andrógenos (RA), una proteína nuclear de la familia de los receptores de hormonas tiroideas, esteroides, vitamina D y ácido retinoico; todos ellos son factores de transcripción

activados por el ligando específico y se caracterizan por compartir una organización estructural común^{1,2}. En humanos, el gen para el RA codifica una proteína de peso molecular aparente de 110 a 114 kDa y 910 a 919 aminoácidos. Las funciones características del RA parecen asociadas con dominios definidos de la estructura de la proteína, de modo que el extremo amino terminal de ella es fundamental para la regulación de la transcripción (transactivación); su porción media reconoce y se une a las secuencias de bases en el DNA que definen si un gen es regulado por andrógenos, generalmente en el tramo anterior 5' del gen regulado y, finalmente, el extremo carboxilo del RA es el que reconoce y une con alta afinidad al andrógeno (activación por el ligando)^{1,2}. La unión del RA a la hormona lo activa y permite que interactúe directamente con los genes cuya transcripción regula.

Los defectos en el receptor de andrógenos causan los síndromes de insensibilidad a andrógenos (SIA), que constituyen 50 a 70% de los pseudohermafroditismos masculinos y comprenden varios desórdenes clínicos, como la insensibilidad completa a andrógenos (que resulta en

1. Bioquímica. Unidad de Biología Celular, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile.
2. Médica. Hospital San Juan de Dios, Servicio de Pediatría. Unidad de Endocrinología, Servicio de Salud Metropolitano Occidente, Departamento de Pediatría Occidente, Universidad de Chile.
3. Licenciada en Bioquímica. Unidad de Biología de la Reproducción, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile.
4. Bioquímica. Unidad de Biología de la Reproducción, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile.
Trabajo financiado por los proyectos Fondecyt 477/94 y DTI/UCM 3261/93.

individuos 46XY con fenotipo femenino normal^{3, 4}) y formas parciales de insensibilidad a andrógenos (que incluyen desde sujetos con falta casi completa de masculinización hasta otros con diferenciación casi total). El grado de ambigüedad genital de estos pacientes puede ser muy variado, incluso en individuos de una misma familia, pero la característica clínica común de todos es la infertilidad^{3, 5-9}. La variabilidad del fenotipo es consecuencia de diferencias de la magnitud de la alteración de la función del receptor. Se han demostrado más de 180 mutaciones del gen del RA en los casos de SIA completa o parcial descritos hasta ahora, que afectan con intensidad variable la función de los tres dominios de la proteína recién señalados. Para estudiar estas alteraciones se han utilizado métodos que permiten analizar directamente el RA como proteína, el RNA mensajero correspondiente o el gen que codifica al receptor^{5, 6, 10}.

Durante muchos años se ha empleado la unión de andrógenos a cultivos de fibroblastos de piel genital para analizar, en las células, la causa de insensibilidad a andrógenos. Los defectos en la unión de los andrógenos a los fibroblastos de la piel genital pueden ser tan variados como los fenotipos de los pacientes, observándose ausencia total de la unión del andrógeno, menor afinidad de unión, afinidad normal y capacidad disminuida o unión con anomalías cualitativas (como termolabilidad, disociación aumentada del ligando o alteración de la especificidad del ligando)³⁻⁸.

En nuestro medio no se disponía para el estudio de ambigüedad genital masculina de la caracterización *in vitro* de la respuesta a andrógenos, mediante cultivos de fibroblastos de piel genital. El objetivo de este estudio fue adoptar este tipo de cultivo, que es un sistema práctico para explorar la patogénesis de una gama amplia de desórdenes asociados a la acción de andrógenos. A continuación se presentan resultados del ensayo de unión a andrógenos en cultivo de fibroblastos de piel genital de individuos normales y de pacientes con diferentes grados de ambigüedad genital.

Material y Métodos

Las cepas de fibroblastos que se analizaron se obtuvieron a partir de explantes de prepucio o escroto de indivi-

duos 46XY. Los controles fueron 7 sujetos normales que no habían recibido tratamiento hormonal y fueron sometidos a circuncisión o cirugía reparativa menor por defectos locales. Los pacientes eran 10 sujetos con defectos de la masculinización de los genitales externos (hipospadias aisladas, micropene, hipospadia perineoescrotal, o pseudohermafroditismo), sometidos a cirugía reparativa. El estudio clínico incluyó, según el caso, estudio genético, ecografía pélvica, laparoscopia y medición de T o DHT circulante, antes y después de 24 horas de estímulo con hCG. Los pacientes se ordenaron en dos grupos, según el diagnóstico clínico.

Los trazadores radiactivos (1, 2, 4, 5, 6, 7 - ³H-(N)) - dehidrotestosterona 130 Ci/nmol y (1, 2, 6, 7 - ³H) - testosterona 90 Ci/nmol se compraron en Amersham International plc. El medio mínimo esencial (MEM), el suero fetal bovino (SFB) y los antibióticos, se compraron en Gibco BRL, todos los otros reactivos fueron de Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo). Los cultivos primarios se iniciaron a partir de pequeños trozos de piel genital, manteniendo las células en α MEM suplementado con 10% de SFB, penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml), en incubador con aire humidificado a 37°C, en presencia de 5% CO₂. Las células se mantuvieron durante subcultivos sucesivos en dicho medio, el cual se cambió cada 3 o 4 días; las mediciones se hicieron en los subcultivos 4 a 7.

Para el ensayo de unión de andrógenos, las células se sembraron en placas Nunc de 35 mm de diámetro (40 000 células/placa) y se matuvieron en cultivo en el medio estándar hasta lograr confluencia (6 a 9 días); entonces el medio se cambió a α MEM sin SFB y las determinaciones se hicieron un día después. Para los estudios de saturación, las monocapas se incubaron en duplicado a 37°C durante 60 min con medio sin SFB que contenía concentraciones variables de ³H-DHT (0,05 - 1,3 nM); en incubaciones paralelas se estimó la unión inespecífica agregando, además del trazador radiactivo, el esteroide no radiactivo en concentración 500 veces mayor. Los estudios del efecto de andrógenos sobre la unión máxima se hicieron en duplicado, incubando células durante 24 h a 37°C, con medio sin SFB con ³H-T (1,3 nM), o con la misma concentración radiactiva pero en presencia de 500 veces el correspondiente esteroide no radiactivo. Luego se eliminó el medio de incubación empleado, y se incubó las células durante 60 min adicionales en medio fresco. Tanto en los estudios de saturación como en los de unión máxima, después de la incubación, se lavaron las células a 0°C, por tres veces con tampón fosfato-salino, se resuspendieron con tripsina-EDTA y se colectaron por centrifugación a 800 x g durante 10 min. El sedimento se resuspendió con NaOH 0,5 N y se tomaron alícuotas para la medición de radiactividad y proteínas¹¹. Los valores de unión máxima y de la constante de disociación se obtuvieron mediante análisis de Scatchard¹².

Resultados

Las características morfológicas y de proliferación de las células de las distintas muestras eran análogas a las descritas para fibroblastos de piel genital humana. Las propiedades genera-

les de los cultivos se mantuvieron constantes hasta los subcultivos 7 a 10, pero la proliferación fue menor en los subcultivos 12 a 15. Todas las mediciones de unión de andrógenos se hicieron en subcultivos 3 a 7.

La unión de andrógenos a su receptor se caracteriza por alta afinidad y especificidad, así como por baja capacidad. En la figura 1 se muestra un ejemplo representativo del estudio de estas propiedades en dos muestras diferentes. La figura 1.A. muestra el análisis de saturación de la unión con ^3H -DHT, en células control y derivadas de un paciente con SIA. La figura 1.B. muestra el análisis de Scatchard de los mismos datos, el cual permite la obtención de los valores de unión máxima y de la constante de disociación. En este análisis el número de sitios de unión de las dos muestras es diferente, aunque el valor de la constante es similar. Se comprobó que para una misma cepa celular los parámetros de unión no varían en subcultivos sucesivos (resultados no mostrados).

Como las diferentes alteraciones del RA inciden sobre las características de unión del andrógeno en forma muy variable³⁻⁶, los valores individuales de los parámetros de unión de todas las muestras estudiadas se resumen en la tabla en tres grupos, aunque el objetivo no es la comparación del valor promedio entre los grupos.

En las muestras de pacientes agrupadas de acuerdo al diagnóstico clínico inicial se puede apreciar que la constante de disociación en el grupo control es menor que en los casos con alteración en la masculinización, aunque la diferencia no tiene significación estadística. Si se considera el valor de la constante, el grupo de hipospadias es el que tiene un valor promedio y variabilidad mayor.

Con respecto a la unión máxima, todas las muestras agrupadas como resistencia captaron DHT y el promedio de la unión en todos los grupos fue comparable, aunque también la dispersión en los grupos con anomalías era mayor.

Además de los parámetros de unión en las monocapas de fibroblastos, se ha utilizado como una medida de respuesta inespecífica, el aumento de los sitios de unión inducido por andrógenos. En nuestro estudio medimos el efecto de la preincubación, durante 24 h en presencia de 1.2 nM de DHT o de T, sobre la capacidad de unión para el correspondiente andróge-

Figura 1: Unión de ^3H -dihidrotestosterona (^3H -DHT) a fibroblastos de piel genital (pacientes 1 y 8). A: saturación con DHT: las células se incubaron durante 60 min a 37°C , con distintas concentraciones de ^3H -DHT. (o) respuesta normal; (•) insensibilidad a andrógenos. B: análisis de Scatchard de los resultados descritos en A.

no, la cual se comparó con la unión observada luego de sólo 60 min de incubación min con 1,2 nM DHT. En la figura 2 se muestra la respuesta observada en cada muestra, las que se agruparon como se señaló anteriormente. El análisis del conjunto de muestras permite apreciar que, aunque en promedio el número de sitios de unión de DHT luego de 60 min de incubación es semejante en los tres grupos, hay clara diferencia entre ellos en la respuesta individual al cabo de la incubación de 24 h con DHT o T. En primer término se observa que la respuesta a los dos andrógenos es mayor en el grupo control y, aunque en este grupo hay muestras que respon-

Tabla

Parámetros de unión de dihidrotestosterona a fibroblastos de piel genital. Valores determinados por gráfico de Scatchard

Paciente	Diagnóstico	Kd 10 ⁻¹⁰ M	Unión máxima fmol/mg prot.
1	Normal	1,29	67,0
2	Normal	1,39	65,3
3	Normal	2,13	21,0
4	Normal	0,98	17,0
5	Normal	0,43	20,0
6	Normal	9,17	63,1
7	Normal	3,80	36,2
Promedio		2,74	41,3
± DE		3,03	23,0
8	Insen. And.	2,14	12,4
9	Insen. And.	3,70	94,1
10	Insen. And.	1,58	29,4
11	Insen. And.	10,50	32,4
12	Insen. And.	2,99	28,0
Promedio		4,18	39,3
± DE		3,60	32,0
13	Hipospadia	1,36	16,0
14	Hipospadia	9,61	33,0
15	Hipospadia	6,00	29,5
16	Hipospadia	9,07	24,0
17	Hipospadia	2,31	68,0
Promedio		5,67	34,1
± DE		3,80	20,0

den relativamente poco, ellas tienen un número de sitios de unión que no es bajo. En todos los grupos la respuesta a testosterona fue menor que a dihidrotestosterona, siendo esto más notable en hipospadias, donde el resultado fue más heterogéneo. Si bien uno los casos respondió en márgenes semejantes a los de controles, en conjunto las muestras presentaron incrementos más modestos que el grupo control. En el conjunto clasificado como resistente la respuesta fue menor y en algunas muestras no ocurrió.

Comentario

Los ensayos de unión de andrógenos utilizando fibroblastos de piel genital como fuente de receptores del esteroide constituyen medicio-

nes indirectas, útiles de la capacidad celular de respuesta a los andrógenos. En esta serie se comprobó que los fibroblastos derivados de piel genital se establecen bien en cultivos primarios, conservan sus propiedades características durante varios subcultivos sucesivos y se pueden conservar por tiempo largo mediante criopreservación, lo que es ventajoso porque los fibroblastos son las únicas células humanas de fácil obtención que responden a andrógenos.

En los casos de SIA completa, las pruebas bioquímicas se usan sólo para confirmar un diagnóstico clínico; en los casos parciales, generalmente más confusos, se requieren más exámenes para establecer el diagnóstico correcto: además de la estimulación con gonadotropina humana para excluir defectos en la vía esteroideogénica, la medición en el laboratorio de la captación de andrógenos y de la actividad de la 5- α -reductasa son valiosos para precisarlo³⁻⁵.

En la experiencia que se comenta, la unión de andrógenos a las células de sujetos controles se caracterizó por baja disociación, y por baja

Figura 2: Unión máxima específica después de incubaciones de 60 min a 37° C con 1,2 nM ³H-DHT o ³H-testosterona. Valores de muestras individuales: células sin tratamiento previo (DHT 1 hora); preincubadas durante 24 h con DHT o testosterona (DHT 24 horas; T 24 horas).

capacidad de unión, resultados comparables a lo descrito en otras^{5, 6, 10}. La semejanza de los resultados promedio obtenidos en los dos grupos de pacientes con los del grupo control no es sorprendente, ya que cada caso puede representar una anomalía que afecta en grado diferente los parámetros de unión³⁻¹⁰. Aunque todas las muestras analizadas captaron andrógenos, en dos de ellas la captación fue menor que 17 fmol/mg (valor mínimo de unión positiva control). Anteriormente, en un caso de SIA completa¹³, se había observado falta de unión al medir RA en un homogenizado de tejido.

En células normales el efecto de la preincubación de 24 h con DHT o con T, sobre la capacidad de unión del correspondiente andrógeno, como marcador biológico de la acción de andrógenos en los fibroblastos, aumenta la cantidad de receptor, por disminución de la degradación^{6, 10}. Este ensayo permite así distinguir, en los cultivos, la capacidad de respuesta a andrógenos, que aumenta en sujetos normales, mientras en sujetos con hipospadia fue, con sólo una excepción, semejante a la observada en el grupo con insensibilidad. La capacidad de respuesta a andrógenos en hipospadias es asunto de controversia^{10, 14-16}, pero nuestras observaciones apoyan la conclusión de que algunos de estos casos corresponden a una variedad de SIA parcial, lo que puede ser de interés para un tratamiento de apoyo hormonal durante la pubertad. La respuesta en los casos clasificados como insensibilidad, fue en general baja o ausente. Todas las muestras corresponden a SIA parcial, ya que además de los parámetros de unión el fenotipo de los pacientes correspondía a masculinización defectuosa severa. En la mayoría de los casos incluidos no es posible obtener conclusiones sobre la magnitud de la resistencia de sólo uno de los parámetros del RA; para definirla se requiere un conjunto de mediciones en células de cultivo, entre ellas la determinación de termolabilidad, cambio de especificidad, disociación del receptor, inmunodetección o, por último, análisis molecular del gen^{3-8, 17-19}.

La secuencia del gen para el receptor de andrógenos se describió en los años 1988 y 1989^{17, 18}. Este se ubica en el cromosoma X (banda q12) y comprende 8 exones y se han descrito casi 200 mutaciones diferentes. En algunos pacientes las anomalías incluyen defectos mayores de reordenamiento o estructurales en el

gen que codifica al receptor, o sustituciones de un solo nucleótido que pueden determinar el término prematuro del RNA mensajero transcrito o la sustitución de un solo aminoácido en la proteína^{5, 6, 9, 15, 19}.

Desde un punto de vista molecular, la variedad de alteraciones de la función del RA en distintos tipos de insensibilidad a andrógenos se interpreta más fácilmente, con la definición de los dominios funcionales del receptor. El estudio de la capacidad de respuesta a los andrógenos es la primera aproximación experimental para precisar la anomalía y puede servir de apoyo en la asignación de sexo al nacer, la programación de la cirugía correctora consiguiente y la elección de un tratamiento de apoyo hormonal en la pubertad.

Resumen

Mutaciones en el gen del receptor de andrógenos (Xq 11-12) originan insensibilidad a estos esteroides. El cultivo de fibroblastos de piel genital permite analizar *in vitro* la capacidad de respuesta a andrógenos de los individuos, ya que dichas células expresan el receptor para el esteroide; en nuestro medio no se realiza este tipo de estudios. El objetivo de este trabajo fue establecer dicha metodología y estudiar las propiedades de unión y de respuesta a andrógenos de individuos 46XY normales, con hipospadia o con resistencia a andrógenos. Las células en cultivo demostraron las propiedades características de fibroblastos, con propiedades de unión de andrógenos comparables a las descritas por otros autores. El promedio del valor de la constante de disociación fue $4.02 \pm 3.4 \times 10^{-10}$ M. La unión máxima en el grupo control (41.3 ± 23 fmol/mg proteína), no fue, en promedio, diferente a los grupos con hipospadia y resistencia a andrógenos (39.3 ± 32 y 34.1 ± 20 , respectivamente), pero la unión luego de un tratamiento con andrógenos (24 h), fue mayor en el grupo control. Se concluye que esta técnica es práctica para la medición de algunos parámetros, necesarios para el diagnóstico de desórdenes asociados a defectos de la acción de andrógenos.

(Palabras clave: resistencia a andrógenos, receptor de andrógenos, diagnóstico de resistencia, cultivo de fibroblastos.)

Agradecimientos

A I. Torrealba, A. Cattani y M. Muñoz, por contribuir con muestras de algunos de sus pacientes.

Referencias

1. *Evans R*: The steroid and thyroid hormone receptor super family. *Science* 1988; 240: 889-895.
2. *Williams G, Franklin J*: Physiology of the steroid-thyroid hormone nuclear receptor superfamily. *Bailliere's Clin Endocrinol Metab* 1994; 8: 241-266.
3. *Conte F, Grumbach M*: Pathogenesis, classification, diagnosis and treatment of anomalies of sex. In: *De Groot L* (eds) *Endocrinology*. Saunders Co. Publ Philadelphia 1989:1824-1826.
4. *Imperato-McGinley J, Canovatchel W*: Complete androgen insensitivity. Pathophysiology, diagnosis and management. *Trends Endocrinol Metab* 1992; 3: 75-81.
5. *Patterson M, Mc Phaul M, Hughes Y*: Androgen insensitivity syndrome. *Bailliere's Clin Endocrinol Metab* 1994; 8: 379-404.
6. *Grino P, Griffin J, Wilson J*: Androgen resistance due to decreased amounts of androgen receptor; a reinvestigation *J Steroid Biochem* 1990; 35: 647-653.
7. *Aiman J, Griffin J*: The frequency of androgen receptor deficiency in infertile men. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54: 725-732.
8. *Morrow A, Gyorki S, Warne G, et al*: Variable androgen receptor levels in infertile men. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64: 1115-1121.
9. *Akin J, Behzadian A, Tho S, Mc Donough P*: Evidence of a partial deletion in the AR gene in a phenotypic male with azoospermia. *Am J Obstet Gynec* 1991; 165: 1891-1894.
10. *Hughes Y, Evans B*: The fibroblast as a model for androgen resistant states. *Clin Endocrinol* 1988; 28: 565-579.
11. *Bradford M*: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-251.
12. *Scatchard G*: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sci* 1949; 51: 660-672.
13. *Ronco A, Valladares L, Devoto L, Ahumada A, Pino A*: *In vitro* effect of hCG on steroidogenesis in the testicular tissue from a patient with complete androgen resistance. *J Endocrinol Invest* 1992; 15: 683-687.
14. *Keenan B, Mc Neel R, González E*: Abnormalities of intracellular 5 α -dihydrotestosterone binding in simple hypospadias: studies on equilibrium steroid binding in sonicates of genital skin fibroblasts. *Pediatr Res* 1984; 18: 216-220.
15. *Kaspar F, Cato A, Denninger J, et al*: Characterization of two point mutations in the androgen receptor gene of patients with perineoscrotal hypospadias. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993; 47: 127-135.
16. *Gearhart J, Linhard H, Berkovitz G, et al*: Androgen receptor levels and 5 α -reductase activities in preputial skin and chordee tissues of boys with isolated hypospadias. *J Urol* 1988; 140: 1243-1246.
17. *Chang C, Kokont J, Liao S*: Molecular cloning of human and rat cDNA encoding androgen receptors. *Science* 1988; 240: 324-326.
18. *Brown C, Goss J, Lubahn D, et al*: Androgen receptor locus on the human X partial chromosome regional localization to xq 11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 264-269.
19. *Lumbroso S, Lobuccaro JM, Belon C, et al*: Molecular prenatal exclusion of familial androgen insensitivity (Reifenstein syndrome). *Eur J Endocrinol* 1994; 130: 327-332.

AVISO A LOS AUTORES

Por acuerdo del Comité Editorial, la Revista Chilena de Pediatría devolverá sin tramitar todos los trabajos que no den estricto cumplimiento al *Reglamento de Publicaciones* y a las *Instrucciones de los Autores* que se editan en cada número de la Revista.