

**UNIVERSIDAD DE ALCALÁ DE HENARES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
Sección de Químicas.



TESIS DOCTORAL

**Lipogénesis durante el desarrollo de la próstata ventral de  
rata : composición lipídica, incorporación de acetato a  
triacilglicéridos y fosfolípidos y su control por andrógenos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**María Nancy del Hoyo Medinilla**

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5318225365

T 577.115

Hoy

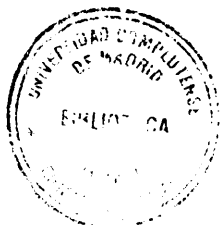
lip

UNIVERSIDAD DE ALCALA DE HENARES

FACULTAD DE CIENCIAS

SECCION DE QUIMICAS

LIPOGÉNESIS DURANTE EL DESARROLLO DE LA  
PRÓSTATA VENTRAL DE RATA: COMPOSICION  
LIPÍDICA, INCORPORACIÓN DE ACETATO A  
TRIACILGLICÉRIDOS Y FOSFOLÍPIDOS Y SU  
CONTROL POR ANDRÓGENOS:



R. 36.719

Tesis presentada por  
M<sup>a</sup> NANCY DEL HOYO MEDINILLA  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias  
(Sección de Químicas)

1983

El presente trabajo se ha llevado a cabo en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias, a cuyo director el Profesor Dr. D. José Luque Cabrera agradezco el haberme permitido realizar este trabajo, así como por el interés mostrado durante el desarrollo del mismo, facilitándome en todo momento información, medios y su propia crítica científica.

Esta Tesis ha sido dirigida por el Dr. D. Miguel Angel Pérez Albarsanz Profesor Titular de Bioquímica, al que va dirigido todo mi agradecimiento por su constante orientación y cooperación en toda la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros del Departamento que de formas diversas han contribuido a la realización de este trabajo, y en particular a la Profesora Dra. Dña. María N. Recio y a D. Alberto Torre, por las interesantes discusiones y críticas mantenidas sobre éste y otros trabajos de lípidos en próstata, así como por el intercambio de conocimientos y metodología.

A José M<sup>a</sup> Fraile Profesor Adjunto de Análisis matemático III por sus sugerencias, realización y puesta a punto de los programas, así como por las largas horas pasadas con Juan y José para que este trabajo terminara un poco antes.

INDICE

INDICE

	Págs.
1. INTRODUCCION .....	1
1.1. Biosíntesis de ácidos grasos .....	1
1.1.1. Biosíntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos ....	1
1.1.2. Elongación de ácidos grasos .....	6
1.1.3. Síntesis de ácidos grasos insaturados ..	10
1.2. Biosíntesis de lípidos complejos .....	13
1.2.1. Biosíntesis de triacilglicéridos .....	14
1.2.2. Biosíntesis de fosfolípidos .....	16
1.2.2.1. Reacciones de desacilación- reacilación .....	19
1.2.2.2. Mecanismo de metilación .....	19
1.2.2.3. Mecanismos de intercambio de bases .....	20
1.3. La glándula prostática .....	23
1.3.1. Lóbulo ventral .....	25
1.3.1.1. El estroma .....	25
1.3.1.2. Células epiteliales .....	26
1.3.2. Lóbulos lateral y dorsal .....	26
1.3.3. Conductos secretores y sistema vascular.	27
1.4. Secreción prostática .....	28
1.4.1. Mecanismo de la secreción prostática ...	29
1.4.2. Naturaleza de la secreción .....	30
. Citrato .....	33
. Proteína prostática de unión (PBP) .....	35
1.5. Mecanismo de acción de andrógenos .....	38
1.5.1. Circulación de andrógenos en plasma ....	38
1.5.2. Transporte de andrógenos a través de la membrana plasmática .....	39
1.5.3. Metabolismo de la testosterona .....	40

1.5.4. Formación del complejo hormona-receptor y activación de este .....	43
1.5.5. Traslocación del complejo hormona- receptor .....	47
1.5.6. Modo de acción de andrógenos en el núcleo .....	48
1.5.6.1. Efectos producidos por la fal <u>ta</u> de andrógenos .....	52
. Castración .....	53
1.6. Evolución de la próstata a lo largo del desarrollo de la rata .....	55
1.6.1. Periodo neonatal .....	56
1.6.2. La inmadurez sexual-prepubertad .....	56
1.6.3. La pubertad .....	59
1.6.4. La madurez sexual .....	60
1.6.5. El envejecimiento .....	60
1.7. Lípidos en la próstata .....	62
1.8. Objetivos .....	66
2. MATERIALES Y METODOS .....	68
2.1. Material biológico .....	69
2.2. Sistemas in vivo para el estudio de la biosíntesis de lípidos .....	73
2.2.1. Control de los niveles de andrógenos y del crecimiento prostático .....	73
2.2.2. Castración quirúrgica .....	76
2.2.3. Aporte de acetato $^{14}\text{C}$ a la próstata .	76
2.3. Sistemas in vitro para el estudio de la biosíntesis de lípidos .....	77
2.3.1. Preparados enzimáticos .....	77
2.3.1.1. Sistemas libres de células ...	78
2.3.1.2. Tejido troceado .....	78

2.3.2. Medios de incubación .....	79
2.3.3. Incubación y control del crecimiento bac <u>teriano</u> .....	80
2.3.4. Determinación de proteínas .....	82
2.4. Análisis cualitativo de lípidos .....	83
2.4.1. Aislamiento de lípidos totales .....	83
2.4.2. Separación de lípidos: cromatografía en capa fina .....	86
2.4.3. Análisis de ácidos grasos procedentes del extracto lipídico total, triacilglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos libres ..	89
2.4.3.1. Obtención y extracción de ésteres metílicos .....	90
2.4.3.2. Cromatografía en fase gaseosa: análisis de ésteres metílicos ....	92
2.5. Análisis cuantitativo de lípidos .....	93
2.5.1. Método por cromatografía en fase gaseosa con patrón interno .....	93
2.5.2. Método calorimétrico para triacilglicéridos y fosfolípidos .....	95
2.6. Medida de la radiactividad. Contador de centelleo líquido .....	98
2.7. Tratamiento estadístico .....	99
2.8. Reactivos .....	100
3. RESULTADOS Y DISCUSION .....	102
3.1. Relación peso prostático-peso rata .....	103
3.2. Contenido en lípidos de la próstata ventral de rata .....	108
3.2.1. Contenido en lípidos totales de próstata ventral de rata .....	108

3.2.2. Contenido de ácidos grasos en los lípidos totales .....	109
3.2.3. Contenido en fosfolípidos, triacilglicéridos y ácidos grasos libres en los lípidos de la próstata .....	114
3.2.4. Distribución de ácidos grasos en triacilglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos libres .....	116
3.3. Incorporación de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a lípidos de próstata en experimentos <i>in vivo</i> .....	125
3.3.1. Incorporación a lípidos totales .....	125
3.3.2. Incorporación a clases de lípidos .....	128
3.4. Influencia de los andrógenos en la incorporación de acetato a triacilglicéridos y fosfolípidos en próstata ventral: estudios <i>in vivo</i> .....	131
3.5. Incorporación de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a lípidos en sistemas <i>in vitro</i> .....	135
3.5.1. Sistema libre de células .....	137
3.5.2. Sistemas con tejido troceado .....	140
3.5.2.1. Elección del medio de incubación ..	140
3.5.2.2. Optimización de las condiciones de incubación .....	144
. Control del crecimiento bacteriano en el medio de incubación .....	144
. Influencia de la presencia de $\text{Ca}^{++}$ .....	146
. Influencia del pH .....	148
. Influencia del tiempo de incubación y de la oxigenación en la síntesis de lípidos .....	146
. Influencia de la cantidad de próstata troceada en la incorporación de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a lípidos totales .....	152

3.6. Acción de andrógenos sobre la biosíntesis de lípidos en estudios <i>in vitro</i> .....	155
4. CONCLUSIONES .....	165
5. BIBLIOGRAFIA .....	170

ABREVIATURAS

ADP :	adenosín-5'-difosfato.
ATP :	adenosín-5'-trifosfato.
CoA :	coenzima A.
DG :	diacilglicérido.
DHT :	dihidrotestosterona, 17 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-3-ona
EDTA:	etilendiaminotetracetato sódico
ESM :	error estandar de la media
FL :	fosfolípido.
FFA :	ácido graso libre.
lg :	logaritmo
MG :	monoacilglicérido
NADP:	nicotinamida-adenín-dinucleótido fosfato (oxidado)
NADPH:	nicotinamida-adenín-dinucleótido fosfato (reducido)
PBP :	proteína prostática de unión.
PM :	peso molecular
PMSF:	fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
POPOP:	1,4-bis(2-(5-fenil)-oxazol)benzol.
PPO :	2,5-difeniloxazol.
RIA :	radioinmunoanálisis.
T :	testosterona, 17 $\beta$ -hidroxi-4-androsten-3-ona.
TG :	triacilglicérido.
Tr :	trazas.
Tris:	trihidroximetil-aminometano.

## I. INTRODUCCION

### 1.1. BIOSÍNTESIS DE ACIDOS GRASOS

Los lípidos presentes en la próstata tienen distinto origen. Pueden tomarse de entre los lípidos transportados por la sangre, procedentes de la dieta o de transformaciones y biosíntesis realizadas en otros tejidos del animal. Estos lípidos así adquiridos pueden o no sufrir transformaciones en la propia próstata. También puede ocurrir en próstata una biosíntesis de novo "a partir del acetil-CoA que a su vez procede de sustratos generalmente no lipídicos como los glúcidos.

Los aspectos fundamentales de la lipogénesis "de novo" incluyen:

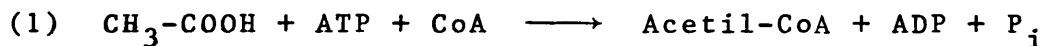
- a) Síntesis de ácidos grasos saturados de cadena larga, a partir de precursores de dos átomos de carbono.
- b) Desaturación, elongación, y retroconversión de estos ácidos.
- c) Incorporación posterior a lípidos, tales como triacilglicéridos y fosfolípidos.

#### 1.1.1. *Biosíntesis "de novo" de ácidos grasos*

La enzimología y regulación de la biosíntesis de ácidos grasos saturados, en la fracción soluble del citoplasma, ha sido ampliamente estudiada en vertebrados y microorganismos, disponiéndose en la actualidad de una completa información al respecto (ver revisiones de Vagelos, 1964; Bloch y Vance, 1977; Wakil y Col., 1983). Tres etapas son fundamentales en la biosíntesis "de novo", a saber: activación del ácido acético, formación del malonil-CoA, y reactivación del acetil-CoA y malonil-CoA que, junto con las fases de conden-

sación, reducción y terminación, son reguladas por el complejo enzimático ácido graso sintetasa.

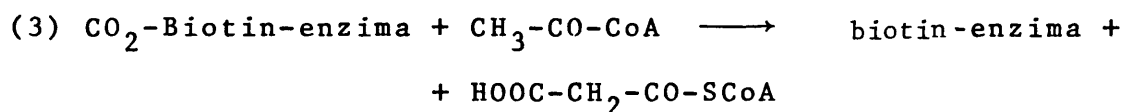
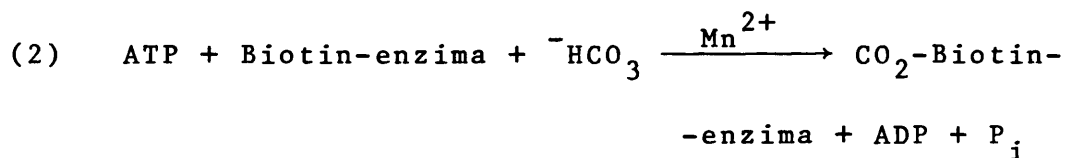
La primera etapa conduce a la formación de acetil-CoA a partir de ácido acético, según la siguiente reacción



y está catalizada por la enzima acetil-CoA-sintetasa (Ec. 6.2.1.1).

Posteriormente, dos complejos multienzimáticos, Acetil-CoA-carboxilasa y ácido graso sintetasa, catalizan de manera secuencial la formación de ácidos grasos saturados.

La acetil-CoA-carboxilasa cataliza la primera etapa de síntesis de ácidos grasos a partir de acetil-CoA; es una reacción de carboxilación dependiente de biotina, en la que se forma como producto malonil-CoA. La reacción transcurre en dos etapas, (2) y (3) (véase Vagelos (1964), y Wakil y col., 1983)



La acetil-CoA carboxilasa ha sido aislada y purificada en gran variedad de tejidos animales, plantas, levaduras y microorganismos. También ha sido parcialmente purificada en próstata ventral de rata (Hollander, 1963).

En las células animales la acetil-CoA carboxilasa se localizan en el citoplasma celular encontrándose como un protómero de PM 230.000-260.000 con dominios catalíticos para

biotin carboxilasa, transcarboxilasa, proteína transportadora del carboxil-biotina y un sitio de regulación alostérica (Hardie y Guy, 1980; Song y Kim, 1981; Wakil y col., 1983). Este protomero es inactivo y se encuentra en equilibrio con el polímero activo. La biotina como grupo prostético es necesaria para que tenga lugar la polimerización (Tanabe y col., 1975), que también se ve favorecida por el citrato, por ácidos y acil-CoA.

En próstata ventral, y concretamente en homogenizados, se ha encontrado que la actividad de esta enzima se estimula en presencia de citrato, o de otros intermediarios del ciclo del ácido cítrico. La estimulación se realiza a concentraciones de  $10^{-4}$  M de citrato (Hollander, 1963).

La secuencia de reacciones (figura 1) que conduce a la síntesis de ácidos grasos a partir de malonil-CoA, está catalizada por el complejo multienzimático ácido grado sintetasa (FAS), descubierto inicialmente en levadura por Lynen (1961), y que más tarde ha sido aislado y purificado en diversos tejidos animales y microorganismos; en todos los casos se localiza en la fracción soluble, catalizando reacciones de la misma naturaleza, aunque existen diferencias en cuanto a organización estructural y propiedades moleculares.

El modelo de ácido graso-sintetasa de levadura, descrito por Lynen como un agregado de siete distintos componentes con una única función, ha sido puesto en duda ante la dificultad de disociar los distintos componentes monofuncionales como ocurre en otros complejos multienzimáticos. Un nuevo modelo de ácido grado sintetasa de levadura, y posiblemente de todos los ácidos grasos sintetasas, ha sido postulado por Schweizer y col., (1973), Knobling y col., (1975).

El complejo ácido graso sintetasa constaría de dos copias de una única proteína. Cada subunidad del dímero contie

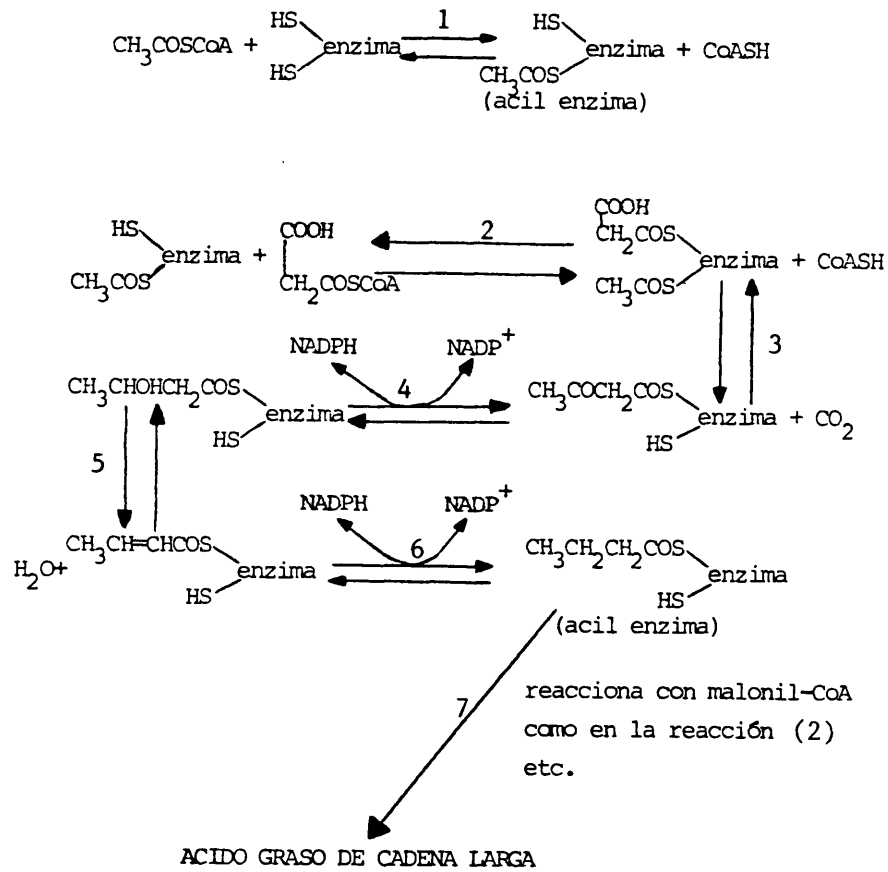
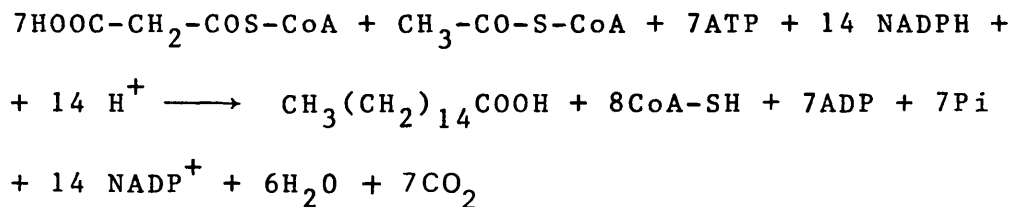


Figura 1. Esquema para la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Reacciones catalizadas por el sistema ácido graso sintetasa. (1) Acetil transacilasa; (2) Malonil transacilasa; (3) Cetoacil-ACP sintetasa (enzima condensante); (4)  $\beta$ -cetoacil-ACP reductasa; (5)  $\beta$ -hidroxiacil-ACP deshidratasa; (6) Enoil-ACP reductasa; (7) Tioesterasa.

ne dominios de unión para la proteína transportadora del ácido, con su grupo 4-fosfopantoteina y siete actividades enzimáticas más.

Ambas enzimas, ácido grado sintetasa y acetil-CoA carboxilasa constan funcionalmente de una sola cadena polipeptídica, que contiene múltiples actividades catalíticas. Esto implica que los centros activos de la proteína están generados por plegamientos contiguos de la cadena polipeptídica para dar estructuras o dominios globulares autónomos, que tienen cada uno de ellos una actividad catalítica específica y diferente. Este tipo de enzimas se da en sistemas que catalizan reacciones secuenciales como lo es la síntesis del palmítico (revisión de Wakil y col., 1983).

La estequiometría total de la síntesis de ácidos palmítico, principal ácido graso producido por la mayor parte de los sistemas biosintéticos, a partir de acetil-CoA, se puede expresar mediante la siguiente reacción:



Aunque clásicamente la síntesis "de novo" de ácidos grasos ha sido localizada en el citoplasma celular, se ha identificado en microsomas de cerebro de ratón un sistema *de novo* en condiciones que difieren de las de los sistemas de elongación (Bourre y col., 1973). Ambos sistemas "de novo" sintetizan idéntico producto (palmítico), y utilizan los mismos cofactores y sustratos, pero presentan diferentes propiedades.

También en mitocondrias del mismo órgano se ha descrito (Paterneau-Jouas y col., 1976a) la existencia de un sis

tema "*de novo*" cuya actividad se detecta rompiendo previamente la membrana mitocondrial. Este hecho sugiere que el sistema se halla localizado en el interior de la mitocondria, y excluye la posibilidad de una contaminación citoplásmica o microsomal.

### 1.1.2. *Elongación de ácidos grasos*

Los sistemas enzimáticos implicados en la elongación de acil-CoA se encuentran asociados, en mamíferos, tanto a mitocondrias como a retículo endoplasmático.

En mitocondrias los sistemas enzimáticos presentes, elongan ácidos grasos a partir de acetil-CoA. Utilizan NADH y NADPH como donadores de hidrógeno (Wit-Peeters, 1969; Boone y Wakil 1970) y ATP para la activación de los ácidos grasos endógenos. La síntesis tiene lugar concretamente en la matriz mitocondrial y transcurre por inversión de tres actividades de la  $\beta$ -oxidación: tiolasa, (Ec 2.3.1.9),  $\beta$ -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (Ec. 1.1.1.35) y enoil-CoA hidratasa (Ec 4.2.1.17) (fig. 12). La cuarta encima de la oxidación (acil-CoA deshidrogenasa (Ec. 1.3.99.3) aparece reemplazada, en el caso que nos ocupa, por una actividad de enoil-CoA reductasa (Seubert y Podak, 1973) que requiere NADPH, en lugar del  $FADH_2$  necesario para la oxidación. Son estas dos actividades enzimáticas las que desplazan al resto de las reacciones en el sentido de la elongación o de la  $\beta$ -oxidación (fig. 2).

En un principio se pensó (Wakil, 1962) que este sistema mitocondrial catalizaba la elongación de ácidos grasos de cadena larga y poliinsaturados. Sin embargo, cuando se purificaron estas enzimas mitocondriales, se encontró una actividad de elongación mínima para ácidos grasos de cadena larga mientras que cuando se utilizaban como sustratos áci-

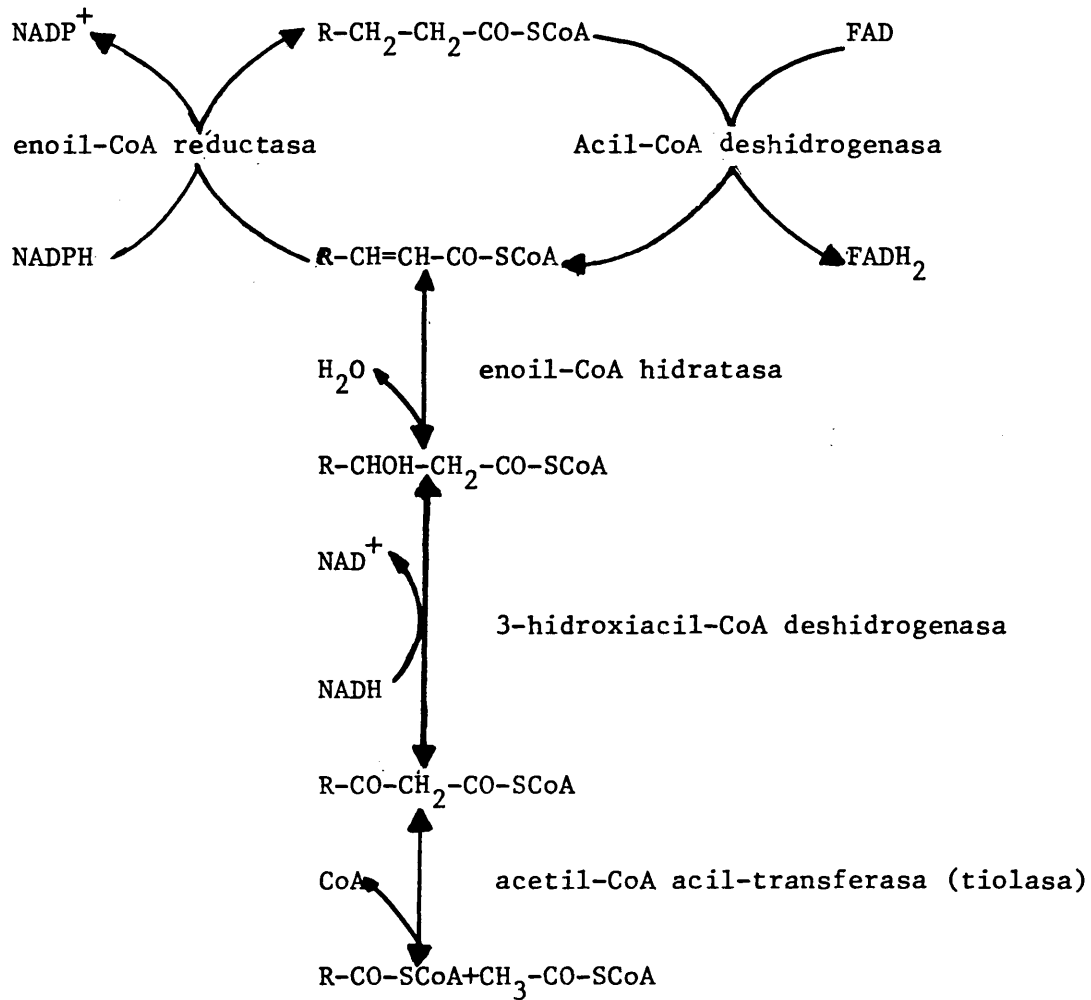


Figura 2. Esquema de elongación de ácidos grasos en mitocondria de hígado (Hinsch y Sewbert, 1975).

dos grasos de cadena corta la elongación era muy superior (Hinsch y col., 1975, 1976). Si a esto le unimos el que la enoil-CoA reductasa es específica para ácidos grasos de cadena corta con un doble enlace en posición 2-3, se puede concluir que el sistema mitocondrial elonga ácidos grasos de cadena corta. Los trabajos de Paterneau-Jouas y col., (1976b) con mitocondrias de cerebro de ratón permiten concluir que el sistema enzimático es único para cualquier ácido graso de cadena corta utilizado como sustrato.

Pocos han sido los trabajos en próstata que traten este aspecto. Doeg en 1968 aisló mitocondrias prostáticas de ratas a las que previamente había inyectado acetado radiactivo. Los lípidos radiactivos se obtuvieron unidos a membrana y su biosíntesis se estimuló en ratas castradas mediante la utilización de testosterona.

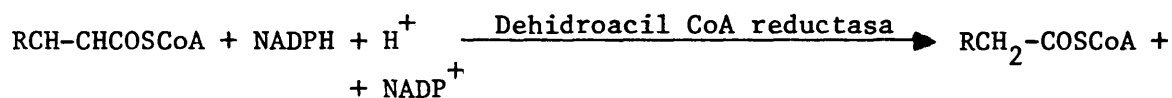
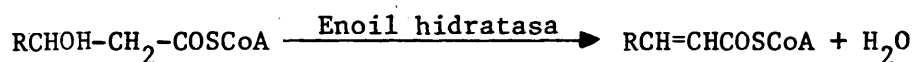
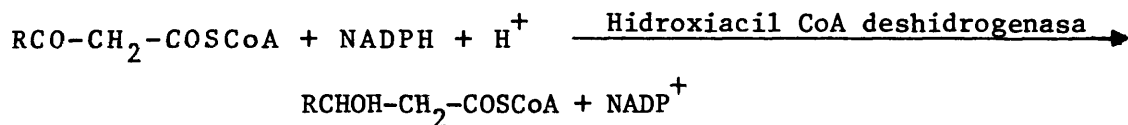
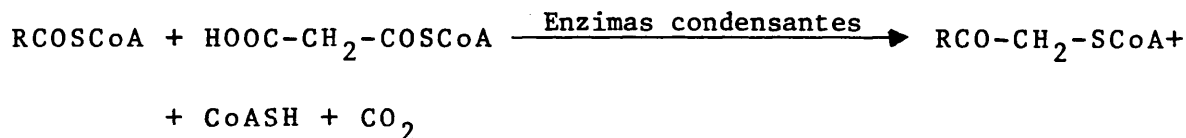
El otro sistema de elongación de ácidos grasos está asociado a las membranas microsomales de las células eucarióticas, la función principal de este sistema parece ser la elongación de ácidos grasos saturados y de cadena larga, producidos por la ácido graso sintetasa del citosol y de los ácidos grasos insaturados esenciales que provienen de la dieta (Nugteren, 1965; Seubert y Podak, 1973). En mamíferos, la elongación microsomal de ácidos grasos tiene lugar en presencia de NADPH y malonil-CoA (Guchhait y col., 1966; Cook y Spence 1974; Bernert y Sprecher 1975). El NADH también puede servir como donador de electrones, aunque es un sustrato mucho menos efectivo que el anterior (Podack y col., 1972, 1974). El acetil-CoA es inactivo como donador de fragmentos de dos carbonos y, de igual modo que en la elongación mitocondrial, se requiere ATP para mantener los niveles de Acil-CoA (Landriscina y col., 1970).

La elongación microsomal difiere de la síntesis citoplasmática en:

- a) El enoil-CoA producido por deshidratación del  $\beta$ -hidroxiacil-CoA es un compuesto trans en la síntesis microsomal, mientras que en la citoplasmática es un compuesto cis.
- b) Los compuestos intermedios en el mecanismo de síntesis citoplasmática permanecen ligados a proteínas y no son derivados de CoA, mientras que en la síntesis microsomal los compuestos intermedios son derivados de CoA.
- c) La eficacia de la elongación microsomal crece al aumentar el número de dobles enlaces del sustrato, lo que sugiere que la elongación se halla implicada en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

El estudio, en microsomas de cerebro de ratón, de la biosíntesis de ácidos de cadena larga ha permitido deducir la existencia de tres sistemas de elongación distintos. Estos sistemas difieren en cuanto a pH óptimo, temperatura y velocidad de utilización de sustratos. El primero de ellos cataliza la síntesis de ácido esteárico (octadecanoico) a partir del palmitoil-CoA ( $C_{16}$ -CoA). El segundo, cataliza la elongación posterior del  $C_{18}$ -CoA, produciendo ácidos grasos de una longitud de cadena superior, especialmente de 20 átomos de carbono (Bourre y col., 1973). Un tercer sistema adicional elonga específicamente ácidos  $C_{20}$ -CoA para dar ácidos  $C_{22}$  y  $C_{24}$  (Golberg y col., 1973).

Sistemas de elongación diferentes se encuentran también en microsomas de hígado de rata, específicos para los ácidos grasos saturados e insaturados. El conjunto de reacciones que constituyen el sistema podría ser el siguiente:



Es probable que todas las enzimas del retículo endoplásmico que requieren NADPH o palmitoil-CoA estén localizadas en la cara citoplasmática, ya que ninguno de estos sustratos penetra en el lumen de las vesículas microsomales (Bell y col., 1981).

### 1.1.3. Síntesis de ácidos grasos insaturados

En la naturaleza existen una gran variedad de ácidos insaturados, que difieren en la posición, tipo, y número de dobles enlaces, así como en la longitud de la cadena carbonada. A pesar de ello, sólo se describen dos mecanismos distintos para la introducción de dobles enlaces cis en las moléculas de ácidos grasos.

En muchas bacterias, la enzima específica  $\beta$ -hidroxiacil-tioéster deshidrata introduce un doble enlace cis en posición 3-4 de un ácido graso cuya longitud de cadena es de tamaño medio, generalmente de 10 átomos de carbono, mediante la deshidratación de un intermediario de la biosíntesis de ácidos grasos, el  $\beta$ -hidroxiaciltioéster derivado de ACP (Kass y col., 1967; Rando y Bloch, 1968; Endo y col., 1970). La elongación sucesiva del producto formado proporciona ácidos grasos insa

turados de cadena larga. Esta ruta anaerobia es idéntica a la que conduce a la síntesis de ácidos grasos en el citoplasma celular, excepto por la formación del doble enlace en 3-4.

Un segundo mecanismo tiene lugar en organismos superiores y consiste en la insaturación de ácidos grasos de cadena larga mediante el oxígeno molecular, utilizando nucleótidos reducidos de pirimidina como sustratos. Existen cuatro monooxigenasas NADPH dependientes que catalizan estas reacciones, y que se distinguen entre sí según la posición en que introducen el doble enlace ( $\Delta$ -9,  $\Delta$ -6,  $\Delta$ -5 y  $\Delta$ -4) de manera específica y exclusiva.

Los estudios acerca de la especificidad de la  $\Delta^9$ -acil-CoA monooxigenasa en mamíferos, han permitido deducir que el doble enlace se introduce siempre entre los átomos de carbono 9 y 10 respecto del grupo carboxilo. La enzima es capaz de insaturar ácidos grasos con una longitud de cadena de 10-19 átomos de carbono. En hígado de rata, la enzima exhibe un máximo de actividad con el ácido esteárico (Jeffcoat y col., 1977), mientras que, en hígado de gallina, la actividad máxima se obtiene con ácidos grasos de 14-18 carbonos (Gurr y col., 1972).

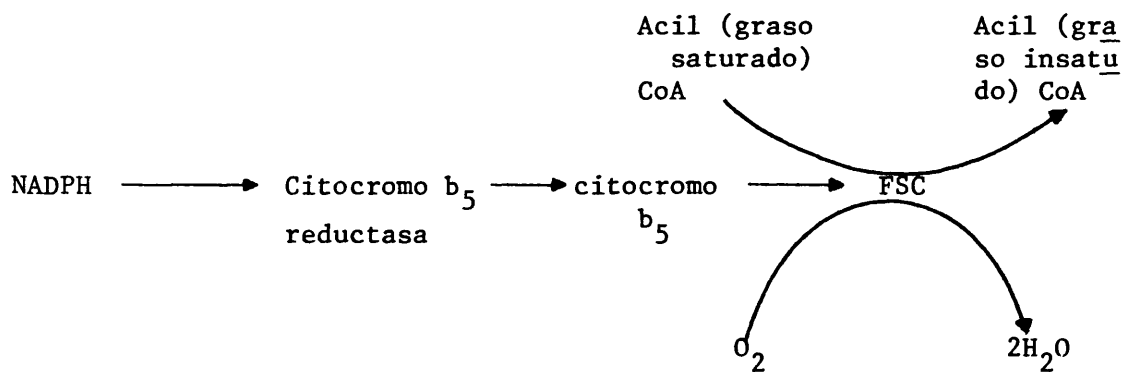
La elevada estereoespecificidad de la deshidrogenación apoya la hipótesis de un acoplamiento rígido entre la cadena de ácido graso y el centro activo de la enzima, que debe estar localizado en una posición fija respecto al grupo carboxilo. Estos datos, junto con estudios cinéticos, indican que los átomos de hidrógeno se eliminan en una reacción concertada, y parecen excluir la posibilidad, al menos en los sistemas estudiados, de que las monooxigenasas actúen a través de hidroxiácidos como intermediarios.

En la  $\Delta^9$  monooxigenación dependiente de  $O_2$  y NADPH, está implicado un sistema de transporte de electrones cuyos componentes son: a) citocromo  $b_5$  reductasa (flavoproteína)

b) citocromo  $b_5$ ; c) oxidasa terminal, que es una hemoproteína sensible a cianuro (FSC). Estas tres proteínas han sido aisladas y purificadas a partir de microsomas de hígado de rata (Spatz Strittmatter 1973)

La reductasa y el citocromo  $b_5$  son proteínas anfipáticas, con un segmento hidrofílico que contiene el centro activo, y una porción hidrofóbica que ancla la cadena polipeptídica a la bicapa formada por los fosfolípidos de la membrana microsomal. (Strittmatter y col., 1972; Roger y Strittmatter, 1973, 1975).

La oxidasa terminal está constituida por una sola cadena polipeptídica, que contiene un átomo de hierro por molécula de enzima (Strittmatter y col., 1974). Esta proteína se halla estrechamente asociada a la membrana (Jeffcoat y col., 1977). Los electrones transportados desde el NADPH hasta la hemoproteína terminal, reducen los átomos de hierro, que son capaces de enlazar al oxígeno molecular previamente activado, llevándose a cabo la insaturación del sustrato unido a la enzima como se muestra en el siguiente esquema



Aparentemente, la capacidad de insaturación de este sistema enzimático depende de la cantidad de proteína, y su control medido por degradación y síntesis de dicha monooxigenasa, más que por una variación de la actividad de la enzi

ma existente (Oshino y Sato, 1972; Mercuri y col., 1974).

En mamíferos se admite actualmente que todos los ácidos poliénoicos de origen endógeno son el resultado de los efectos combinados de las cuatro monooxigenasas anteriores (Inkpen y col., 1969; Brenner, 1974; Ninno y col., 1974; Gurr y James, 1975; Lee y col., 1977) y de los sistemas de elongación microsomales dependientes de malonil-CoA (Sprecher 1974a).

Como los sistemas microsomales de elongación solo actúan sobre ácidos de cadena larga, al no existir otro tipo de desaturasas en mamíferos, más que los anteriormente señalados, no se pueden introducir dobles enlaces más allá de C-9. Por tanto, los mamíferos no pueden sintetizar linoleato (cis, cis 9, 12 -octadecadiénoico) y linolenato (9, 12, 15-octodecatriénoico) y deben ser suministrados de fuentes vegetales. Son pues, ácidos grasos esenciales. Todos los ácidos poliénoicos presentes en mamíferos se forman por reacciones de elongación y/o desaturación a partir de cuatro precursores: palmitoleico, oleico, linoleico y linoléico. Ahora bien, estos dos últimos, como ya hemos mencionado, son ácidos grasos esenciales.

## 1.2. BIOSINTESIS DE LIPIDOS COMPLEJOS

Los lípidos complejos desempeñan diversos cometidos biológicos en la estructura y función celulares. Así, los glicerofosfolípidos son el componente mayoritario de las membranas celulares, los triacilglicéridos constituyen la reserva energética más importante en mamíferos, y los eteres alquílicos de acilglicéridos son componentes principales de las células de cerebro y otros tejidos (Wykle y Snyder, 1976). Los esfingolípidos, aunque menos abundantes que los glicerolípidos, son parte integrante de los glicolípidos de las membranas ce-

lulares. El colesterol, tanto libre como esterificado, lleva a cabo un complejo metabolismo en las células, sin olvidar que es un precursor de hormonas esteroídicas y ácidos biliares.

Las propiedades físicas de los lípidos complejos, fundamentalmente su insolubilidad en medios acuosos, hacen necesarias rutas metabólicas específicas de síntesis y transporte, ya que pocos lípidos complejos están presentes en forma libre en plasma, o en el citosol celular. La mayor parte de los lípidos están asociados con las proteínas formando estructuras complejas, principalmente membranas y lipoproteínas.

#### 1.2.1. Biosíntesis de triacilglicéridos

Se han descrito tres rutas que conducen a la biosíntesis de triacilglicéridos (figura 3).

La primera de ellas es la ruta del glicerol fosfato (Kornberg y Pricer, 1953; Kennedy, 1957), en la cual el ácido sn-glicerol-3-fosfato es doblemente acilado para formar ácido fosfatídico. El grupo fosfato se hidroliza por la acción de la ácido fosfatídico fosfatasa (Ec 3.1.3.4.) rindiendo el 1,2-diacil-sn-glicerol, que es nuevamente acilado por la enzima diacilglicerol aciltransferasa (EC 2.3.1.20), localizada en la fracción microsomal (Van Golde y col., 1971; Wilgram y Kennedy, 1963, Johnston y col., 1978), que es responsable de la síntesis de triacilglicérido a partir de diacilglicérido y acil-CoA. La dificultad de presentar estos sustratos, convenientemente solubilizados, a la enzima, hace difícil su estudio, si bien se ha demostrado que la enzima acepta acil-CoA de ácidos grasos saturados e insaturados de cadena corta ( $C_4 - C_6$ ) (Marshall y Knudsen, 1977). El control de esta ruta se lleva a cabo de forma distinta en hepatocitos, células intestinales, o en células que utilizan triacilglicéridos almacenados para producir fosfolípidos.

Una segunda ruta alternativa a la síntesis de triacilglicéridos, vía glicerol fosfato, es la acilación en posición sn-1 de la dihidroxiacetona-fosfato, por acción de la dihidroxiacetona-fosfato aciltransferasa (EC 2.3.1.42). Posteriormente se reduce el grupo ceto en presencia de NADPH, para dar el ácido lisofosfatídico 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato (Labelle y Hajra, 1974), por la acción de la acil-(alquil)-dihidroxiacetona-fosfato oxidoreductasa (EC 1.1.1.10). Por una nueva acilación, en la posición sn-2, se obtiene el ácido fosfatídico, que continúa la síntesis de triacilglicéridos como en el caso anterior.

En las células de mamíferos existen dos actividades de dihidroxiacetona-fosfato aciltransferasa, una localizada en la fracción microsomal (Schloosman y Bell, 1976, 1977), y otra en la membrana externa mitocondrial (Jones y Hajra, 1976), aunque, según Hajra y sus colaboradores, esta actividad podría residir en los peroxisomas (Jones y Hajra, 1977; Hajra y col., 1978). La existencia, también en peroxisomas, de acil-(alquil)-dihidroxiacetona-fosfato oxidoreductasa (Jones y Hajra, 1977; Rock y col., 1977) confirma la idea de que, por lo menos, la síntesis de algunos glicerolípidos con función éter ocurre en peroxisomas.

El estudio del control de estas rutas es incompleto, si bien se ha demostrado que la actividad de la enzima dihidroxiacetona-fosfato-aciltransferasa es inhibida competitivamente por el sn-glicerol-fosfato, mientras que la actividad del glicerol-fosfato aciltransferasa es inhibida, también competitivamente, por dihidroxiacetona-fosfato (Schlossman y Bell, 1976).

Una tercera ruta alternativa para la biosíntesis de triacilglicéridos es la del 2-monoglicérido (Schultz y Johnston, 1971), en la que se acila un 2-monoacil-sn-glicerol para dar, primero, 1,2-diacil-sn-glicerol y finalmente, triacilglicérido.

Las dos primeras rutas serían mecanismos de biosíntesis "*de novo*", mientras que la última está encaminada a la reconstrucción de triacilglicéridos, previa y parcialmente hidrolizados, y se realiza sobre todo en la células epiteliales del intestino delgado.

### 1.2.2. Biosíntesis de fosfolípidos

Parte de la biosíntesis "*de novo*" de glicerofosfolípidos es común con la ya descrita para triacilglicéridos (figura 3), que tiene como intermediario central el ácido fosfatídico (Kennedy, 1961), que es punto de partida para las distintas rutas que conducen a los diversos fosfolípidos. La fosfatidilcolina (1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina) y la fosfatidilserina (3-sn-fosfatidilserina) son los fosfolípidos más importantes de las membranas celulares, y para su biosíntesis se necesita, además de 1,2-diacil-sn-glicerol, la colina y etanolamina activas en forma de CDP-colina y CDP-etanolamina.

Las enzimas que llevan a cabo este proceso son la diacilglicerol colina-etanolamina fosfotransferasa (EC. 2.7.8.1) y se encuentran localizadas en la fracción microsomal (Van Golde y col., 1971, 1974; Jelesma y Morré, 1978), cada una responde de distinta forma al tratamiento con proteasas, albúmina del suero, palmitoil-CoA, magnesio, y fosfolípidos (Kano $\bar{h}$  y Ohno, 1975; Coleman y Bell, 1977; Marimoto y Kano $\bar{h}$ , 1978).

La actividad de estas enzimas se ha examinado utilizando diacilglicéridos unidos a membrana y exógenos (Kano $\bar{h}$  y Ohno, 1975; Coleman y Bell, 1977; Holub, 1978).

En mamíferos se han descrito otras tres posibles rutas que contribuyen a la síntesis de fosfolípidos, que describimos a continuación.

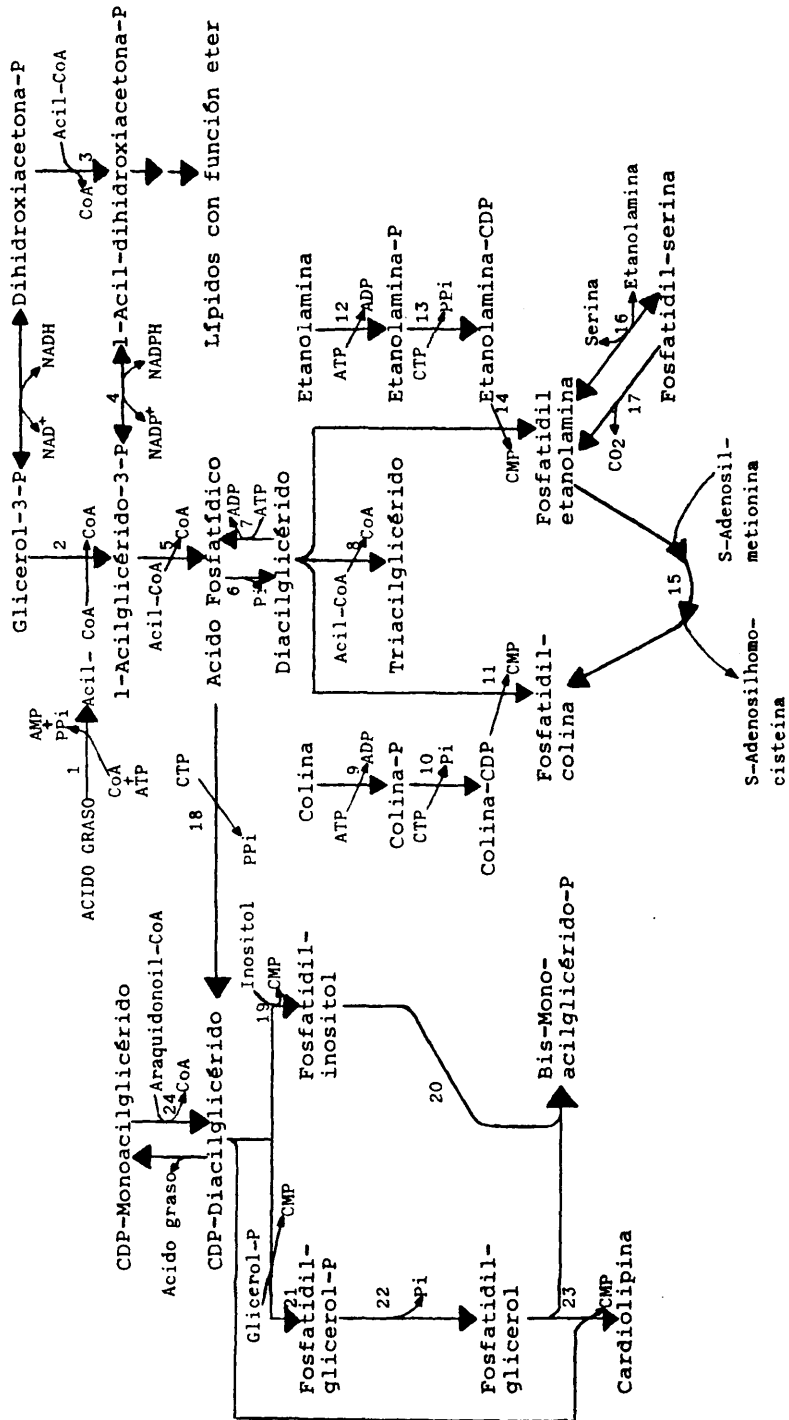


Figura 3. Esquema del metabolismo de glicerolípidos.

Enzimas correspondientes a la biosíntesis de glicerolípidos, según la numeración de la figura 3.

1. Acido graso CoA ligasa (AMP) (EC 6.2.1.3).
2. *sn*-glicerol-3-P aciltransferasa (EC 2.3.1.15).
3. Dihidroxiacetona-P aciltransferasa (EC 2.3.1.42).
4. Acil(alquil)dihidroxiacetona-P oxidoreductasa (EC 1.1.1.101).
5. Acido lisofosfatídico aciltransferasa (EC 2.3.1.-).
6. Acido fosfatídico fosfatasa (EC 3.1.3.4).
7. Diacilglicerol quinasa.
8. Diacilglicerol aciltransferasa (EC 2.3.1.20).
9. Colina quinasa (EC 2.7.1.32).
10. Colina-P citidiltransferasa (EC 2.7.7.15).
11. Diacilglicerol colinafosfotransferasa (EC 2.7.8.2).
12. Etanolamina quinasa (EC 2.7.1.cc).
13. Etanolamina-P citidiltransferasa (EC 2.7.7.14).
14. Diacilglicerol etanolaminafosfotransferasa (EC 2.7.8.1)
15. Fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (EC 2.1.1.17).
16. Fosfatidiletanolamina serinatransferasa.
17. Fosfatidilserina decarboxilasa.
18. Acido fosfatídico citidiltransferasa (EC 2.7.7.41)  
(CDP-diacilglicerol sintetasa).
19. Fosfatidilinositol sintetasa.
20. *bis*-monoacilglicerol-P sintetasa.
21. Glicerol-P fosfatidiltransferasa (EC 2.7.8.5).
22. Fosfatidilglicerol-P fosfatasa (EC 3.1.3.27).
23. Cardiolipina sintetasa.
24. CDP-monoacilglicerol araquidonil-CoA aciltransferasa.

#### 1.2.2.1. Reacciones de desacilación-reacilación

Estas reacciones presuponen la intervención de dos enzimas, la fosfolipasa  $A_2$  y una aciltransferasa, la ácido fosfatídico aciltransferasa (EC. 2.3.1.) que se encuentran localizadas en la fracción microsomal (Miki y col., 1977; Yamada y Okuyama, 1978). El "remodelado" se efectúa en los fosfoglicéridos, reemplazando el ácido graso que se encuentra en la posición sn-2, e introduciendo en esta posición, generalmente, ácidos grasos insaturados (Harmon y Neiderhiser, 1978; Holub y col., 1979). Así, la lisofosfatidilcolina aciltransferasa muestra preferencia por el araquidonil-CoA (Yamashita y col., 1973). Posiblemente, ésta sea la causa de la distribución asimétrica de ácidos grasos en posición 1 y 2.

#### 1.2.2.2. Mecanismo de metilación

De esta manera se puede obtener 3-sn-fosfatidilcolina por N metilación de 3-sn-fosfatidiletanolamina (1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina). El donador de los grupos metilo va a ser la S-adenosil-L-metionina, produciéndose la transferencia de tres metilos por la acción de las metiltransferasas, y produciéndose monometil, dimetil etanolamina y, finalmente, 3-sn-fosfatidilcolina. Estas enzimas están presentes en la fracción microsomal de hígado de rata (Van Golde y col., 1974; Bremer y Greenberg, 1961), produciéndose en este órgano hasta un 20% de la biosíntesis total de 3-sn-fosfatidilcolina (Sundler y Akesson, 1975).

Parece comprobado que la etapa limitante de la velocidad es la metilación inicial. Salerno y Beeler (1973), al estudiar la biosíntesis "in vivo" de fosfolípidos y sus precursores en hígado de rata, encontraron que no solo la 3-sn-fosfatidiletanolamina, sino también la etanolamina, fosforil-

etanolamina, y CDP-etanolamina, son sustratos válidos para la reacción de metilación.

#### 1.2.2.3. Mecanismo de intercambio de bases

Se ha comprobado el intercambio de bases existente entre serina, colina, y etanolamina, que se encuentran en estado libre, y las bases existentes en glicerofosfolípidos, para producir fosfatidilserina, fosfatidilcolina, y fosfatidiletanolamina, respectivamente.

Las enzimas que catalizan estas reacciones se encuentran localizadas en la fracción microsomal (Van Golde y col., 1974; Jelesma y Morré, 1978) y, en este proceso enzimático, no se requiere energía.

La importancia fisiológica de este proceso varía según los autores, si bien se cree que la principal ruta de biosíntesis de fosfatidilserina tiene lugar por este mecanismo (Van Golde y col., 1974; Yavin y Zeigler, 1977 y revisión de Bell y col., 1981).

Las enzimas que sintetizan los lípidos complejos tienen sus sitios activos localizados en la superficie citoplasmática del retículo endoplasmático, pero cabe la posibilidad de que una, o más, de estas enzimas atraviese la membrana y tengan zonas expuestas por ambos lados de la membrana.

En la figura 4 se muestra un esquema de la membrana del retículo endoplasmático y de las principales vías de síntesis de glicerolípidos.

Los ácidos grasos se sintetizan "*de novo*" en el citosol y, junto con los que provienen de la dieta, son activados en la superficie citoplasmática del retículo endoplasmático. Los acil-CoA tioésteres son elongados y desaturados en el

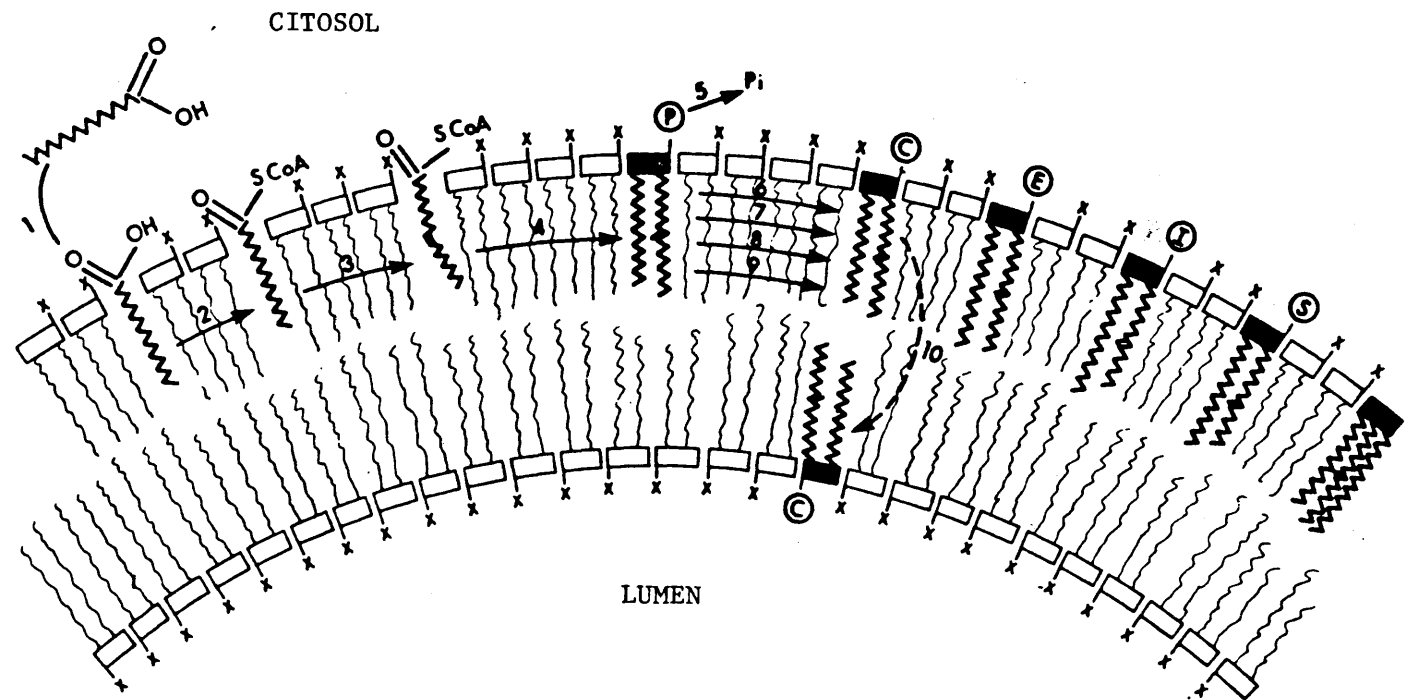


Figura 4. Topogénesis de lípidos. (1) Los ácidos grasos se insertan en la cara citoplasmática del retículo en doplásmico (2) y se activan para formar Acil-CoA (3) las cadenas de Acil-CoA pueden ser elongadas y/o insaturadas. (4) la esterificación entre los acil-CoA y el glicerol-fosfato da el ácido fosfatídico. (5) La acción de la ácido fosfatídico fosfatasa, da diacilglicerol que se convierte en (6) fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina por adquisición de fosfocolina y fosfoetanolamina como grupos polares de cabeza (7) la síntesis de fosfatidilserina tiene lugar por intercambio de bases. (8) Los triacilglicéridos se sintetizan por esterificación de los diacilglicéridos. (9) CDP-diacilglicérido es un intermediario en la síntesis de fosfatidilinositol. (10) Una vez formado el fosfolípido, éste se traslada a la cara que da al lumen del retículo endoplásmico. C = colina; E = etanolamina; I = inositol; S = serina; X = grupo polar C, E, I ó S; P =  $PO_4$ . Según Bell y col., 1981.

mismo lugar. Este conjunto de acil-CoA tioésteres es utilizado para las reacciones de síntesis de triacilglicéridos y glicerofosfolípidos, como se ha descrito en los apartados anteriores. Todos los precursores, sustratos, y enzimas de la síntesis de lípidos complejos, se encuentran en la cara citoplasmática. Además de los glicerolípidos que aparecen en la figura 4, parece ser que los esfingolípidos, el colesterol y sus ésteres, ácidos biliares, y ceramidas, se sintetizan también en la superficie citoplasmática. Esto da lugar a una asimetría en la síntesis de lípidos complejos.

Para que la bicapa de fosfolípidos pueda crecer, se necesita que los fosfolípidos recién sintetizados puedan transportarse a la cara en contacto con el lumen durante la biogénesis de la membrana. Así, la asimetría en fosfolípidos de las dos superficies no resulta de una síntesis diferente en ambos lados de la membrana, sino más bien de un rápido movimiento a través de ella. Los fosfolípidos se mueven rápidamente a través de la membrana del retículo endoplasmático (Zilversmit y Hughes, 1977; Brophy y col., 1978; van den Besselaar y col. 1978) y citoplasmática (Rothman y Kennedy 1977; Langley y Kennedy, 1979). El movimiento lateral de fosfolípidos en las membranas alcanza velocidades cercanas a 1  $\mu\text{m}/\text{seg}$ . (Devaux y Mc Connell 1972; Fahey y col., 1977). Los lípidos de membrana que no están organizados en la fase laminar proporcionan un mecanismo para el movimiento rápido, a través de las membranas, de los fosfolípidos. Otros lípidos complejos, tales como el colesterol y sus derivados, triacilglicéridos, esfingolípidos, y ácidos biliares, pueden transportarse por la bicapa de la membrana durante la secreción biliar y el ensamblaje de lipoproteínas. Por otro lado, existen pocos datos sobre la topografía de lípidos complejos en el aparato de Golgi, mitocondria y peroxisomas (Bell y col., 1981).

### 1.3. LA GLANDULA PROSTATICA

La glándula prostática de muchas especies está a su vez compuesta por una serie de glándulas que, generalmente, se presentan formando varios lóbulos. Estas glándulas están compuestas por células secretoras de naturaleza epitelial, que se agrupan en forma de epitelios glandulares. Estos epitelios se disponen, preferentemente, de dos maneras, en ocasiones formando túbulos, y otras veces en forma de sacos, denominados alveolos o acinos. La combinación de estos epitelios en una glándula recibe el nombre de glándula tubuloalveolar.

De estas agrupaciones glandulares nacen unos conductos que desembocan en la uretra, por lo que son glándulas

---



*Figura 5.* Organos sexuales accesorios de la rata macho adulta. Los lóbulos de la próstata: ventral (VP), lateral (LP), dorsal (DP). Vesícula seminal (SV), glándulas coagulantes (CG), conductos deferentes (D). uretra (U). Según Wilson y col. 1981.

exocrinas. Todo el conjunto está rodeado por el tejido interacinar, o estroma (Poirier, 1978). Esta estructura tipo anteriormente señalada, y el carácter de la secreción prostática, pueden diferir de unas especies a otras (ver revisiones de Brandes, 1974, y Aumuller, 1979).

Tanto la próstata de rata como la humana están constituidas por glándulas tubulo-alveolares, agrupadas en tres lóbulos, que forman parte de las glándulas sexuales anejas del complejo urogenital que, en el caso de la rata (fig. 5) incluye:

- Los tres lóbulos de la próstata
- la vesícula seminal
- los conductos deferentes y sus ampollas glandulares
- la uretra
- la vejiga urinaria y parte de los uréteres unidos a ella
- la glándula coagulante (Jesik y col., 1982) ó lóbulo anterior de la próstata, ya que se le considera como el cuarto lóbulo de la próstata de rata por algunos autores (Wilson y col., 1981).

A los tres lóbulos de la próstata de rata, dependiendo de su localización relativa con respecto de la uretra (U) se les designa como: lóbulo ventral, dorsal y lateral (Wilson y col., 1981; Jesik y col., 1982) como se muestra en la figura 5. Estos tres lóbulos se conectan a la uretra por una capa de tejido conectivo y por una serie de conductos.

Las glándulas sexuales anejas (fig. 5), que incluyen a la próstata, suministran una gran variedad de productos de secreción que contribuyen al complejo contenido del plasma seminal.

### 1.3.1. *Lóbulo ventral*

En la rata, el lóbulo ventral es el más grande y fácilmente diseccionable (Di Dio, 1971). A su vez se compone de dos lóbulos discretos que se unen a la uretra por una capa de tejido conectivo y una serie de conductos, que drenan dentro de la uretra. Los acinos del lóbulo ventral, que forman estructuras cerradas y compactas en el estroma, están formados por células basales y células epiteliales de naturaleza columnar. Su geometría es diversa, siendo su contorno poligonal, frecuentemente pentagonal o hexagonal (Aumuller, 1979). Los acinos y túbulos glandulares de la próstata ventral de rata están orientados estadísticamente al azar, y distribuidos de manera homogénea (Romppanen y col., 1980).

#### 1.3.1.1. *El estroma*

El tejido interacinar o estroma de los tres lóbulos de la próstata de rata, consta principalmente de células de musculatura lisa y de tejido conectivo o fibroblastos. Estas células se distribuyen más o menos paralelamente a la lámina basal del epitelio, en forma de hojas, rodeando y separando los alveolos. La capa de músculo liso que rodea a cada acino prostático dándole forma se denomina mioepitelio. Los otros componentes que entran a formar parte del estroma son fibras de colágeno y vasos sanguíneos, así como nervios amielimicos, vasos linfáticos y diverso material extracelular (Jesik y col., 1982).

Una de las funciones del estroma es participar como elemento propulsivo en la expulsión de la secreción (Aumuller, 1983).

### 1.3.1.2. Células epiteliales

Desde un punto de vista descriptivo, en las células epiteliales se distinguen cinco regiones distintas: (1) el polo apical, en contacto con el lumen del acino; (2) el aparato de Golgi; (3) una zona supranuclear; (4) una zona nuclear; y (5) una basal (Brandes, 1966, 1974; Kachar y Pinto da Silva, 1981).

El retículo endoplásmico existe en todas las regiones de la célula, y juega un papel importante en el mantenimiento de la organización celular. Sus cisternas delimitan los espacios del núcleo, del aparato de Golgi, y del aparato secretor apical.

A lo largo del polo apical están presentes gránulos de secreción bien definidos, que contiene material denso. Algunos de los gránulos, probablemente implicados en el proceso de exocitosis, se encuentran en la membrana plasmática.

La membrana plasmática de la célula epitelial consta de tres áreas, estructural y funcionalmente distintas: basal, lateral y apical. La membrana plasmática basal de las células epiteliales columnares presenta evaginaciones e invaginaciones, importantes en el intercambio de metabolitos entre el citoplasma y el espacio intersticial. La membrana plasmática lateral consta de regiones de membrana planas, y dispone de las diferenciaciones celulares típicas para hacer posible la adhesión entre células adyacentes y mantener la estructura epitelial. La membrana plasmática apical, es generalmente convexa y está tapizada de microvellosidades.

### 1.3.2. Lóbulos lateral y dorsal

Los lóbulos laterales se separan con facilidad de los dorsales. El acino del lóbulo lateral es más variable de tamaño que el ventral y, generalmente, más grande. La pa

red que forma el acino presenta un gran número de invaginaciones en el interior del lumen. Las células epiteliales de estos acinos son cuboidales o columnares y sus secreciones se tiñen fuertemente con eosina.

El lóbulo dorsal presenta acinos más grandes. Sus paredes están forradas principalmente por células cuboidales y las secreciones de este lóbulo se tiñen con eosina, con una intensidad intermedia, entre el lóbulo ventral y lateral (Jesik y col., 1982). Estos dos lóbulos lateral y dorsal se parecen más entre sí que con el ventral.

### 1.3.3. *Conductos secretores y sistema vascular*

Los conductos de la próstata tienen una constitución similar, independientemente de que se hayan originado en cualquiera de los tres lóbulos prostáticos. Son largos y delgados, y están cubiertos de epitelios columnar basófilo con algo de epitelio cuboidal. Las paredes tubulares constan de tejido conectivo rodeado de algunas capas de músculo liso. En cambio, las disposiciones y uniones de los conductos difieren en cada lóbulo prostático.

En el interior del lóbulo ventral se observan pequeños subcanales que drenan las glándulas acinosas. En estos subcanales se agrupan en canales principales que, en número de 4 o 5, parten de la parte central de cada lóbulo siguiendo un curso recto hasta la uretra, en donde vierten.

El drenaje de los lóbulos lateral y dorsal es diferente del ventral, pues se lleva a cabo por 20 o 30 conductos por lóbulo, que vierten directamente en la uretra.

El suministro de sangre arterial a la próstata de rata se realiza desde la aorta abdominal que entra en la pel-

vis vía las arterias iliacas, que se dividen en externa e interna, siendo esta última la que riega el complejo prostático (próstata, vejiga urinaria, glándula coagulante, vesícula seminal, vasos deferentes) por medio de la arteria vesical superior y sus ramas. Esta arteria vesical superior surge de la parte central de la arteria iliaca interna.

La sangre venosa vuelve por las venas vesicales inferior y superior (Jesik y col., 1982).

#### 1.4. SECRECION PROSTATICA

Las glándulas accesorias masculinas, principalmente las vesículas seminales y el complejo prostático, secretan una mezcla compleja de proteínas y nutrientes, que constituyen el plasma seminal. Este fluido es esencial para la activación y alimentación de los espermatozoides (Price y Willians-Ashman, 1961; Mann, 1964). El fluido prostático es secretado por la próstata cuando se produce la eyacuación; en este proceso, se mezcla con los espermatozoos y con las secreciones de las otras glándulas accesorias masculinas. Los productos secretados por la glándula prostática proceden de la síntesis realizada en las células epiteliales de la próstata, así como de la transudación procedente del suero. La situación anatómica de la próstata ventral de rata apunta hacia una intervención de la misma en la reproducción del macho. Aunque se conoce poco acerca de la funcionalidad de esta glándula, no parece que el papel que desempeña la próstata sea esencial para la fertilidad, ya que la extracción de esta glándula no produce grandes efectos sobre la misma (Pang y col., 1979).

#### 1.4.1. Mecanismo de la secreción prostática

El gran desarrollo del retículo endoplásmico rugoso en las células secretoras de la próstata ventral de rata indica que estas células presentan una gran actividad de síntesis proteica. Las proteínas destinadas a ser secretadas, después de ser sintetizadas se almacenan temporalmente en las cisternas (Sabatini y col., 1970), antes de ser transportadas al complejo de Golgi para su almacenamiento en vacuolas condensadas y gránulos de secreción. Estos gránulos tienen un alto contenido en lípidos (Gouvelis y col., 1971), y liberan su contenido en el lumen mediante un mecanismo de secreción merocrino: la membrana del gránulo de secreción y la membrana plasmática se funden en el punto de contacto, y el contenido se descarga en el lumen (Wong y Tse, 1981).

La localización restrictiva de los microtúbulos en la región del Golgi de células secretoras en la interfase normal (Weber, 1976), sugiere para los microtúbulos un papel en la movilización de las vesículas del Golgi y de los gránulos de secreción (Wong y Tse, 1981).

El estímulo de la glándula prostática es, probablemente, hormonal y neural. Los andrógenos circulantes son los que mantienen la ultraestructura y la función secretora de la próstata (Brandes, 1974). Aunque recientemente se ha descrito el epitelio como único blanco de los andrógenos en la próstata (Aumuller, 1979), cada vez es mayor el número de publicaciones en las que se centra la atención sobre el papel del estroma en la regulación, estímulo y diferenciación del epitelio prostático (Deklerk y Scott, 1978; Cunha y Lung, 1979; Muntzing y col., 1979).

#### 1.4.2. *Naturaleza de la secreción*

El líquido prostático es de aspecto lechoso, y más o menos neutro, siendo el pH del fluido prostático humano de 6'5 (Zaneveld y Tauber, 1981). Este valor, obtenido con la primera fracción de la emisión seminal, no coincide con valores más altos, de 7'28, obtenidos mediante masaje prostático (Fair y col., 1979). Su coagulación ocurre dos minutos después de su emisión, licuándose unos minutos más tarde por la acción de una fibrinolisisina. Los estrógenos eliminan esta acción.

El fluido secretado por la próstata contiene un alto porcentaje de proteínas y, de entre éstas, son principalmente importantes dos glicoproteínas. Una de ellas es la proteína prostática de unión (PBP), a la que por su importancia daremos un tratamiento aparte, y la otra es la fosfatasa ácida especial. Esta fosfatasa ácida no es inhibida por el tartrato como lo es la fosfatasa ácida (Ec 3.1.3.2.) lisosomal, que se encuentra en muchos tejidos de la rata, incluida la próstata, en todos los estados del desarrollo animal (Igarashi y Hollander, 1968; Goldstone y Koenig, 1973; Tenniswood y col., 1978). Por el contrario, la fosfatasa ácida especial que nos ocupa se encuentra sólo en próstata, y está destinada a ser secretada. Aparecen cantidades notables justo en la pubertad, entre los 28 y los 35 días, no encontrándose su banda en geles de poliacrilamida realizados en fases anteriores del desarrollo de la rata. Se observa también, en geles de poliacrilamida, que la banda disminuye con la edad, y desaparece a los 4 días de la castración (Tenniswood y col., 1982). Es, por lo tanto, un marcador corriente de la función secretora de la glándula prostática.

Otras enzimas presentes en gran cantidad en la secreción prostática son la láctico deshidrogenasa (EC 1.1.1.27)

y la piruvato Kinasa (Ec 2.7.1.40) (Boonseeng y Techa-Udom taworm, 1980). El papel de estas enzimas no es bien conocido, pero se cree que las fosfatasas permiten la defosforilación de la fosfatidilcolina suministrada por las vesículas seminales, ya que no se encuentra colina libre en los eyaculados recientes, detectándose cantidades notables unas horas después. El fósforo liberado va a ser incorporado en las enzimas que van a actuar en el metabolismo de la fructosa, que proviene principalmente de las vesículas seminales (Rajalakshmi y col., 1973) y constituye la reserva energética de los espermatozoos.

La elevada actividad de la fosfatasa ácida, en el complejo de Golgi, indica, ya que ambas enzimas son productos de secreción, su probable empaquetamiento en los gránulos de secreción (Tadolini y Zanotti, 1982).

En la secreción prostática se encuentran también: aminoácidos (Kochakian, 1975), urea, glutatión, vitamina C, espermina, y espermidina (ver revisiones de Aumuller, 1983; Zaneveld y Tauber, 1981).

El fluido prostático humano es rico en lípidos; en cambio, el plasma seminal humano es más pobre, por lo que se concluye que la mayor parte de los lípidos del plasma seminal proceden de la próstata. Entre los lípidos del fluido prostático, la mayor parte son fosfolípidos y colesterol (Scott, 1945; Miyao, 1965; Zaneveld y Tauber, 1981).

El colesterol se encuentra, principalmente, en forma libre más que esterificado (Scott, 1945; Singhal, 1978; Alcaide y col., 1980, Recio y col., 1982) estando su síntesis regulada por la testosterona de los testículos (Singhal y col., 1978; Osafume y col., 1980). En el hombre de edad avanzada aprecen en la secreción prostática epóxidos de colesterol, si bien no ha sido demostrado el papel de éstos

en la hiperplasia o adenoma prostático (Schaffner, 1981).

Las prostaglandinas se descubrieron en plasma seminal y, en un principio, se las atribuyó una procedencia prostática. Hoy en día se sabe que las prostaglandinas encontradas en plasma seminal, principalmente  $PG_1$  y  $PG_2$ , proceden de las vesículas seminales, y que la secreción prostática contiene cantidades mínimas e infrecuentes de prostaglandinas. (Fair y Cordonier, 1978). Hay que resaltar, sin embargo, que la próstata tiene receptores citoplasmáticos para prostaglandinas (Farnsworth, 1981), y que sintetiza y metaliza rápidamente  $PGF_{2\alpha}$ .

Entre los iones inorgánicos más importantes se encuentran:  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ , cloruros, bicarbonatos, fosfatos y  $Zn^{2+}$ . Concretamente el zinc libre, más que los complejos Zn-proteína o las sales de zinc contenidas en el fluido prostático, podrían tener un papel importante en la resistencia natural del tracto urinario del macho a la infección bacteriana, con relación a la de la hembra, que es más susceptible de padecerla (Stamey y col., 1968; Fair y Wehner, 1973; Levy y Fair, 1973; Fair y Parrish, 1981). En un principio, esta actividad antibacteriana fue atribuida sin embargo a la lisozima (Taylor y Morgan, 1952) y la poliamina espermina (Razin y Rozansky, 1959). Se atribuye también al Zn una función en la motilidad de las células espermáticas (Saito y col., 1967).

En el fluido prostático humano se han encontrado inmunoglobulinas IgA, IgG y IgM, pudiendo variar su concentración con las afecciones de la próstata (Gray y col., 1974).

Se va a dedicar un estudio aparte a dos compuestos secretados por la próstata, el citrato y la proteína prostática de unión (PBP), debido a su importancia.

### Citrato

La próstata ventral de rata, lo mismo que la humana, acumula y secreta grandes cantidades de citrato.

Si la próstata acumula gran cantidad de citrato debe considerarse a éste como un producto metabólico final, en contraste con otros tejidos, en los que el citrato se oxida o sirve como fuente de acetil-CoA citoplasmático. La fuente y mecanismo de la acumulación de citrato no es aún bien conocida pues la acumulación puede deberse a una falta de oxidación, a un incremento de la síntesis, o a una conjunción de ambas posibilidades.

Barrow y Huggins (1946), sugieren la ausencia de un ciclo de Krebs funcional, y Costello y col. (1981) indican que la aconitasa es la responsable última de este hecho. El equipo de Costello en la Universidad de Maryland (Costello y col., 1976, 1978a, 1981; Franklin y col., 1977, 1978, 1982; Toghrol y col., 1980) demuestra claramente que el aspartato, vía aspartato aminotransferasa, (AAT) es la mayor fuente de oxaloacetato para la síntesis de citrato.

El aspartato, a su vez, puede tener una procedencia exógena, o originarse en la degradación de proteínas protáticas.

El acetil-CoA, necesario para condensarse con el oxalacetato en la producción de citrato, procede de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos o de la vía glicolítica.

Por consiguiente, este grupo concluye que los dos factores que contribuyen a la acumulación y secreción de citrato en próstata ventral de rata son: la producción intracelu<sup>lar</sup> de citrato a partir de aminoácidos y ácidos grasos o glucosa, y unos niveles bajos en la oxidación de citrato,

CITOSOL

M I T O C O N D R I A

CITOSOL

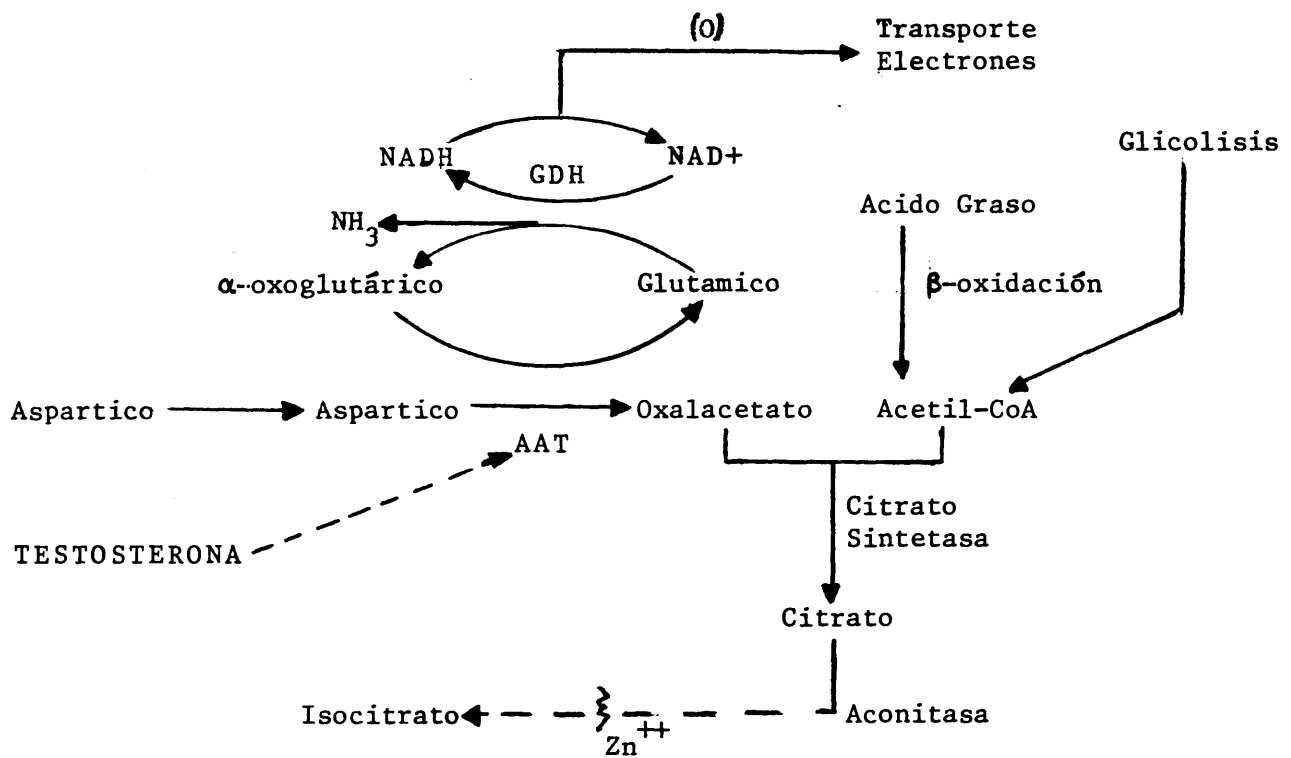


Figura 6. Principales vias que conducen a la síntesis de ácido cítrico . AAT: Aspartato amino transferasa (EC 2.6.1.1.) GDH: Glutamato deshidrogenasa.

debido al funcionamiento deficiente del ciclo de los ácidos tricarbónicos. En la figura 6 se da un esquema con las distintas vías metabólicas para el citrato.

Costello y colaboradores sostienen que la fuente mayoritaria del acetyl-CoA para la síntesis del citrato es la  $\beta$ -oxidación, frente a la vía glicolítica. Sin embargo, el grupo de Harkonen (Harkonen y col., 1975, 1982; Kuosa y col., 1977; Santti y col., 1977; Harkonen, 1981) sugieren que el contenido y secreción de citrato en la próstata depende de andrógenos, y que la acumulación de citrato puede deberse a un aumento de su síntesis causado por una estimulación androgénica del metabolismo de glucosa en próstata ventral de rata.

#### *Proteína prostática de unión (PBP)*

Forsgren y col. (1979), descubrieron una proteína mayoritaria en el sobrenadante de la próstata ventral de rata, a 105.000xg, que constituía el 20% del total de las proteínas. Esta proporción tan elevada hizo posible un fácil aislamiento del resto de las proteínas citosólicas. Estos autores sugieren que esta proteína, que denominan proteína que se une a stramustina, PSP, se libera en el fluido prostático.

Otros autores han descrito proteínas mayoritarias con características similares a la proteína prostática secretora, empleando métodos de aislamiento y purificación algo distintos. Estas proteínas son la PBP, la prostateína y la  $\alpha$ -proteína.

La proteína prostática de unión (PBP) descrita por (Heyns y de Moor, 1977; Heyns y col., 1977, 1978) es una proteína de secreción de la próstata ventral de rata cuan

titativamente muy importante. Es una glicoproteína oligomérica compuesta de un tetramero con dos subunidades diferentes no unidas covalentemente. Recibe ese nombre porque es capaz de unir esteroides de manera inespecífica (Heyns y de Moor, 1977). La expresión de esta proteína está estimulada por los andrógenos y su función "in vivo" es desconocida (Chen y col., 1982). La proteína descrita por Lea y col. (1979) presenta un gran número de semejanzas con algunas diferencias que llevan a los autores a suponer la posibilidad de que la prostateína sea una parte de la PSP.

La  $\alpha$ -proteína descrita por Fang y Liao (1971) tiene un peso molecular de unos 50.000 daltons y puede disociarse en dos subunidades en presencia de dodecil sulfato sódico. Cada subunidad se disocia a su vez en dos cadenas polipeptídicas por reducción de los puentes disulfuro. Uno de estos peptidos es el mismo en ambas subunidades. La biosíntesis de la  $\alpha$ -proteína en próstata ventral está inducida por la administración de andrógenos y es una glicoproteína que une esteroides de manera inespecífica, andrógenos, estrógenos y progesterona pero no glucorticoides, y que en sistemas libres de células, inhibe la unión del complejo andrógeno-receptor a la cromatina nuclear, promoviendo la liberación de este complejo si anteriormente está unido a la cromatina (Fang y Liao, 1977; Liao et al. 1982; Chen y col., 1982). No es probable que la  $\alpha$ -proteína compita con el receptor para la unión activa de andrógenos, ya que la  $\alpha$ -proteína se une a los esteroides con una finalidad de varios órdenes de magnitud menor que el receptor de andrógenos en el mismo órgano (ver revisión de Loo y col., 1982). Sin embargo, puede competir con enzimas de metabolismo esteroideo, retardando así la transformación metabólica entre esteroides. La  $\alpha$ -proteína podría tener la misión de acumular esteroides en las células y en los espacios extracelulares prostáticos. De esta manera, los esteroides no

unidos al receptor de esteroides en la próstata pueden, con la ayuda de la  $\alpha$ -proteína, ser retenidos o transportados.

La  $\alpha$ -proteína que no ha sido tratada con acetona con tiene colesterol como único esteroide, en cantidades casi estequiométricas (Chen y col., 1982). Esto es importante, ya que la síntesis del colesterol (Singhal y col., 1978) y la de proteína secretora (Heyns y col., 1978) en próstata ventral de rata están, ambas, estimuladas por andrógenos.

En estos momentos se están realizando estudios genéticos (Parker y col., 1982) y de secuenciación de estas proteínas de próstata de rata (Wilson y col., 1981; Liao y col. 1982), llegándose a la conclusión, por algunos autores, que la protateína y la PBP y la  $\alpha$ -proteína son la misma proteína (Chen y col., 1982; Loor y col., 1982). Los resultados parecen indicar que estos factores proteicos que juegan un papel importante en la acción de andrógenos son distintos en la próstata humana y en la próstata ventral de rata. Esto nos lleva a la conclusión de que el mecanismo de acción de andrógenos obtenido para la próstata ventral de rata puede no ser enteramente aplicable a la próstata humana (Loor y Chu, 1982).

Empleando técnicas de inmunofluorescencia, la PBP se localiza únicamente en las células epiteliales y en el lumen de la próstata ventral, no encontrándose en la próstata dorsal, lateral, glándula coagulante, ni vesículas seminales. La PBP desaparece de las células epiteliales, 4 días después de la castración, encontrándose sólo en el lumen (Aumuller y col., 1982).

Una proteína nuclear, de características similares a las de la PBP, ha sido aislada recientemente (Kishimoto y col., 1982), y su contenido varía de acuerdo con los niveles de testosterona en plasma.

Hay que resaltar, que los productos de secreción de los tres lóbulos de la próstata de rata, incluida la  $\alpha$ -proteína (Chen y col., 1982) son diferentes. La próstata también participa en los procesos de secreción endocrinos, observándose sobre todo en estados patológicos alteraciones de algunos de sus productos en plasma.

### 1.5. MECANISMO DE ACCION DE ANDROGENOS

La glándula prostática es un excelente modelo para el estudio de la acción de andrógenos a nivel molecular, ya que tiene receptores para andrógenos en concentraciones relativamente altas. Además, depende en gran medida de la estimulación de los andrógenos para la síntesis de RNA y proteínas, así como para el mantenimiento de todas las funciones que realiza dicha glándula.

Vamos a seguir, para el estudio de la acción de los andrógenos en la próstata, las pautas de que consta el modelo de acción para esteroides de Edelman (1974) y Gorski y Gannon (1976).

#### 1.5.1. Circulación de andrógenos en plasma

La testosterona secretada por los testículos es el andrógeno mayoritario en plasma de rata (Corpéchet y col., 1981) y de hombre (Wilson y col., 1983). Circula unida a dos proteínas, la globulina ligadora de testosterona y estradiol (TeBG), también denominada globulina que se une a hormona sexual (SHBG), y la albúmina (Vigersky y col., 1976). Aunque la albúmina posee una gran capacidad para unir esteroides en general, parece que esta forma de transporte sólo tiene importancia fisiológica en el caso de los mineralocorticoides.

La unión de esteroides a TeBG presenta una alta afinidad de enlace, existiendo un equilibrio dinámico entre la hormona unida y la hormona libre. Esta última sólo representa el 1-3% del total (Vigersky y col., 1976).

#### 1.5.2. *Transporte de andrógenos a través de la membrana plasmática*

Las hormonas esteroideas, en su forma libre sin la proteína transportadora, pueden entrar en el interior de la célula por simple difusión, a través de la membrana plasmática (Lasniski y col., 1974). Efectivamente, puesto que los esteroides son lípidos, penetran fácilmente a través de las bicapas lipídicas de las membranas de todas las células. Para que esto ocurra, la concentración del esteroide libre debe de ser inferior en el interior celular que en el entorno, lo que se puede conseguir de varias maneras. En primer lugar, en función de las  $K_d$  que controlan la cantidad de hormona liberada por la TeBG y la hormona que se une al receptor. En segundo lugar, cualquier transformación metabólica de la hormona en el interior celular produce la entrada de nuevo esteroide. Algunos tejidos diana, como la próstata, transforman la testosterona intracelular en metabolitos más activos, como la dihidrotestosterona (Imperato-Mc Ginley y col., 1974; Mainwaring, 1975), consiguiendo de esta manera los dos efectos anteriores.

El hecho de que la concentración de testosterona en los tejidos diana sea más baja que la encontrada en plasma en todos los animales hasta ahora estudiados (Siiteri y Wilson, 1970; Moore y Wilson, 1973), es una prueba de lo anteriormente mencionado. En las figuras 11 y 10, están representados estos valores, dados para rata por Corpechot et al. (1981).

Paralelamente, se ha propuesto (revisión Giorgi, 1980) un transporte de andrógenos a través de la membrana plasmática de las células diana, más complejo que la simple difusión no mediada. En este transporte pasivo, que actuaría a la vez que la difusión, estarían implicadas varias proteínas transportadoras.

### 1.5.3. Metabolismo de la testosterona

Los andrógenos, así como el resto de las hormonas esteroidicas, son derivados del hidrocarburo cíclico ciclo pentanoperhidrofenantreno y son sintetizados a partir del colesterol, principalmente en testículo y glándula adrenal (ver fig. 7), pero no en próstata. Sin embargo, la acción de los andrógenos difiere de la de las otras hormonas esteroidicas en, por lo menos, dos cosas: a) Muchos de los efectos de la testosterona están mediados por sus metabolitos intracelulares, la dihidrotestosterona y, posiblemente, el estradiol (Wilson y col., 1983). b) Durante la embriogénesis, los andrógenos promueven la diferenciación de los tejidos, que serán los principales sitios de acción de la hormona en la vida postnatal (Wilson, 1975; 1978). Por ello resulta de gran importancia no solo la síntesis de testosterona sino también su transformación en dihidrotestosterona y estradiol (fig. 7).

La formación de la  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (dihidrotestosterona o DHT) es crítica para el mantenimiento de las glándulas sexuales accesorias masculinas, tales como la próstata. Estas glándulas contiene una enzima, la  $5\alpha$ -reductasa, que convierte testosterona (T) en DHT por una vía reductora que necesita NADPH. La dihidrotestosterona, como se observa en la fig. 7, no puede convertirse en estradiol, por lo que su acción es puramente androgénica.



*Figura 7.* Vías de biosíntesis de andrógenos y metabolismo de la testosterona. Las enzimas son las siguientes: (1) Complejo 20, 22 desmolasa (citocromo P<sub>450</sub>); (2) 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa- $\Delta^{4,5}$  isomerasa; (3) 17 $\alpha$ -hidroxilasa; (4) 17,20-desmolasa; (5) 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y (6) aromatasa.

La administración de diversos andrógenos a animales castrados produce distintos incrementos en la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa en próstata de rata, concomitantes con un aumento en peso de la próstata. Y existe una correlación lineal entre ambos incrementos. La acción androgénica de los distintos andrógenos viene determinada, en próstata, por su facilidad para convertirse en dihidrotestosterona (Moore y Wilson, 1973). La enzima 5 $\alpha$ -reductasa no se encuentra en el músculo del esqueleto (Krieg y Voigt, 1976), donde la testosterona actúa directamente manteniendo una función anabolizante.

En la próstata ventral de rata, la mitad de la actividad 5 $\alpha$ -reductasa se encuentra en la membrana nuclear; el resto se encuentra en las membranas del citosol y su actividad en ambos casos, se ve afectada por los andrógenos (Bruchovsky y col., 1981).

#### 1.5.4. *Formación del complejo hormona-receptor y activación de éste*

Los receptores de hormonas esteroideas sexuales son moléculas proteicas, que pueden ser digeridos por proteasas (Prins y Lee, 1982a). Se unen por fuerzas no covalentes a la hormona, presentando una gran afinidad por la misma ( $K_d = 10^{-10}$ - $10^{-8}$ ).

En el caso de la próstata, los receptores presentan más afinidad por la dihidrotestosterona que por la testosterona estando aquellos, en condiciones fisiológicas normales, ocupados prácticamente en su totalidad por la dihidrotestosterona (Blondeau y col., 1976; Hu y col., 1978).

La próstata ventral de rata contiene receptores, tan

to para andrógenos (Blondeau y col., 1975, 1982), como para estrógenos (Ginsburg y col., 1980; Jung-Testas y col., 1981). Existe sin embargo, a nivel celular, una localización diferencial. Así, en el estroma, se encuentran localizados preferentemente la mayor parte de los receptores de estrógenos, mientras que los receptores de andrógenos se encuentran localizados principalmente en la fracción epitelial (Chaisiri y Pierrepont, 1979; Jung-Testas y col., 1981).

En cuanto a la localización subcelular, en todos los casos estudiados y para ambos tipos de receptores, es siempre citosólica (ver revisiones de Gorski y Ganon, 1976, y Loo y col., 1982).

Es interesante estudiar la unión hormona-receptor, puesto que, al no existir regulación directa en la entrada del esteroide a la célula, es el receptor el que ejerce la selección. La unión es un proceso que necesita de la producción de energía celular, ya que las drogas que impiden la respiración celular, tales como NaCN, NaN<sub>3</sub> o 2,4-dinitrofenol, disminuyen el porcentaje de unión (Liao y col., 1980a), hecho que no se produce en un sistema libre de células. Cuando en las incubaciones con glándulas prostática se elimina la droga, se restaura la unión del andrógeno al receptor, tanto en presencia como en ausencia de cicloheximida.

También se ha postulado (Liao y col., 1975) que los nucleótidos trifosfato pudieran estabilizar el complejo dihidrotestosterona-receptor, puesto que concentraciones comprendidas entre 1 y 5 mM de ATP o GTP activan la unión de la hormona a su receptor en próstata ventral de rata. En este sentido, en próstata y otros tejidos, mediante la utilización de inhibidores de fosfatasa, como el molibdato, se ha comprobado que son necesarios procesos de fosforilación y defosforilación para que el receptor se active y

pueda unirse a la hormona, así como para que el complejo pueda ser retenido en el núcleo de las células diana. Hay que resaltar, no obstante, que no existe evidencia que muestre, de forma directa, que los receptores proteicos de hormonas esteroidicas sexuales sufran procesos de fosforilación y defosforilación.

Otro hecho experimental admitido, es que la unión de la hormona con el receptor citoplasmático induce cambios en su conformación que son de gran importancia para que el conjunto pase al núcleo, (ver revisiones: Edelman, 1974; Gorski y Gannon, 1976). Utilizando técnicas inmunológicas y anticuerpos monoclonados, se han reconocido varias regiones en el receptor de esteroides (concretamente para glucocorticoides y estradiol). Dos de estas regiones o dominios (I y II) están implicadas en la unión con el esteroide, y el tercer dominio (III) contiene los lugares de reconocimiento y unión con el DNA (Carlstedt-Duke y col., 1982). El análisis cristalográfico por difracción de rayos X del complejo hormona-receptor (para estrógenos y progesterona) sugiere que el anillo A del esteroide es el que inicia y mantiene la unión a sus receptores, concretamente con el dominio I (figura 8a). El anillo D se une con el receptor por el dominio II (figura 8b). Cuando la hormona se une a su receptor, se produce un cambio conformacional en el mismo que deja expuesto el dominio III para que pueda cumplir su ulterior función de reconocimiento y unión con el DNA (Sluyser, 1983). En esta activación del complejo hormona-receptor, y tal vez colaborando en la entrada al núcleo, es donde parecen intervenir (Liao y col., 1980a; Dougherty y col., 1982), también el ATP y los procesos de fosforilación-defosforilación, por medio de unos cambios de naturaleza fisicoquímica en la naturaleza del receptor.

Quando se observa y compara la estructura de agonis

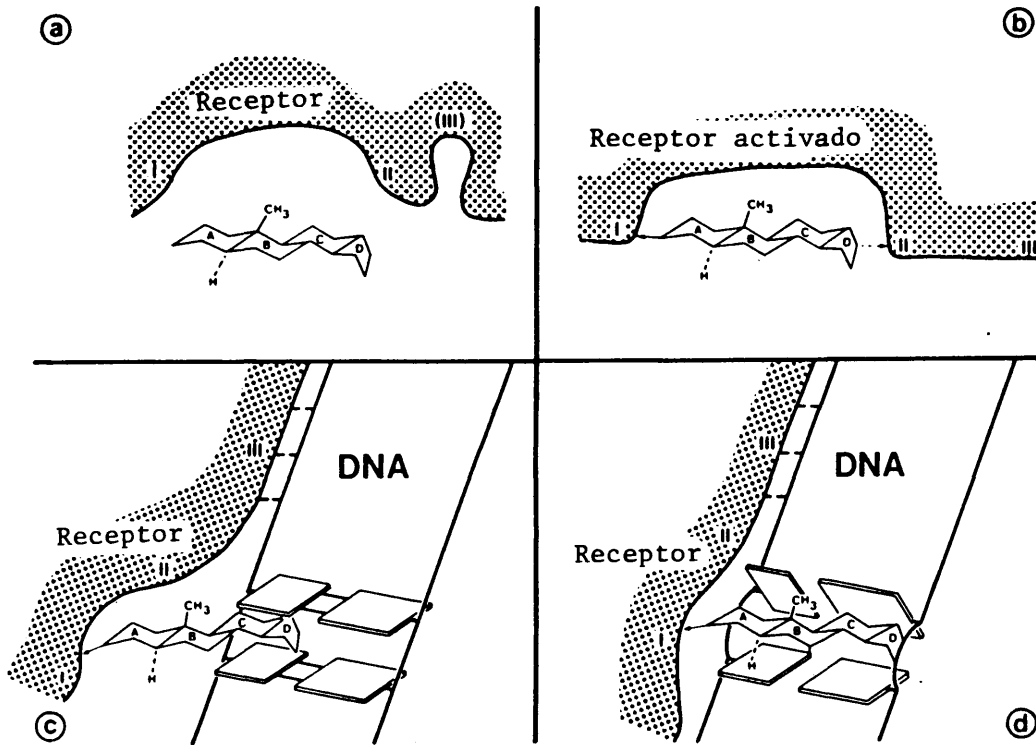


Figura 8. Esquema propuesto para el mecanismo de acción de esteroides en el núcleo. Según Sluysers (1983).

tas de hormonas esteroideas, todos muestran semejanzas en la región del anillo A, y diferencias en el anillo D, lo que sugiere (Duax y col., 1981) que el anillo A es más bien responsable de la unión al receptor (Dominio I), mientras que el anillo D, en su unión con el dominio II del receptor, controla de manera preferente la activación de dicha proteína receptora.

Por último, señalemos que la presencia, en el citosol de las células diana, de receptores sueltos, libres y solubles en agua, está siendo revisada en la actualidad. Efectivamente, una vez conocida la intrincada y compleja naturaleza de la organización ultraestructural del citoplasma, y el alto grado de integración de varios elementos citoplasmáticos, (Trump y col., 1981), algunos autores (Puca y Sica, 1981) sugieren que, por lo menos los receptores de estradiol, se asocian de manera integral a una compleja red citoesquelética en el citoplasma celular.

#### 1.5.5. *Translocación del complejo hormona-receptor*

El complejo dihidrotestosterona-receptor entra en el núcleo de las células de la próstata ventral, una vez que se ha formado (Liang y col., 1977). Así, en las incubaciones de próstata troceada con testosterona tritiada, el 90% de la radiactividad esteroidea encontrada en los núcleos migra como dihidrotestosterona, y el resto como testosterona. Además la utilización de un inhibidor de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa, 17 $\beta$ -N,N-dietilcarbamoil-4-metil-4-aza-5 $\alpha$ -androstan-3-ona hizo descender la relación DHT/T en el núcleo (Liang y Heiss, 1981).

Para que el transporte del complejo hormona-receptor tenga lugar en el citoplasma al núcleo, independientemente

de que se lleve a cabo o no por los poros de la membrana nuclear, son necesarios sitios específicos de interacción con dicha membrana. Lefebvre y Novosad (1980) purificaron estas localizaciones de la membrana nuclear de próstata ventral de rata que desaparecen 24 horas después de la castración.

Esta fracción de la membrana nuclear tiene un alto contenido en lípidos, bajo en RNA y DNA, y aparentemente no presentan poros nucleares. Estos sitios de unión podrían estar involucrados en el transporte de esteroides dentro y fuera de la membrana.

#### 1.5.6. *Modo de acción de andrógenos en el núcleo*

Un número considerable de líneas de investigación indican que las proteínas receptoras de hormonas esteroideas reconocen regiones específicas del DNA, siendo estas regiones ricas en el par A-T (Adenina-Timina).

Lo que ocurre después de la interacción del complejo hormona-receptor con el DNA es todavía totalmente especulativo. Sin embargo, ciertas analogías estructurales entre la geometría molecular de los esteroides y el par T-A tal como se presenta en el DNA, inducen a pensar en una interacción directa del esteroide con el DNA en regiones ricas en el par A-T.

En este sentido, es interesante mencionar que el mecanismo propuesto por Ebright y Wong (1981) para la interacción del cAMP unido a su proteína receptora (CRP) con el DNA bacteriano, también presupone una interacción de parte de la estructura del nucleótido cíclico con regiones del DNA ricas en A-T para la activación de la transcripción.

Basándose en todo lo anterior, Sluyser (1983) propone

un mecanismo plausible y elegante, aunque aún totalmente es peculativo. Según este modelo, una vez dentro del núcleo el complejo activado hormona-receptor, se produce un reconocimiento, y posterior unión, entre el dominio III del receptor y regiones específicas del DNA ricas en A-T (fig. 8c). Esta unión modifica la conformación del receptor, lo que a su vez origina el cese de las interacciones entre el dominio II y el anillo D del esteroide. El anillo D puede entonces insertarse en el DNA, desestabilizar la doble hélice, e iniciar por tanto la transcripción (fig. 8d). Este modelo no excluye la posibilidad de que el receptor, al unirse al DNA, desplace o inactive a una proteína represora que actúe en esa región. También existen resultados que apuntan a una unión del complejo hormona-receptor, no sólo al DNA, sino también a ciertas proteínas cromosómicas.

Resumiendo, gran parte de los datos mencionados hasta ahora, Liao y col., (1981) han postulado un modelo hipotético sobre la acción de andrógenos en próstata ventral de rata. En este esquema hipotético (fig. 9), una proteína intracelular, en una forma ( $R^0$ ), que no puede unirse a andrógenos, se activa, mediante un proceso dependiente de energía (ATP, fosforilación), en una forma (R) que ya puede unir andrógenos ( $A^0$  = andrógeno que llega a la célula; A = andrógeno activo, formado en la célula a partir de  $A^0$ ). El complejo andrógeno-receptor (AR) se transforma, mediante un cambio conformacional, en la forma ( $AR^*$ ), que penetra en el núcleo y puede unirse a la cromatina.

Como consecuencia de estas interacciones, se favorece la síntesis de proteínas. Las primeras proteínas sintetizadas aparecen de 10 a 30 minutos después de la administración de testosterona. La síntesis de estas proteínas llamadas tem pranas no es inhibida por actinomicina D (Liang y Liao, 1975). Estos datos inducen a pensar a los autores que los

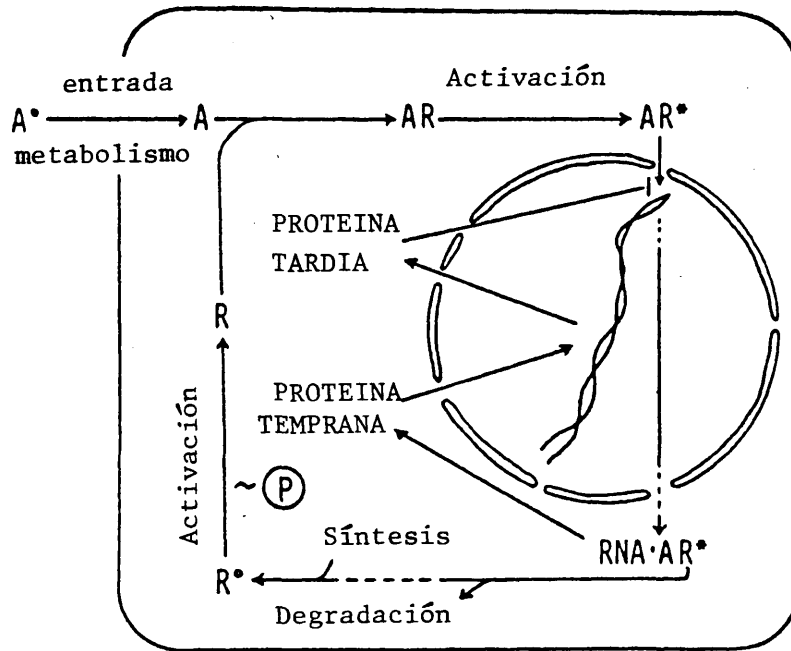


Figura 9. Modelo propuesto por Liao y col., (1981) sobre la acción de andrógenos en próstata ventral de rata.

andrógenos actúan en primer lugar en procesos postranscripcionales de maduración de los RNAs más que en la transcripción en sí misma. Entre las proteínas tempranas se encuentran los propios receptores androgénicos (Blondeau y col., 1982). Ciertas proteínas tempranas penetran en el núcleo e intervienen en respuestas tardías de andrógenos, como son la reconstrucción de orgánulos, o la activación de la transcripción y síntesis posterior de unas proteínas llamadas tardías. Entre estas proteínas tardías, casi todas proteínas de secreción, está la  $\alpha$ -proteína o PBP, una de cuyas subunidades (Chen y col., 1982) actúa a nivel nuclear, inhibiendo la unión del complejo hormona-receptor, con la cromatina (retroinhibición).

Siguiendo con el modelo, el complejo hormona-receptor sale del núcleo unido al RNA, siendo este proceso importante en el reciclaje del receptor proteico del núcleo al citoplasma. Si bien no existe evidencia directa de esta salida, sí hay datos experimentales en los que apoyarse. Así, se ha demostrado que el complejo estrógeno-receptor, o andrógeno-receptor puede unirse a ciertas ribonucleoproteínas de útero y próstata, respectivamente (Liao y col., 1973, 1980b; Liang y Liao, 1974). También se ha comprobado que el complejo dihidrotestosterona-receptor, unido a columnas de DNA-celulosa, se libera de las mismas con una solución de polinucleótidos, pudiendo ser oligonucleótidos hasta de 10 a 20 nucleótidos, pero no más pequeños y poli (U,G) (Liao y col., 1981).

El receptor, una vez en el citoplasma, se separa del RNA en la forma  $R^*$ , formando un conjunto con la proteína receptora de nueva síntesis. Este conjunto puede sufrir procesos de degradación o de activación, repitiéndose en este último caso el ciclo.

Se ha postulado también la hipótesis (Hechter, 1966; Singhal y col., 1970) según la cual el AMP<sub>c</sub> pudiera ser un segundo mensajero en la acción de la testosterona sobre las glándulas accesorias de rata. Efectivamente, estudios "in vivo" en próstata muestran que, tanto la administración de testosterona, como de AMP<sub>c</sub> y teofilina (inhibidor de la fosfodiesterasa) a ratas castradas, produce un aumento del peso de la próstata, y de sus enzimas glicolíticas (Singhal y col., 1974). Sin embargo, contrariamente a la testosterona, el AMP<sub>c</sub> no restaura totalmente la morfología de la próstata (Mangan y col., 1973) cuando se incuban "in vitro" durante cuatro horas en testosterona o AMP<sub>c</sub>, trozos de próstata pertenecientes a ratas castradas siete días antes. Ambos productos incrementan la síntesis de DNA y proteínas; ahora bien, la síntesis de colesterol se incrementa con la testosterona, mientras que el AMP<sub>c</sub> la inhibe (Singhal y Schaffner, 1980). En conclusión, el AMP<sub>c</sub> puede realizar algunas funciones semejantes a las de la testosterona, pero con menor intensidad. Otras hormonas, como la prolactina y el estradiol, pueden ejercer una acción sinérgica con la testosterona, o similar a ella, en el crecimiento y mantenimiento de la próstata (Ehrlichman y col., 1981; Prins y Lee, 1982b; Thompson y col., 1982).

#### 1.5.6.1. Efectos producidos por la falta de andrógenos

La mayor parte de los sistemas empleados para el estudio de los andrógenos se lleva a cabo en animales sin ellos, lo que se consigue en la mayoría de los casos, mediante la castración. Sus principales efectos con respecto a la próstata ventral de rata se describen a continuación.

Otro tipo de tratamiento es la administración de antagonistas. Estas son sustancias ampliamente utilizadas para contrarrestar el efecto de los andrógenos y están formadas

por estrógenos naturales o sintéticos así como por otros esteroides que son capaces de llevar a cabo la regresión de los tejidos dependientes de éstas hormonas (Callaway y col., 1982). Los antagonistas pueden reducir hasta un 90% la concentración efectiva de dihidrotestosterona en el tejido. (Bruchovsky y col., 1975).

En el primer caso, para regenerar la glándula prostática y así estudiar la acción de andrógenos, es preciso suministrar andrógenos exógenos en las condiciones que se comentarán en el apartado 3 de esta tesis.

En el segundo caso, al suprimir las dosis de antagonista, los andrógenos retornan a ejercer su acción que de esta manera puede ser estudiada.

#### LA CASTRACION

Durante las primeras 24 horas después de la castración se dan pequeños cambios en la ultraestructura y actividad proteolítica celular de la próstata. En este tiempo la T, DHT y androstanodiolos desaparecen del plasma (Córpechot y col., 1981) y de la próstata, concretamente la DHT no se detecta por RIA en núcleos de próstata ventral de rata (Blondeau y col., 1982). Los receptores citoplasmáticos que dan libres (Joun-Testas, 1981) y su concentración no cambia significativamente.

Entre el cuarto-séptimo día después de la castración los receptores androgénicos del citosol descienden progresivamente (Blondeau y col., 1975; Verhoeven y col., 1975) relacionándose, con un aumento de la actividad proteolítica de la próstata.

El peso de la próstata desciende drásticamente hasta

el décimo día de la castración, a partir de la cual, continúa el descenso pero mucho más lentamente. (Huttunen y col. 1981). 17 días después de la castración, el número de células epiteliales decrece en un 92% y su tamaño en un 85%. El número de células del estroma se reduce en un 39% y su tamaño en un 23%. Luego desciende tanto el epitelio como el estroma pero mucho más rápidamente el primero. De todo el parénquima acinar, que disminuye mucho más rápidamente de tamaño que el tejido interacinar, desciende más rápidamente el tejido epitelial que el lumen, (Arvola, 1961; DeKlerk y Coffey, 1978; Huttunen y col., 1981).

No solo el peso y los productos de secreción disminuyen con la castración (Heyns y col., 1977) sino también la actividad enzimática en general, y en particular la 5 $\alpha$ -reductasa (Moore y Wilson, 1973). Las enzimas mitocondriales descienden produciéndose una disminución en la respiración celular (Barron 1946; Willians-Ashman 1954) debido a una reducción del número de mitocondrias por célula (Edelman 1974). En núcleos de próstata de rata la actividad RNA polimerasa I desciende rápidamente alcanzándose valores del 50% a las 24 horas, algo más lentamente desciende la RNA polimerasa II, consecuentemente los niveles de RNA son solo del 8%, tres días después de la castración (Hosoya y col., 1978).

El DNA desciende en cantidad más lentamente pues a los 7 días de castración su contenido es aún de un 25% del valor normal. La castración hace disminuir también las cantidades de proteínas y colesterol prostático hasta un 13 y un 12% respectivamente en relación a próstatas de ratas no castradas (Singhal y col., 1979).

En cuanto a las velocidades de síntesis son de un 8 y 5% para el DNA y colesterol respectivamente, comparando siempre próstatas de ratas castradas con las correspondientes no

castradas. Sin embargo, para las proteínas la velocidad de síntesis permanece constante, lo que se atribuye a la síntesis de enzimas proteolíticas que dan lugar a la hidrólisis de las proteínas de la glándula (Singhal y col., 1979).

#### 1.6. EVOLUCION DE LA PROSTATA A LO LARGO DEL DESARROLLO DE LA RATA

En la mayor parte de los mamíferos, el desarrollo de la glándula prostática desde la fase embrionaria hasta la vida adulta está bajo el control de las hormonas sexuales esteroideas (Moore, 1944; Huggins, 1945; Lasnitzki y Mizuno, 1977).

En la rata macho, el desarrollo funcional de los tejidos sexuales accesorios, entre ellos la glándula prostática, tiene lugar en determinadas etapas que dependen críticamente del contenido de hormonas, incluidos los andrógenos (Ohno, 1979). Estas etapas se acompañan de cambios morfológicos importantes en el desarrollo de la próstata, y se puede considerar que son: neonatal, prepubertad, pubertad, madurez sexual, y la senil, siendo las etapas comprendidas entre el final de la vida fetal y la pubertad cruciales en el desarrollo (Higgins y col., 1981).

El estudio de los niveles de andrógenos (testosterona y dihidrotestosterona) en plasma y próstata a lo largo del desarrollo, hasta la madurez sexual se ha llevado a cabo por Córpechot y col., 1981, utilizando como técnica el RIA, y sus resultados se muestran en las figuras 10 y 11. A continuación se van a describir estas etapas.

### 1.6.1. *Período neonatal*

Es bien conocido que la organogénesis del tejido prostático en la fase embrionaria se inicia por la acción de los andrógenos (Lasnitzki y Mizuno, 1977). En las últimas etapas de la vida fetal, la testosterona producida por los testículos fetales (Feldman y Block, 1978; Weisz y Ward, 1980) promueve la diferenciación de las vesículas seminales y el epidídimo a partir del conducto de Wolffian, y la dihidrotestosterona estimula el desarrollo de la próstata a partir del sinus urogenital como ampollas epiteliales que se proyectan desde el sinus epitelial en el mesénquima que las rodea (Lasnitzki y Mizuno, 1977).

El período neonatal es crítico para el desarrollo posterior de la próstata ventral. Así, si durante los cinco primeros días de vida, en los que los niveles de T y DHT en suero se reducen a la mitad de los encontrados en el feto de 18 días, se suministran estrógenos a ratas, se observan en el período de madurez sexual cambios similares a los producidos por la castración en la etapa adulta (Higgins y col., 1981). Esto muestra que los estrógenos pueden antagonizar el efecto de los andrógenos en el período neonatal.

### 1.6.2. *La inmadurez sexual-prepubertad*

En ratas macho se presenta esta etapa desde el destete hasta la 6<sup>a</sup> semana de vida.

En la primera etapa de este período de inmadurez sexual, los niveles de testosterona y dihidrotestosterona en plasma son muy semejantes, (fig. 10) y alcanzan valores mínimos. Hacia la 5<sup>a</sup> semana, empiezan a elevarse las concentraciones de testosterona y dihidrotestosterona en plasma; al mismo tiempo, los niveles de dihidrotestosterona en prós

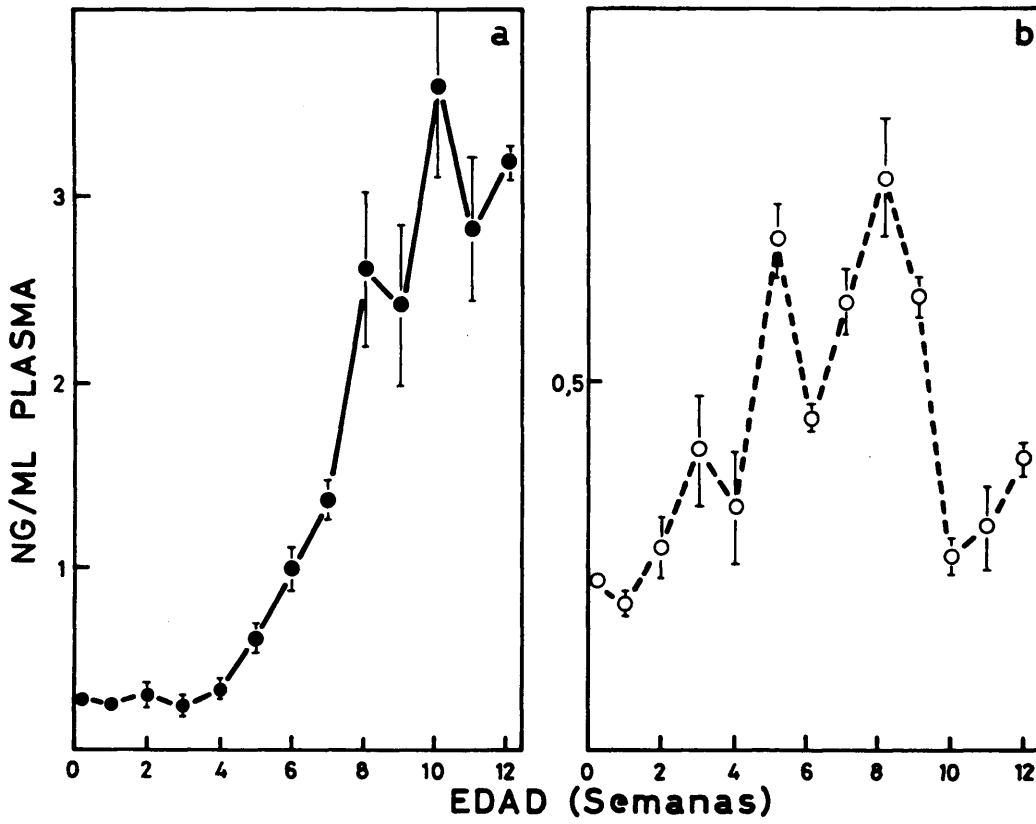


Figura 10. Variación de los niveles de testosterona (●) y de dihidrotestosterona en plasma (○) con la edad de la rata. Las barras representan ESM. Según Corpechot y col., 1981.

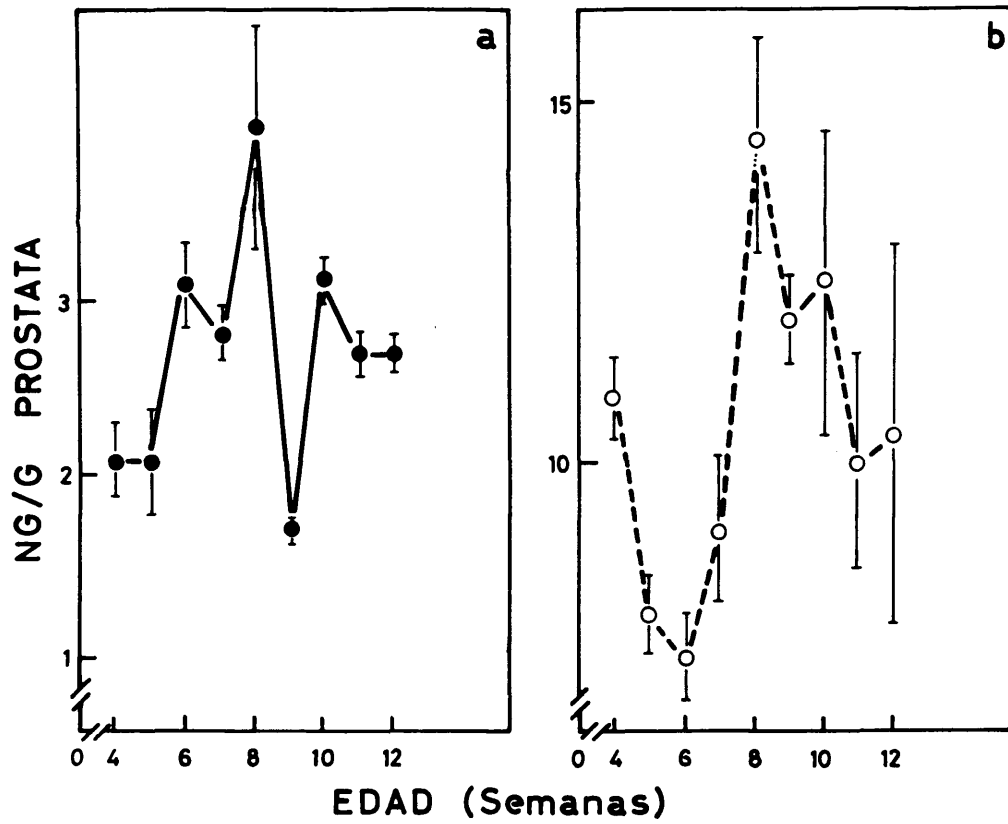


Figura 11. Variación de los niveles de testosterona (●) y dihidrotestosterona (○) en próstata con la edad de la rata. Las barras representan ESM. Según Corpechot y col., 1981.

tata sufren un fuerte incremento, coincidiendo con la prepubertad del animal (Córpechot y col., 1981). En este período, el tratamiento con estrógenos no parece tener grandes repercusiones en el peso de la próstata, contenido en DNA, síntesis y secreción de proteínas en el período adulto del animal (Higgins y col., 1981).

### 1.6.3. *La pubertad*

Esta etapa, previa a la madurez sexual, se localiza en la rata macho de unos 160-220 g en nuestras condiciones de cría. Considerando que es hacia la 7<sup>a</sup> semana de vida en que tiene lugar la irrupción de la madurez sexual (Higgins y col., 1981).

En este momento los andrógenos en plasma se incrementan considerablemente (Moguer, 1977; Córpechot y col., 1981). La concentración de testosterona en plasma, que durante la etapa anterior mantenía valores similares a los de DHT, se incrementa notablemente hacia la 7<sup>a</sup> semana, sobrepasando los niveles de DHT y manteniéndose ya, básicamente, estos niveles durante la vida adulta (fig. 10). Junto con este aumento de los niveles de testosterona en plasma, se da un crecimiento rápido del tejido prostático (ver 3.1, fig. 18), lo que conlleva a una pronunciada síntesis de productos de secreción (Higgins y col., 1981). El tratamiento con estrógenos en este período conduce a cambios similares en la madurez sexual, aunque menos drásticos que los que se producen cuando se administran en el período neonatal.

#### 1.6.4. *La madurez sexual*

Durante la vida adulta, y bajo la influencia de los andrógenos, el peso de la glándula, la organización celular y su función exocrina, persisten (Huggins, 1945). Los niveles de testosterona en plasma mantienen un ritmo circadiano durante las 24 horas del día, y las concentraciones en plasma y próstata son del orden de 3 ng/ml y 15 ng/g, respectivamente, mientras que los valores encontrados en testículos son unas 100 veces superiores (Córpechot y col., 1981).

La DHT, el principal metabolito de la testosterona en próstata (Morfin y col., 1978), alcanza concentraciones en próstata ventral de rata de 15 ng/g, mientras que en plasma sus niveles son unas cuatro veces inferiores a los encontrados para la testosterona (Córpechot y col., 1981).

La colesterogénesis en próstata ventral de rata mantiene un ritmo circadiano pero, al contrario de lo que sucede con la hepática, es predominante por el día (Schaffner, 1981). El tratamiento con estrógenos causa, en esta etapa, efectos similares en la próstata a los producidos por la castración en este mismo período. Esto muestra la estrecha correlación de los andrógenos con los tejidos accesorios sexuales (Tesar y Scott, 1964; Higgins y col., 1981).

#### 1.6.5. *El envejecimiento*

En ratas macho de 18 meses la producción "in vitro" de testosterona en los testículos a partir de progesterona es menor que la que se produce en las ratas adultas de 4 meses (Eik-Nes, 1970; Chan y col., 1977). Del mismo modo, la concentración de testosterona en suero de ratas seniles es

inferior en todo momento a la encontrada en ratas adultas, pudiendo disminuir hasta un 50% (Ghanadian y col., 1975; Kaler y Neaves, 1981). El ritmo circadiano observado en estas ratas, no sólo se conserva, sino que se reproduce, aun que a niveles más bajos (Chan y col., 1977).

Una glándula como la próstata que necesita del aporte continuo de esteroides para el mantenimiento de su función fisiológica depende de gran medida de sus receptores hormonales. El número de estos receptores por célula disminuye progresivamente con el incremento de la edad, sin embargo, la afinidad de unión a la hormona es esencialmente idéntica a la encontrada para ratas adultas (Shain y col., 1973, 1975) y su número se reduce hasta un 50% (Boesel y col., 1980).

Por otro lado, la concentración de proteína PBP (que une inespecíficamente esteroides) se incrementa con la edad y decrece ligeramente a partir de los doce meses (Heyns y col., 1977).

Las células epiteliales de la próstata ventral de la rata de 20 meses presentan un alto grado de invaginaciones en el acino cuando se comparan con las ratas adultas (Singhal y col., 1970) correlacionándose con un aumento de la síntesis de colesterol observada en estas células epiteliales. Al mismo tiempo con la edad aparecen apóxicos de colesterol en la secreción prostáticas de hombres de edad avanzada (Shaffner, 1981).

En el hombre y el perro de edad avanzada se produce un fenómeno biológico que se desarrolla en todos aquellos organismos que tienen un funcionamiento prostático y hormonal normales, la hiperplasia o adenoma de la próstata, que se caracteriza por un aumento del número de las células así como por un aumento en el peso de la glándula.

La próstata hiperplásica acumula grandes cantidades de Zn (Gyorkey y col., 1967), colesterol (Swyer, 1942) y de DHT (Ofner, 1968; Habib y col., 1976; Meikle y col. 1981). En este estado los niveles de la enzima  $5\alpha$ -reductasa, que transforma testosterona en dihidrotestosterona, son más altos en el estroma que en el epitelio (Bruchovsky y col., 1981; Krieg y col., 1981) con respecto a valores en próstatas normales. Esto está en correlación con los estudios de Cunha y col., (1981) que involucran al estroma en el crecimiento e integridad funcional del epitelio. La hiperplasia se desarrolla de forma espontánea en la próstata dorsal de la rata pero no en la ventral.

El estradiol y la prolactina se sabe que acumulan el Zn en la próstata dorsolateral de la rata (Munizing y col. 1977) estos y otros experimentos (ver Morfin y col., 1978) muestran que la aparición de la hiperplasia podría estar correlacionada con factores externos a la próstata tales como estradiol, prolactina, insulina y espermina (Edwards y col., 1976; Ung y col., 1976; Ehrlichman y col., 1981).

#### 1.7. LIPIDOS EN LA PROSTATA

Haciendo un breve recorrido cronológico, los primeros trabajos sobre lípidos en la glándula prostática se remontan a 1873 en que Tompson comunica la presencia de material con doble refracción en próstata humana. Estas investigaciones fueron confirmadas y ampliadas en años sucesivos. Así Posner y Scheffer (1909) observaron la presencia de lípidos en células epiteliales y lumen del acino prostático. En la secreción prostática también se observó repetidamente la presencia de lípidos (Tompson, 1873; Furbringen, 1881).

En años sucesivos se emprendieron los trabajos necesarios para estudiar, no sólo lípidos totales, sino también las distintas clases de lípidos presentes en la glándula prostática. Es de destacar, por ejemplo, los estudios histológicos de Swyer en 1942, empleando la reacción de Schultz, y que demostraron que, en tejido prostático humano con hiperplasia, existe más colesterol que el presente en tejido normal. Por otra parte Scott (1945) en estas próstatas encuentra que el colesterol esterificado es el 10% del colesterol total.

Más tarde la investigación se centró en el estudio de la biosíntesis de lípidos prostáticos y de su control hormonal, Nyden y Williams-Ashman, en 1953, incubaron cortes de tejido prostático de rata, tanto normal como castrada, con acetato y fosfato marcados radiactivamente. En todos los casos se obtuvieron lípidos marcados, si bien la castración disminuye la lipogénesis y la respiración celular. La administración de testosterona a estas ratas parece restablecer estos parámetros. Comparando la cantidad de fósforo incorporado a material lipídico con la correspondiente de acetato, Nyden y col. comprobaron que los andrógenos afectan de manera acusada la cantidad de acetato radiactivo que se introduce en lípidos. Sin embargo, los andrógenos ejercen una influencia mínima sobre los compuestos fosforilados, de los cuales los más afectados son los fosfolípidos. Hay que resaltar, en la valoración de los resultados anteriormente expuestos, que estos autores trabajaron con actividades específicas sumamente bajas.

En la misma línea que lo expuesto anteriormente, Farnsworth y Brown (1961) obtienen, en incubaciones "in vitro", con próstata, una estimulación de la síntesis, tanto de ácidos grasos como de proteínas, en respuesta a concentraciones de testosterona del orden de  $10^{-7}$  M. Según esto, la síntesis de ácidos grasos de cadena larga en próstata

está bajo control hormonal. Es de destacar no obstante, que la repetición de estos experimentos por Hollander (1963) se llevó a cabo con serias dificultades. Esta investigación encontró, sin embargo, que existe una actividad de acetil-CoA carboxilasa en homogeneizados de próstata, y que su actividad está estimulada por el citrato en concentración  $10^{-4}$ M.

Doeg, en 1968, planteó unos ensayos en los que, mediante la incorporación de ( $1-^{14}$ C) acetato "in vivo", observó que los lípidos previamente sintetizados se encuentran localizados en gran cantidad en las mitocondrias. Estas mitocondrias, obtenidas de próstatas de ratas en la pubertad, presentan los lípidos radiactivos unidos preferentemente a la membrana.

Miyao, en 1965, estudiando el colesterol y los fosfolípidos presentes en las secreciones prostáticas de perro y rata, observó que el colesterol administrado por vía parental se encontraba en la secreción prostática. Ahora bien, cuando años más tarde (Moon y Bunge, 1970) se trató de encontrar una correlación entre el colesterol presente en plasma humano y el colesterol del semen, no se llegó a ningún resultado satisfactorio.

A pesar de la importante presencia de lípidos en membranas prostáticas (Doeg, 1968), son pocos los estudios que se han realizado sobre los distintos tipos de fosfolípidos presentes en próstata. Rajalakshmi y col. en 1973 separaron fosfolípidos de los lípidos totales, y cuantificaron sus diferentes clases. Estos autores hallaron que la fosfatidil colina, seguida de la fosfatidiletanolamina, son los dos fosfolípidos más abundantes en próstata dorsal lateral de cobaya.

También merecen especial atención por su importancia

clínica los estudios, tanto de la hiperplasia benigna como del adenoma y del carcinoma prostáticos. En este sentido, y en cuanto a lípidos se refiere, son notables los estudios histocuantitativos (Braunstein, 1964; Takkar y Kamboj, 1971) y los trabajos de Goldstein (1975), que cuantificó el contenido de colesterol por cromatografía de gases.

Por último, destacaremos que el colesterol y sus derivados, son con mucho los más estudiado de entre todos los lípidos de la próstata. A esto ha contribuido la importante labor sobre la colesterogénesis prostática realizada por el grupo de Singhal en el instituto de Microbiología de la Universidad Estatal de New Jersey (USA), y que ha sido recopilado en una revisión por Schaffner (1981).

### 1.8. OBJETIVOS

Como se ha descrito en la introducción, la próstata constituye una región anatómica con una función no bien establecida como glándula sexual accesoria o secundaria, y que ha sido estudiada ampliamente en los últimos años con muy variados enfoques científicos.

Por otra parte, la próstata se ha escogido como modelo en el estudio de los mecanismos bioquímicos por los que se rige la acción fisiológica de los andrógenos, en sus tejidos diana. Se han encontrado un gran número de analogías entre los procesos de hiperplasia prostática y la respuesta de la glándula a la administración de testosterona a ratas previamente castradas.

Se admite hoy en día que un 80% de los hombres de más de 60 años presentan, en mayor o menor grado, el adenoma o hiperplasia prostática (vital statistics), siendo preciso la extirpación de la glándula en uno de cada siete casos. Por otro lado, es bien conocido que el cáncer de próstata es la segunda causa más común de muerte por cáncer en el hombre. Dada la estrecha correlación entre los lípidos y el cáncer en general, algunos autores en recientes publicaciones (Weinstein, 1983; Sabine 1983) manifiestan la necesidad de llevar a cabo el análisis de los lípidos celulares, en particular los de la membrana, de forma semejante a la realizada con proteínas y ácidos nucleicos para establecer comparaciones.

Teniendo en cuenta los pocos trabajos existentes dedicados al estudio de los lípidos de la próstata a lo largo de su desarrollo y a que, de éstos, una gran parte se dedican al colesterol y sus derivados, y pocos al estudio de los triacilglicéridos, ácidos grasos y fosfolípidos;

en el presente trabajo se persiguen los siguientes objetivos

- 1º) Estudio cualitativo y cuantitativo pormenorizado de los ácidos grasos presentes en fosfolípidos, triacilglicéridos, ácidos grasos libres y lípidos totales, así como estudio cuantitativo de fosfolípidos y triacilglicéridos de próstata ventral de rata.
- 2º) Estudio de la biosíntesis de ácidos grasos, triacilglicéridos y fosfolípidos en sistemas "*in vitro*" e "*in vivo*" a lo largo del desarrollo animal, con especial atención a la pubertad.
- 3º) Estudio de la acción de andrógenos sobre la biosíntesis lipídica.

## II. MATERIALES Y METODOS

## 2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Todos los experimentos se realizaron con ratas Wistar macho, de diferentes edades, según el requerimiento de cada ensayo. Las ratas fueron criadas y mantenidas en un estabulario a temperatura y humedad controladas, con 12 horas de luz y 12 de oscuridad alternativamente. La dieta de mantenimiento es UAR de Panlab y su composición se detalla en la tabla I. El agua se suministra *ad libitum*. Las ratas Wistar empleadas en este trabajo tienen la relación edad-peso que se muestra en la figura 12. Se van a resaltar algunos períodos del desarrollo de las ratas con la siguiente relación edad-peso:

inmadurez sexual .....	por debajo de 120 g
prepubertad .....	(entre la 3 <sup>a</sup> y la 6 <sup>a</sup> semana)
pubertad .....	160-220 g (de 40-60 días)
adultas jóvenes .....	220-320 g (de 60-80 días)
adultas plenas .....	por encima de 330 g (después de la 11 <sup>a</sup> semana)

En los experimentos se utilizó la próstata ventral de rata, exclusivamente. Estos lóbulos son los más accesibles de la glándula y los más abundantes en masa, y su localización en el sistema urogenital de la rata macho se observa en la figura 13.

Para la extracción de la próstata las ratas se anestesiaron con eter y se sacrificaron por exanguinación (operación llevada a cabo entre las 12 y las 14 horas). Inmediatamente después de realizada la extracción de los dos lóbulos, se limpian de todo resto de tejido adiposo adherido, y se pesan con rapidez en cápsulas de plástico. Durante todo este tiempo se mantiene la próstata sobre baño de hielo a 4°C. La glándula se utiliza siempre inmediatamente después

TABLA I

Composición de la dieta completa de  
mantenimiento para ratas UAR A04, PANLAB

Composición

Cereales, azúcar .....	8,31%
Proteínas vegetales (turtó) .....	6,9%
Proteínas animales .....	6%
Complemento vitamínico-mineral...	4%

Características

Proteína bruta .....	17%
Lípidos .....	3%
Glúcidos .....	58,7%
Celulosa .....	4,3%
Minerales .....	5%

Vitaminas

Vitamina A .....	8.500 U.I./Kg
Vitamina D <sub>3</sub> .....	2.020 "
Vitamina B <sub>1</sub> .....	7 mg/Kg
Vitamina B <sub>2</sub> .....	6,5 "
Vitamina B <sub>3</sub> .....	16,5 "
Vitamina B <sub>6</sub> .....	2,15"
Vitamina B <sub>12</sub> .....	0,02"
Vitamina E .....	33 "
Vitamina K <sub>3</sub> .....	2,50"
Vitamina PP .....	75 "
Acido folico .....	0,50"
Biotina .....	0,04"
Colina .....	1580 "

Minerales

P .....	5.900 mg/Kg
Ca .....	6.000 "
K .....	6.000 "
Na .....	2.400 "
Mg .....	2.130 "
Mn .....	80 "
Fe .....	240 "
Cu .....	29 "
Zn .....	85 "
Co .....	1,55"
I .....	Aportado en forma asimila ble por algas marinas.

Curva de crecimiento rata Wistar (CFMB)

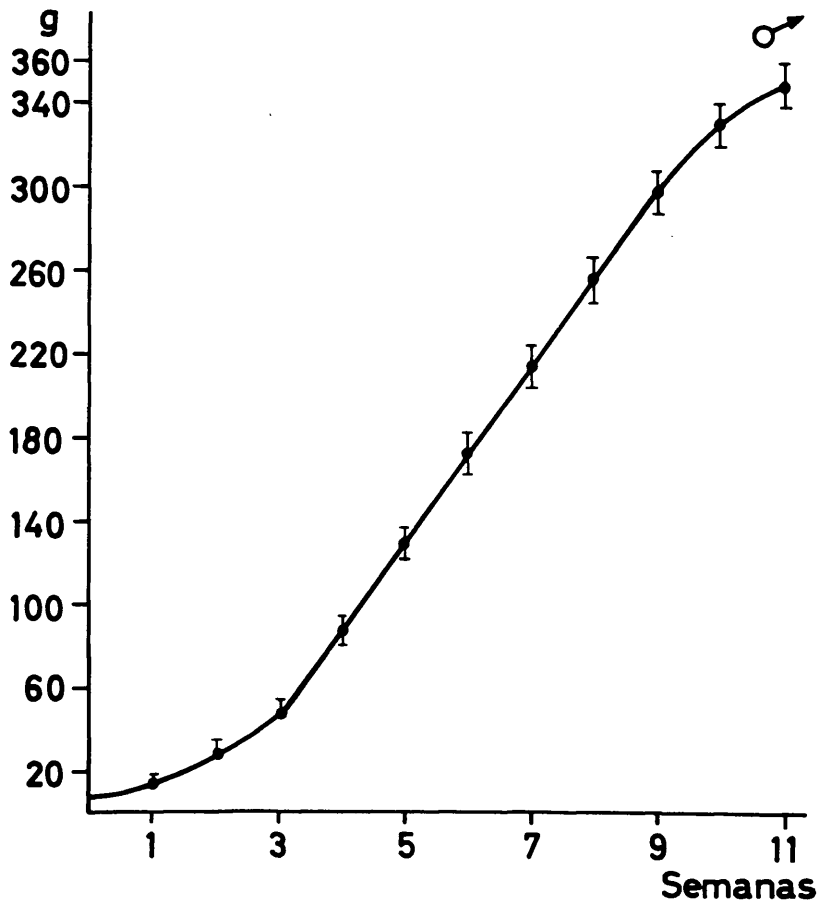
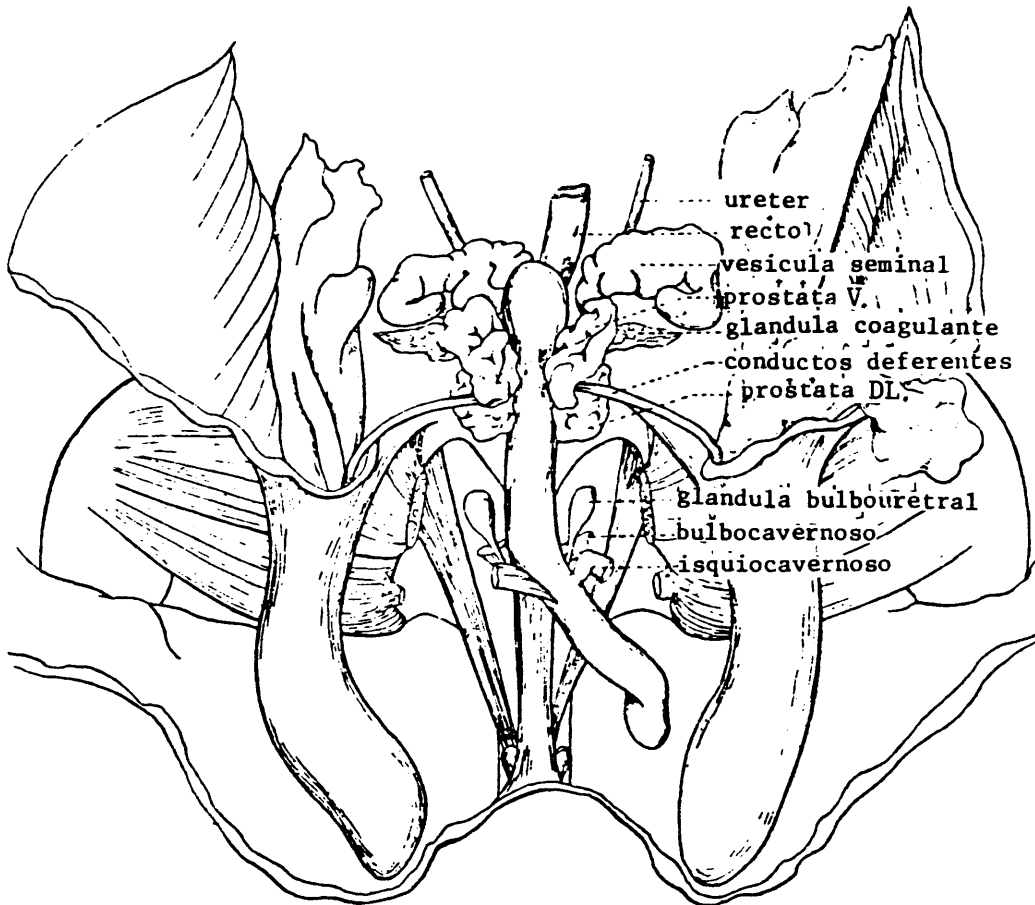


Figura 12. Curva de crecimiento del peso corporal en gramos (g) de rata Wistar macho durante las 11 semanas siguientes al nacimiento.



*Figura 13.* Sistema Urogenital de la rata macho.  
Próstata Ventral (V) y dorsolateral  
(DL). Según Green 1968.

de ser extraída, salvo en los casos en que se procede a su congelación para ser liofilizada o utilizada como próstata fría en las extracciones de lípidos.

## 2.2. SISTEMA IN VIVO PARA EL ESTUDIO DE LA BIOSINTESIS DE LIPIDOS

Se realizaron dos tipos de experimentos "in vivo" para estudiar la incorporación de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a las distintas clases de lípidos de próstata ventral: a) ratas adultas, sometidas a tratamiento para retrotraer y regenerar sus próstatas; b) ratas que se encuentran en distintas etapas del desarrollo.

Se describe a continuación el método para obtener próstatas, de ratas adultas, que regeneran sus tejidos. Y después se procederá a describir el método de suministrar el marcador isotópico, tanto a estas próstatas como a las normales.

### *2.2.1. Control de los niveles de andrógenos y del crecimiento prostático*

Para conseguir próstatas en pleno período de regeneración, como el que se da en la prepubertad y en la pubertad, y dada la dificultad de estandarizar estas etapas *in vivo*, debido a la corta duración de las mismas, se procede a su obtención de forma provocada.

Mediante la castración del animal adulto, se consiguen próstatas semejantes a las de ratas en la etapa inmadura. Después, se suministra un andrógeno y se logran próstatas en un estado de regeneración intenso y homogéneo, como el que se da en la pubertad.

La castración de ratas adultas se ha realizado como se describe en el siguiente apartado. A los 7 días de practicada la operación, el peso de la próstata es aproximadamente un tercio de su peso anterior a la castración y equivalente al que muestran las ratas en la etapa inmadura (ver 3.1). Los niveles de testosterona (T) y dihidrotestosterona (DHT) en plasma descienden tanto que no son detectables por RIA (Corpéchet y col., 1977).

Para conseguir que la próstata de rata adulta, después de la castración, regenere sus tejidos y aumente de peso, es suficiente restablecer los niveles de DHT en plasma. Esto se consigue inyectando subcutáneamente al animal testosterona, lo que demuestra que la DHT se puede formar por un metabolismo extratesticular de la testosterona (Corpéchet, 1981), debido a lo extendido que se encuentra la enzima  $5\alpha$ -reductasa en otros tejidos de rata.

Las concentraciones de testosterona, ó de DHT, utilizadas para conseguir que las próstatas regeneren su peso y células, se han elegido de acuerdo con la bibliografía existente (ver 3.1) y con los trabajos de Blondeau y col. (1982), estos autores estudian la variación en el tiempo de la testosterona en plasma y de la dehidrotestosterona en próstata de ratas de 300 g, castradas 24 horas antes, y a las que se suministra por vía subcutánea 75  $\mu$ g de testosterona. Obtienen como resultado una vida media de testosterona en plasma y de dehidrotestosterona en próstata de 3 y 12 horas respectivamente (figura 14). En dicha figura se observa, además, que los niveles de testosterona en plasma alcanzan valores próximos a los normales (ver figura 10) a la hora de suministrada la testosterona. Por todo lo visto anteriormente, y para que los niveles de andrógeno en plasma se mantengan las 24 horas, se han suministrado dosis de 0'2 y 2 mg de T o de DHT en 0'2 ml de aceite de sésamo, por vía subcutánea y diariamente, a animales de 300 g de peso, durante los cua-

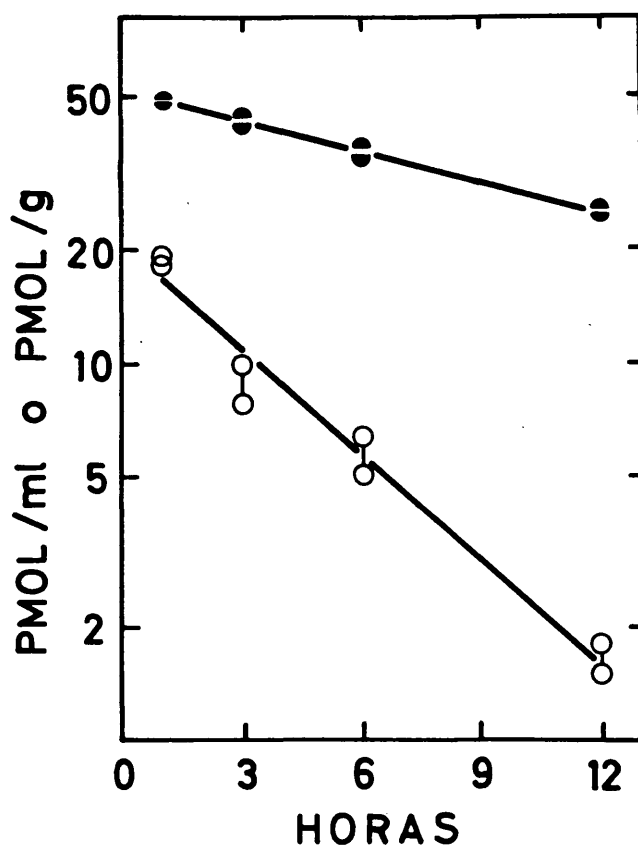


Figura 14. Niveles de T (testosterona: 0 — 0) en plasma y de DHT (Dihidro testosterona ● — ●) en próstata tras la inyección de T (75 mg en 0,2 ml de etanol absoluto) a ratas macho (300-320 g) castradas 24 horas antes. T en plasma expresada en p moles/ml y DHT en próstata en pmol/g. Cada medida se lleva a cabo por triplicado en dos muestras individuales. Según Blodeau y col., 1982.

tro días que ha durado la regeneración de la próstata.

### 2.2.2. *Castración quirúrgica*

Se ha llevado a cabo, mediante orquidectomía bilateral, según se indica a continuación. El animal, una vez anestesiado, se coloca en posición decúbito supino. En caso de retracción de los testículos en la cavidad abdominal, se ejerce una ligera presión sobre la pelvis para hacerlos bajar a la región del escroto. Se realiza una incisión longitudinal sobre la piel de cada testículo, se sujeta éste con una pinza cuidadosamente y, entonces, se cortan las capas conjuntivas que lo envuelven, hasta que el testículo quede totalmente libre. El cordón espermático, que comprende los vasos sanguíneos y el conducto deferente, se liga doblemente, y se corta entre ambas, quedando de este modo extirpado el testículo. Con el otro se procede de modo análogo, suturando la túnica conjuntiva, posteriormente, con puntos sueltos, y de igual modo se procede con la piel. Posteriormente se aplica un desinfectante en los puntos de sutura. Las ratas se mantienen en las condiciones indicadas en 2.1.

### 2.2.3. *Aporte de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a la próstata*

Tanto en los experimentos en los que se utilizan animales en distintos estadios de su desarrollo como en el sistema que utiliza animales adultos con próstatas en estado de regeneración, se procede a la inyección en próstata de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ).

El acetato sódico ( $1-^{14}\text{C}$ ), de actividad específica 56 mCi/mmol, fue disuelto en tampón fosfato 50 mM, pH 7'4, hasta concentración 0'5 mCi/ml. La inyección de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) se

realiza directamente en próstata, del modo siguiente: una vez anestesiadas con eter y, en posición decúbito supino en la mesa de disección, se hace una incisión longitudinal de unos 2 cm en el abdomen de la rata, justo a la altura de la próstata. Los lóbulos de la próstata ventral son entresacados, teniendo mucho cuidado de no dañarlos, con ayuda de unas pinzas. En este momento se procede a inyectar (con microjeringa Hamilton de 10  $\mu$ l de capacidad) el acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ). Dependiendo del tamaño de los lóbulos se realiza una, o dos inyecciones (una en cada lóbulo) de 5  $\mu\text{Ci}$  de acetato. En las ratas pequeñas en estado inmaduro solo se distingue un lóbulo a simple vista. Rápidamente se cose el peritoneo y posteriormente la piel de la rata con puntos sueltos, y se deja que el animal se recupere durante 1 hora, transcurrida la cual se sacrifica, y se extrae la próstata como se indica en 2.1.

Cada una de estas próstatas se homogeniza como en 2.3.1.1. El homogenizado se transfiere a un tubo B-29, de 60 ml, con tapón esmerilado, para proceder a la extracción de los lípidos que se separaran, o no, en las distintas clases (2.4) para medir su radiactividad, según se indicará más adelante (2.6).

## 2.3. SISTEMAS IN VITRO PARA EL ESTUDIO DE LA BIOSINTESIS DE LIPIDOS

### 2.3.1. *Preparados enzimáticos*

El tejido prostático se preparó de dos formas distintas, sistemas libres de células, y tejido troceado, según se indica en cada experiencia.

#### 2.3.1.1. Sistema libre de células

Se entiende por sistema libre de células todos aquellos sistemas en los que la integridad celular, evidenciada por la presencia de una membrana plasmática intacta, ha sido destruida. Estos sistemas libres de células corresponden en nuestro caso a los homogenizados en medio tamporado. A este fin, una vez extraída la próstata y troceada finamente con tijeras, (siempre en baño de hielo) se procede a su homogenización, con Potter-Elvehjem de vidrio y émbolo de teflón en dos soluciones reguladoras: tris 50 mM, pH 7'4, ó solución de Hank pH 6'6, siempre en proporción 3:1 (v/p).

El émbolo de teflón se fija a un motor que se hace girar a bajas revoluciones, hasta conseguir una buena homogenización. Después de filtrar el homogenizado por triple capa de gasa, el filtrado se centrifuga a 1400xg durante 10 minutos, a 4°C (centrífuga Kontron Hermle ZK 400) para eliminar núcleos, membranas, células intactas y otros restos celulares. El sobrenadante, cuidadosamente decantado para evitar el paso de la capa de grasa, constituye el denominado preparado enzimático sobrenadante. El homogenizado obtenido antes de la centrifugación se conoce como preparado enzimático "total". Ambos preparados son utilizados en esta Tesis.

#### 2.3.1.2. Tejido troceado

El "tejido troceado" es una variedad en cuanto a la forma de hacer preparaciones de tejidos aislados. Se utiliza en aquellos casos en que, como ocurre con la próstata, el tejido sea lo suficientemente grande como para dificultar su incubación directa. Para ello, una vez extraída la próstata, se pesan lotes entre 20-120 mg según el ca

so, y se dividen en trozos de tamaño adecuado, procurando no realizar demasiados cortes, para evitar la disgregación excesiva del tejido. El tejido así preparado, se introduce en tubos de incubación, a los que previamente se ha adicionado el medio en el que se va a realizar la incubación.

### 2.3.2. Medios de incubación

Los medios de incubación concretos, tiempo, cofactores, precursores radiactivos, etc., varían según los experimentos, y se detallan en cada caso. En este apartado sólo se dan los medios básicos y su preparación.

Se han utilizado, básicamente, dos medios de incubación, sobre los que se realizan las modificaciones indicadas en cada experimento. Estos medios son los siguientes:

#### - Medio de incubación tris-fosfato:

Contiene tris y fosfato potásico en una concentración de 30 y 20 mM respectivamente, y un pH de 7'4. El medio "tris-fosfato enriquecido", contiene además: ATP 6'0 mM, CoA 0'5 mM, NADPH 1'0 mM y MgCl<sub>2</sub> 2'0 mM. Todos estos productos se disuelven previamente en tampon fosfato 50 mM, pH 7'4.

#### - Solución salina de Hank:

En disolución acuosa contiene las siguientes sustancias: NaCl 137 mM; KCl 5'3 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; MgSO<sub>4</sub> 0'83 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0'43 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0'43 mM; glucosa 6'0 mM. El pH de esta solución es 6'6, pero puede elevarse a pH de 7'4, con una solución isotónica de bicarbonato sódico al 1'4%, obteniéndose así la solución balanceada de Hank.

Como precursor radiactivo se utilizó acetato (1-<sup>14</sup>C), preparado según 2.2.3, adicionandolo al medio de incubación

con micropipetas. La cantidad adicionada es 1  $\mu$ Ci/ml, salvo en los casos en que se indiquen otras concentraciones.

El sistema generador de ATP, que se ha utilizado, está basado en el método de Schumm y col. (1973). Consiste en producir ATP gradualmente durante todo el tiempo de incubación. Para ello, se adicionan 35 U/ml de piruvato quinasa al medio. La concentración de ATP del medio es 2 mM, y la de fosfoenolpirúvico 2'5 mM. Este último compuesto se adiciona cada 10 minutos (1'0 mM) al medio de incubación.

El inhibidor de proteasas PMSF (fluoruro de fenilmetil-sulfonilo) se preparó en el medio de incubación elegido del modo siguiente: a una disolución 10 mM de PMSF en acetona se le adiciona 1/10 de la solución tampón, a la temperatura de ebullición, con lo que la acetona se evapora y el PMSF queda suspendido en el medio. La concentración adecuada (1 mM) se obtiene adicionando la disolución tampón elegida en frío.

La dihidrotestosterona y la testosterona solubilizadas en Tween se preparan disolviendo, 90-800  $\mu$ g de cada una de ellas en acetona y posterior adición a la disolución de 5  $\mu$ l de Tween. Esta mezcla se evapora hasta sequedad, y el residuo se redisuelve en solución salina de Hank (0'5 ml). Se obtiene así una suspensión homogénea que se adiciona a 1'5 ml de medio de incubación. Es conveniente una agitación intensa de la misma antes de su utilización.

### 2.3.3. *Incubación y control del crecimiento bacteriano*

Las incubaciones se realizan en tubos B-29, con tapón esmerilado, de 60 ml de capacidad, y que han sido deslipidizados previamente con cloroformo-metanol 2:1 (v/v). A cada tubo, mantenido en baño de hielo, se adicio

na la cantidad de medio de incubación, preparado enzimático y el precursor radiactivo indicados en cada experimento. En este momento, se procede a gasear los tubos con una mezcla del 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> (en aquellas incubaciones en que se enriquece el medio con O<sub>2</sub>). Finalizado el gaseado se tapan los tubos y se procede inmediatamente a su incubación. Todas las incubaciones se realizan a 37°C (en baño de agua Herón, con agitación mecánica constante). El volumen y el tiempo de incubación varían según se indica en cada experiencia. Al finalizar las incubaciones se detiene la reacción introduciendo los tubos en baño de hielo, y adición rá

ida de 2'1 volúmenes de metanol y 1 volumen de cloroformo. Queda así desnaturalizada la proteína y dispuesta la muestra para el aislamiento de lípidos como se indica en 2.4.1, sin repetir esta primera fase de la extracción.

En los ensayos destinados a controlar el crecimiento bacteriano, las incubaciones se detienen al sumergir los tubos en baño de hielo, sin añadir ningún otro producto. Del medio se extraen 0,5 ml, para observar el crecimiento bacteriano. Estos 0,5 ml se siembran en una placa que contiene un medio de cultivo esteril. Se incuban durante 24 horas a 37°C y se cuentan las colonias bacterianas. La extensión de las placas se realiza con un medio de cultivo compuesto por: peptona (8 g), extracto de carne (3 g), NaCl (5 g), agar (20 g) y agua destilada hasta 100 ml, después de esterilizar a 120°C durante 20 minutos.

Para disminuir el riesgo de contaminación, los medios de incubación se preparan siempre en el momento de ser utilizados.

En todos los ensayos las incubaciones se realizan por duplicado, repitiéndose cada ensayo al menos 3 veces para minimizar en lo posible el error en la elección de la edad de la rata y las diferencias entre individuos distintos.

#### 2.3.4. *Determinación de proteínas*

La valoración de proteínas se realiza en el homogenizado total. Es esencialmente importante calcular la concentración de proteínas y mantenerla constante en las incubaciones cuando los preparados enzimáticos que se utilizan son sistemas libres de células. La valoración se realizó por el método de Lowry y col. (1951) y se utilizan los siguientes reactivos:

- . Reactivo Folin-Ciocalteu diluido: 1 vol. de reactiuvo Folin-Ciocalteu + 2 vol. de agua destilada.
  
- . Reactivo A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en NaOH 0.1 M.
  
- . Reactivo B:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  al 0.5% en tartrato sódico al 1%.

#### Procedimiento:

En el momento de realizar la valoración, se prepara una mezcla de reactivos A y B en la proporción 50 vol. de A + 1 vol. de B; se pone en cada tubo de ensayo 5 ml de esta mezcla y se añade a cada uno de ellos 1 ml de la disolución problema, cuyo contenido en proteínas esté comprendido entre 150 y 900  $\mu\text{g}/\text{ml}$  o entre 10 y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Es necesario, por tanto, efectuar las disoluciones adecuadas del preparado enzimático, de modo que la concentración de proteínas se encuentre entre los límites citados. La mezcla, después de agitar, se deja a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación se añade a cada tubo 0.5 ml de reactivo Folin diluido, se agita y se deja reposar 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. En los tubos aparece una coloración azul, cuya absorvencia se mide a 500 nm para concentraciones de proteína entre 150 y 900  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , y a 750 nm para concentraciones comprendidas entre

10 y 100  $\mu\text{g/ml}$  frente a un blanco, preparado según se ha descrito anteriormente, sustituyendo la disolución problema por 1 ml de agua destilada.

La concentración de proteínas en el problema se deduce a partir de una curva patrón construída con los datos de absorvancia, obtenidos con diferentes disoluciones de albúmina de concentración conocida y dentro de los límites mencionados. Esta curva patrón se construye para cada valoración de proteínas. En la preparación de estas disoluciones patrón se ha utilizado, en todos los casos, albúmina cristalizada de suero bovino.

La valoración de proteínas se realiza después de la incubación para evitar la pérdida de actividad de la proteína.

#### 2.4. ANALISIS CUALITATIVO DE LIPIDOS

##### 2.4.1. *Aislamiento de lípidos totales*

A partir de homogenizados, o de troceado de tejido prostático, se solubiliza el material lipídico con disolventes orgánicos como cloroformo y metanol. El contenido en lípidos de estos disolventes, así como de todos los disolventes utilizados en este trabajo, han sido controlados por cromatografía en capa fina y gas líquido, procediéndose a su destilación en caso necesario.

El aislamiento de lípidos totales se lleva a cabo según el método descrito por Bligh y Dyer (1959), modificado por Municio y col. (1974a). Al homogenizado, o en su caso al troceado de próstata, en las distintas soluciones utilizadas, se le adiciona metanol (2'1 volúmenes) y cloroformo (1 volúmen). La suspensión del material sólido en una

sola fase líquida, se agita durante 2 minutos. Transcurrido este tiempo, se adiciona cloroformo (1 volumen) y agua destilada (1 volumen). Después de agitar enérgicamente en Mixer durante 1 minuto, se separaron dos fases líquidas por centrifugación a 1000xg durante 5 minutos, recogiendo se posteriormente la fase clorofórmica. La fase acuosa se volvió a extraer 2 veces con cloroformo (2 volúmenes). En cada extracción, la separación de fases se lleva a cabo por centrifugación. Al extracto total obtenido se le adiciona sulfato sódico anhidro, se agita, y se deja tapado durante unas horas en recipientes de vidrio con tapón esmerilado. Posteriormente se procede a filtrar el extracto lipídico, mediante la utilización de papel de filtro Whatman nº 1. El filtrado, en tubos de vidrio con boca esmerilada, se evaporó hasta sequedad en un evaporador rotatorio, a 15-20 mm de Hg, a temperatura inferior a 37°C obteniéndose un residuo de extracto de lípidos. Este procedimiento se esquematiza en la figura 15.

Por el extracto de lípidos se hace pasar una corriente de nitrógeno, para eliminar los posibles restos de solventes. En las determinaciones cuantitativas es necesario gasear los lípidos hasta pesada constante.

Cuando la extracción de lípidos se realiza en tejido prostático procedente de incubaciones "in vitro", con menos de 80 mg de próstata húmeda, se añade próstata no radiactiva (próstata fría) hasta completar esta cantidad, con el fin de obtener una mejor visualización de los lípidos en el revelado de las placas de cromatografía y, al mismo tiempo, reducir las pérdidas de lípidos radiactivos durante las operaciones de extracción. La adición de próstata fría se realiza entre la primera y la segunda agitación.

En las experiencias en que se mide la incorporación radiactiva con estos extractos se realizan dos medidas diferentes: incorporación radiactiva total, y porcentajes

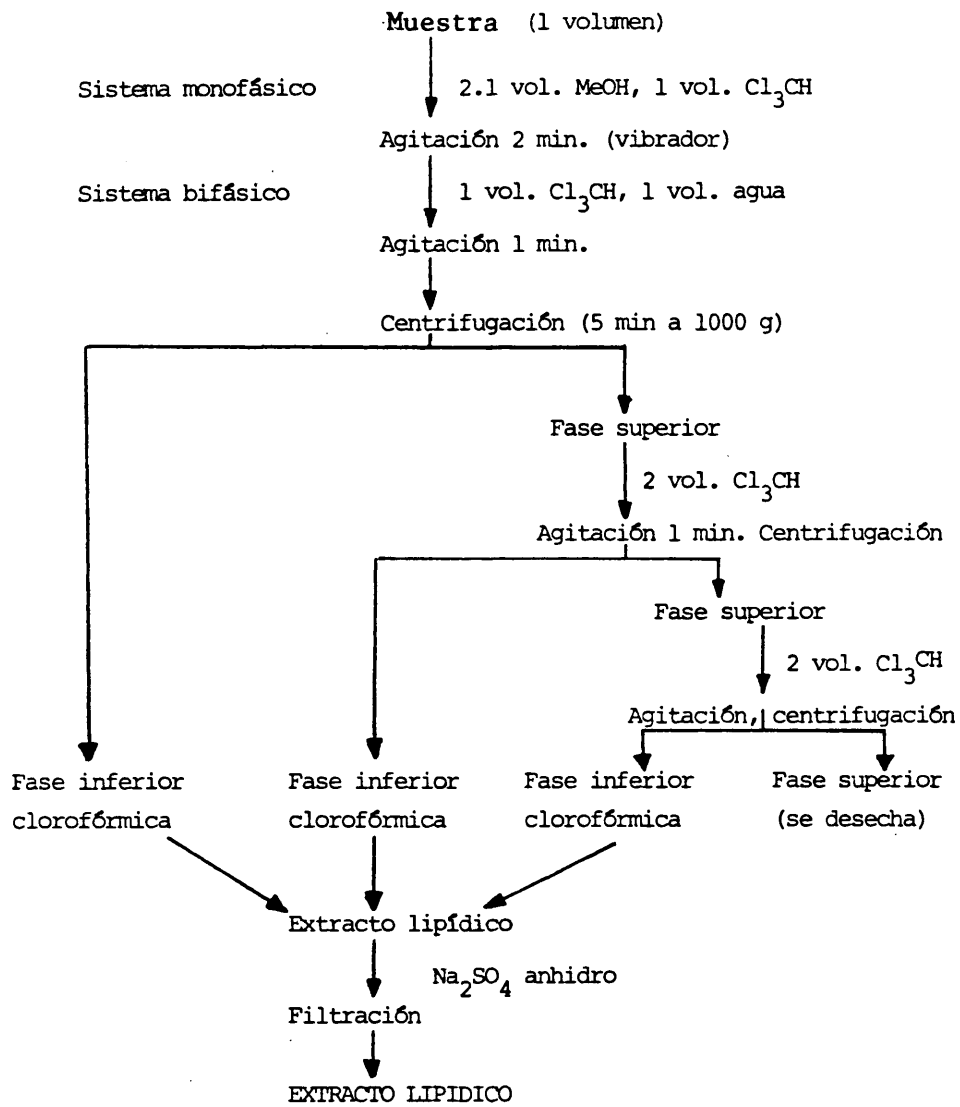


Figura 15. Esquema seguido en la extracción de lípidos.

de las diferentes clases de lípidos sintetizados. Para ello, se añade al tubo que contiene el residuo lipídico 1 ml de cloroformo, y se extraen 100  $\mu$ l que se transfieren a viales de contador de centelleo líquido, determinándose la radiactividad como se indica en 2.6. El resto se utiliza para la separación de las clases de lípidos por cromatografía en ca pa fi na (2.4.2). Todas estas operaciones se realizan sobre baño de hielo, para minimizar la evaporación del cloroformo y hacer más reproducibles las medidas. En los demás ensayos, los lípidos, previamente pesados, se almacenan en atmósfera de nitrógeno, a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de su utilización.

#### 2.4.2. Separación de lípidos: cromatografía en capa fina

Para la separación de las diferentes clases de lípidos se utiliza la cromatografía monodimensional en capa fina.

Las placas de cromatografía son de vidrio (20x20 cm), y se lavan previamente con un sistema cloroformo-metanol 2:1 (v/v), dejándolas secar al aire. La extensión del soporte adsorbente (sílicagel G) se efectuó mediante extendedor Shandon, con un espesor variable comprendido entre 300-1000  $\mu\text{m}$ , según la cantidad de lípidos a cromatografiar. La suspensión de sílicagel G se preparó, en cada caso, inmediatamente antes de la extensión de las placas, en la proporción: 6 gramos de sílicagel G, y 12 ml de agua destilada, por placa tipo de 300  $\mu\text{m}$ . En el caso de placas destinadas a la separación del colesterol, y debido a que éste no se visualiza en las mismas condiciones de revelado que el resto de los lípidos, es preciso introducir unos miligramos de rodamina-B en el agua destilada. Las placas, una vez extendidas, se de jan secar a temperatura ambiente y, posteriormente, se intro ducen en una estufa a  $110^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas.

Sobre estas placas se aplican los lípidos, en cantidad variable según el espesor de la placa, a 2 cm de la base. La aplicación se hace en bandas de 2 a 3 cm por mg de lípido.

Los sistemas empleados para el desarrollo de las cromatografías están formados por hexano/éter/ácido acético (70:30:1 en volumen), para los glicerolípidos, y por benceno/éter etílico (8:2 en volumen), para el colesterol. El tiempo de desarrollo cromatográfico en el caso de los glicerolípidos, es el suficiente para que el frente líquido llegue al borde superior de la placa, más 10-15 minutos (dependiendo del espesor de la placa) necesarios para que los monoacilglicéridos se separen de los fosfolípidos. En el caso del colesterol no es necesario esperar estos 10-15 minutos.

Las placas una vez desarrolladas, se dejan secar a temperatura ambiente, con el fin de evaporar los restos de disolventes.

Las bandas separadas de lípidos se visualizan introduciendo las placas cromatográficas en una cubeta saturada de vapores de yodo, se deja durante unos minutos y así el yodo se retiene selectivamente sobre las regiones donde han quedado situadas las diferentes clases de lípidos, originándose manchas amarillas perfectamente visibles sobre el fondo blanco de la placa. La identificación de las bandas se realiza por comparación de su recorrido con el de patrones, por espectroscopía infrarroja, y por análisis funcional, y sólo en los primeros ensayos es necesario realizar todas estas identificaciones.

Después de enmarcar con un punzón cada banda, se sublima el yodo dejando la placa al aire, o bien calentando ligeramente en la estufa. Eliminado completamente el yodo, se raspan cuidadosamente las bandas y se procede a la medi

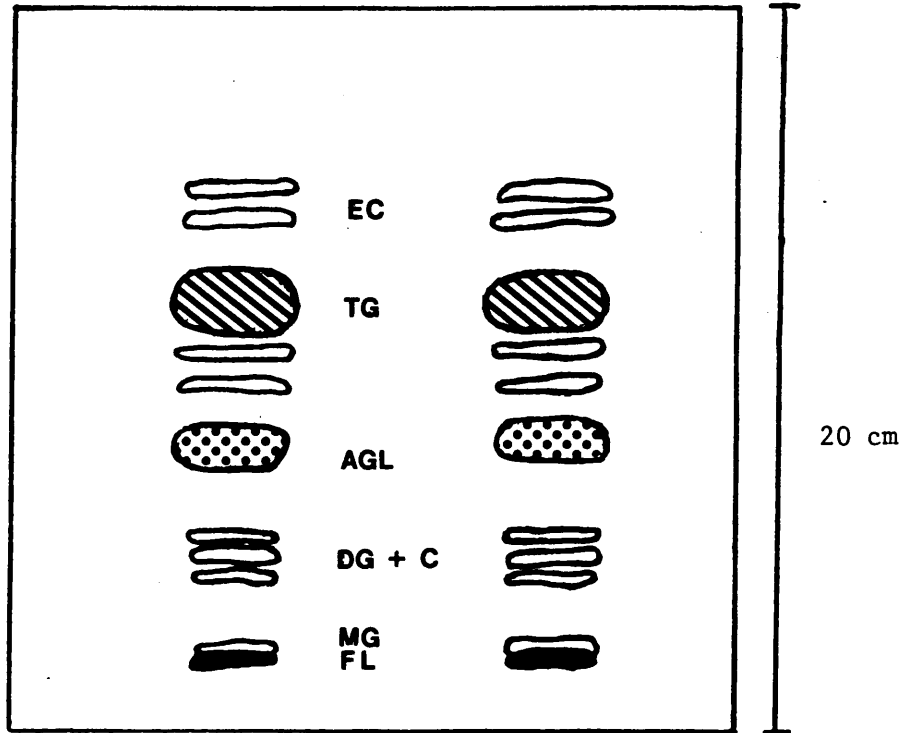


Figura 16. Esquema de una separación de lípidos de próstata por cromatografía en capa fina. Eluyente: Hexano/eter/acético (70:30:1).

EC = Esteres de colesterol; TG = Triacilgliceroles  
AGL = Acidos grasos libres; DG = Diacilgliceroles  
C = Colesterol; MG = Monoacilgliceroles  
FL = Fosfolípidos

da de su radiactividad, o al análisis cuantitativo, según se indica en los apartados respectivos. En la figura 16 se puede ver el esquema de una separación cromatográfica tipo.

Con respecto a las placas en las que se determina el colesterol, la banda del colesterol se visualiza exponiendo la placa a la luz ultravioleta, y se identifica por comparación de su recorrido con el de un patrón, así como por espectroscopía infrarroja, de masas, y por cromatografía de gases (Alcaide y col., 1980). La banda se enmarca con un punzón, y se raspa, depositándola en un Erlenmeyer para proceder a la extracción del colesterol. Dicha extracción se realiza lavando la silicagel con diclorometano y filtrando el disolvente (con whatman nº 1) a tubos B-29 de boca esmerilada que se llevan a un rotavapor para concentrar el colesterol. La operación se repite hasta extraer el lípido en su totalidad, lo cual requiere de 5 a 6 lavados. El extracto seco de colesterol se redissuelve en éter y se transfiere a viales de contador de centelleo. Esta fase etérea se calienta suavemente en estufa para eliminar el disolvente y se procede a su conteo radiactivo, como se indica en 2.5 (Recio y col., 1982).

#### 2.4.3. *Análisis de ácidos grasos procedentes del extracto lipídico total, triacilglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos libres.*

Los ácidos grasos que entran a formar parte de los lípidos totales, así como de las distintas clases de lípidos, son analizados por cromatografía en fase gaseosa. La fase estacionaria utilizada, succinato de dietilenglicol, separa los distintos ácidos grasos en función de su longitud y de la polaridad que confieren los dobles enlaces, por lo que los ácidos grasos deben estar en forma de éster-

res metílicos (2.4.3.1). Una vez separados por cromatografía gas-líquido (2.4.3.2) se identifican los distintos ácidos grasos con ésteres metílicos patrones y se procede a la medida de las áreas de los picos para la determinación de los porcentajes.

#### 2.4.3.1. *Obtención y extracción de ésteres metílicos*

Mediante la metanolisis se obtienen los ésteres metílicos de los ácidos grasos que entran a formar parte de las distintas clases de lípidos previamente separadas, así como de los lípidos totales.

#### Reactivos

$\text{BF}_3$  en metanol al 15%, metanol, benceno, hexano.

#### Procedimiento

La metanolisis se realiza de acuerdo con el método de Metcalfe y Schmitz (1961), modificado por Municio y col., (1974b). Se utilizan tubos de vidrio de paredes gruesas, adecuados para la metanolisis. En estos tubos (conteniendo los lípidos totales o bien bandas de sílica gel G con las distintas clases de lípidos) se adiciona, por mg de lípido y en este orden, 0'09 ml de benceno, 0'1 ml de metanol y 0'1 de trifluoruro de boro al 15% en metanol. Se cierran los tubos con soplete y se mantienen a 110°C en estufa durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo, los tubos se dejan enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se abren.

La extracción de los ésteres metílicos de la mezcla de reacción se realiza según el esquema de la figura 17

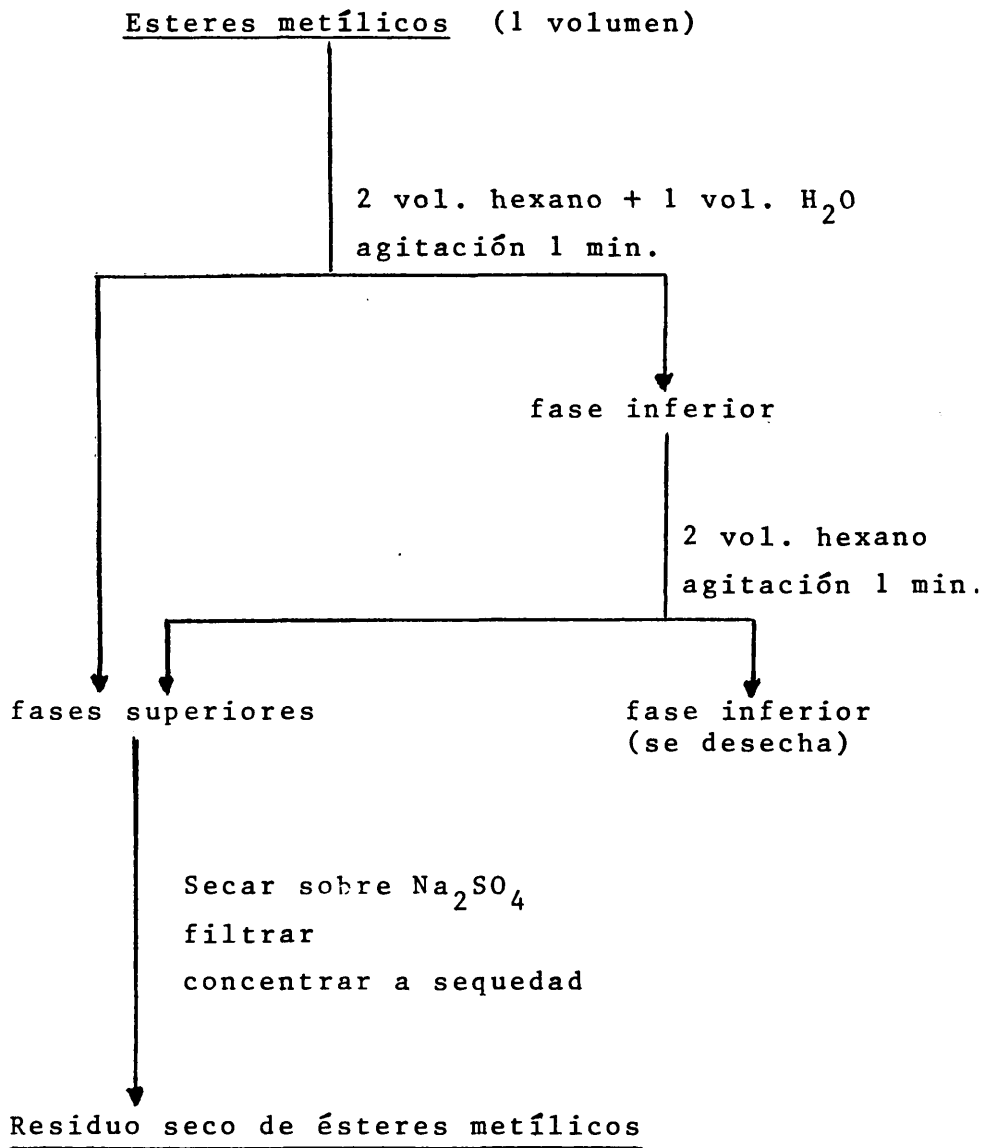


Figura 17. Esquema seguido en la extracción de ésteres metálicos.

como se detalla a continuación. Sobre la mezcla (1 volumen) se adicionan 2 volúmenes de hexano y 1 volumen de agua destilada, se agita durante 1 minuto con un vibrador, y se deja reposar hasta la formación de dos fases. La fase superior de hexano se extrae y la fase inferior se vuelve a extraer con 2 volúmenes de hexano. A todo el hexano reunido se le somete a un proceso de secado y concentrado similar al descrito en el apartado 2.4.1. Los ésteres metílicos así obtenidos se guardan en atmósfera de nitrógeno a  $-20^{\circ}\text{C}$  para ser directamente inyectados en el cromatógrafo de gases, disueltos en un pequeño volumen de hexano.

#### 2.4.3.2. *Cromatografía en fase gaseosa: análisis de ésteres metílicos*

El análisis de los ésteres metílicos disueltos en un pequeño volumen de hexano, se realiza en un cromatógrafo de gases Pye Unicam Philips con registro gráfico Philips PM 8251, equipado con un detector de ionización de llama de hidrógeno, y con columnas de vidrio de 2 metros de longitud y 2'0 mm de diámetro interno, rellenas de succinato de dietilenglicol al 20% sobre cromosorb W-HP (80-100 mallas). En el cromatógrafo se opera con un gradiente discontinuo de temperatura de  $150$  a  $178^{\circ}\text{C}$  (8 minutos a  $150^{\circ}\text{C}$ , tras los cuales aumenta la temperatura en  $4^{\circ}\text{C}$  por minuto; finalmente la temperatura se estabiliza en el horno a  $178^{\circ}\text{C}$ ), siendo la temperatura del inyector y detector de  $200$  a  $220^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. El flujo de gas portador es de  $30$  ml/min.

Los cromatogramas se realizaron a las atenuaciones que se indican en cada caso. Las áreas de los picos vienen dadas por el producto de su altura por su base media. La identidad de los picos y la validez cuantitativa de las concentracio-

nes calculadas para los distintos ácidos grasos se establecen por comparación con patrones de ésteres metílicos de los diferentes ácidos grasos.

## 2.5. ANALISIS CUANTITATIVO DE LIPIDOS

Con el fin de conocer la variación en el contenido de fosfolípidos, triacilglicéridos, y ácidos grasos libres de próstata ventral en dos etapas del desarrollo de la rata, inmadura y adulta, se valoran estos lípidos cuantitativamente por dos métodos. En uno se utiliza la cromatografía gas líquido mediante el empleo de un patrón interno, y en el otro se utilizan métodos colorimétricos para la determinación cuantitativa de triacilglicéridos y fosfolípidos.

Para estas determinaciones cuantitativas se realizaron cromatografías preparativas y en capa fina y de modo análogo al descrito en el apartado 2.4.2. Las distintas bandas de lípidos ya separados se raspan de las placas, y se depositan en tubos de metanolisis para las determinaciones cuantitativas por cromatografía de gas líquido. En las determinaciones colorimétricas, las bandas raspadas de triacilglicéridos se depositan en tubos de boca esmerilada B-29, para proceder a su extracción, y las bandas correspondientes a los fosfolípidos se pasaron a matraces Kjeldhal.

### 2.5.1. *Método por cromatografía en fase gaseosa con patrón interno*

Este método es aplicable a la determinación cuantitativa de las distintas clases de lípidos; ácidos grasos libres, triacilglicéridos y fosfolípidos, así como para conocer el contenido en ácidos grasos de extracto lipídico to-

tal. Se basa en la formación de ésteres metílicos de los ácidos grasos, y cuantificación de éstos mediante la adición de un ácido graso, como patrón interno, a la muestra.

La metodología utilizada es una modificación del método de Christie y col. (1970). Se utiliza como patrón interno el ácido undecanoico (11:0) ya que no se encuentra presente entre los ácidos grasos existentes en los lípidos de próstata ventral de rata. El patrón se adiciona como ácido graso libre, antes de proceder a metanolisis, en las cantidades siguientes (referidas al total de los lípidos de partida):

- 4-5% para la determinación con lípidos totales
- 0'2-0'3% para los fosfolípidos y triacilglicéridos
- 0'02 y 0'1% para los ácidos grasos libres

Dichas cantidades fueron establecidas en ensayos previos, de tal forma que el área correspondiente al pico patrón sea lo suficientemente grande como para minimizar el error de cálculo.

Para obtener la cantidad (en peso) de los lípidos en la muestra se multiplica la cantidad (en peso) de sus ácidos grasos por un factor, que se calcula dividiendo el peso molecular de la molécula que se considera como si fuese una especie molecular del ácido graso patrón, por el peso molecular del éster metílico del ácido graso patrón multiplicado por el n° de ácidos grasos contenidos en la molécula. Así, para cada una de las clases de lípidos el correspondiente factor (F) es:

#### Triacilglicéridos

$$F = \frac{PM (\text{glicerol} + 3(11:0) - 3H_2O)}{3 \times PM \text{ ester metílico } (11:0)} = 0.993291$$

### Fosfolípidos

$$F = \frac{\text{PM}(\text{glicerofosforilcolina} + 2(11:0) - 2 \text{H}_2\text{O})}{2 \times \text{PM ester metílico (11:0)}} = 1.4845883$$

### Acidos grasos libres

$$F = \frac{\text{PM 11:0}}{1 \times \text{PM ester metílico (11:0)}} = 0.926975$$

La validez de éste método ha sido establecida por comparación con determinaciones colorimétricas de triacilglicéridos (Skidmore y Entenman 1962) y de fosfolípidos según la técnica de Rouser y col. (1966). Estos métodos se exponen más adelante.

#### 2.5.2. Método colorimétrico para fosfolípidos y triacilglicéridos

Los resultados obtenidos en las determinaciones cuantitativas de fosfolípidos y triacilglicéridos según el método de Christie y col. (1970), se confirman con los procedimientos colorimétricos que se describen a continuación.

FOSFOLIPIDOS: El fundamento de este método consiste en la liberación de fósforo inorgánico mediante tratamiento con ácido perclórico, seguida de la formación de fosfomolibdato que, al reducirse, forma un complejo de color azul.

Reactivos: Acido perclórico al 70% (p/v); molibdato amónico al 2'5% (p/v); ácido ascórbico al 10% (p/v), y  $\text{KH}_2(\text{PO}_4)$ .

Procedimiento: Una vez eliminado el yodo de las placas cromatográficas, se transfieren los fosfolípidos, junto con el soporte cromatográfico, a matraces Kjeldhal, que se calientan suavemente para eliminar cualquier resto de disolventes.

El conjunto de los matraces se somete a las operaciones que se describen a continuación, basadas en el método de Rouser y col. (1966), modificado por Mejías y col. (1977).

Una vez enfriados, se adiciona a cada matraz 0'9 ml de ácido perclórico al 70%, y se colocan en un baño de arena a 250-260 °C (25 minutos) con el fin de mineralizar el fósforo orgánico. Transcurrido este tiempo se retiran los matraces y se dejan enfriar a temperatura ambiente. A cada matraz se adicionan 7 ml de agua destilada, 1 ml de molibdato amónico y 1 ml de ácido ascórbico. Los matraces se calientan posteriormente en baño de agua hirviendo (7 minutos) al cabo de los cuales se detiene la reacción por inmersión en baño de hielo. Seguidamente se centrifugan las muestras para eliminar el ácido silícico, a 900xg durante 5 minutos y, por último, se miden las absorbancias a una longitud de onda de 820 nm, en espectrofotómetro Bausch-Lomb, (Spectronic 20), equipado con filtro rojo frente a un blanco realizado con silicagel de una zona de la placa de cromatografía exenta de lípidos, sometido a las mismas condiciones que las muestras problema.

Los microgramos de fósforo se obtuvieron, interpolando las densidades ópticas en una curva patrón construida con cantidades conocidas de  $\text{KH}_2(\text{PO}_4)$ . En este caso, se eliminan el paso previo de mineralización del fósforo. La concentración de fosfolípidos presentes en la muestra se ha deducido asumiendo como peso molecular medio el del dipalmitoil fosfatidil colina (1,2, dipalmitoil-sn-glicero-3-fosforilcolina).

#### TRIACILGLICERIDOS:

Una vez efectuada la cromatografía en capa fina, el ácido silícico correspondiente a la banda de triacilglicéridos se transfiere a un tubo B-29 de boca esmerilada, con el fin de extraer esta clase de lípidos. El proceso de extrac-

ción transcurre de acuerdo con los siguientes pasos:

1) A los triacilglicéridos adsorbidos sobre el ácido silícico se les añade 10 ml de cloroformo, y se agitan durante 2 minutos en un Mixer, centrifugando a continuación a 1800xg, y extrayendo la fase clorofórmica. El proceso se repite tres veces para asegurar la extracción total de los lípidos.

2) Se reúnen las tres fases clorofórmicas y se evaporan a sequedad en un evaporador rotatorio, gaseando los triacilglicéridos extraídos con nitrógeno.

El residuo seco de triacilglicéridos se valora de acuerdo con el método de Skidmore y Entenman (1962), modificado por Mejías y col. (1977), basado en la transformación de los ésteres en ácidos hidroxámicos, que a su vez forman con el ión férrico ( $Fe^{3+}$ ) un complejo coloreado. Para ello se diluye el residuo en éter, se le añade el reactivo de hidroxilamina (disolución de NaOH en etanol reactivo más hidrocloreuro de hidroxilamina en etanol, centrifugado todo 5 min a 500xg), y se hace la reacción a 60°C en atmósfera de nitrógeno. Luego se añade el reactivo de  $Fe^{3+}$  (perclorato férrico), y a los 30 minutos se mide la coloración obtenida. La cantidad de este complejo se determina colorimétricamente mediante la lectura de las densidades ópticas a 530 nm, en un colorímetro. Las cantidades de triacilglicéridos se obtienen contrastando las densidades ópticas frente a una curva patrón construída con una solución clorofórmica de triacilglicérido de concentración perfectamente conocida (en nuestro caso tripalmitato 4 mM).

## 2.6. MEDIDAS DE RADIATIVIDAD: CONTADOR DE CENTELLEO LIQUIDO

La radiactividad que se incorpora a los lípidos totales, así como a las distintas clases de los mismos, se determina por centelleo líquido. El líquido de centelleo utilizado está formado por una mezcla de 10 gramos de PPO (2,5 difeniloxanol), 0'450 g de POPOP (1,4-bis-2-(5-feniloxazolil)-benzeno) y 150 g de naftaleno disueltos en 1500 ml de dioxano, y 300 ml de agua destilada.

Con este líquido de centelleo se pierde algo de eficacia en el contaje, ya que el agua interfiere en la transformación de la energía de las partículas radiactivas en energía lumínica. Sin embargo, posee un alto poder de disolución, lo que hace que sea muy eficaz cuando se trata de medir la radiactividad de lípidos que han de extraerse del ácido silícico empleado en su separación cromatográfica, sobre todo para fosfolípidos.

En cada vial del contador se pone el líquido del centelleo, sobre el que se deposita la correspondiente banda lipídica separada de la placa cromatográfica. Los viales se agitan suavemente para conseguir que los lípidos pasen completamente a la disolución. La silicagel G no interfiere en la determinación de la radiactividad, según se observa en ensayos con blancos.

Este mismo líquido se emplea en la determinación de lípidos totales, aunque estos no hayan de extraerse de la silicagel G, si bien en este caso se deposita primero en el vial la alícuota lipídica en fase clorofórmica, evaporando el disolvente en estufa y añadiendo posteriormente el líquido de centelleo.

En todos los casos, el volumen de líquido de centelleo añadido es de 4 ml.

Las medidas de radiactividad se efectúan en un contador de centelleo líquido LKB 1216 Rackbeta, Wallac L.S.C., que lleva acoplado un impresor 43 KSR. Las condiciones del aparato se fijan para obtener una relación  $E^2/B$  (E=eficacia, B = fondo) máxima. El tiempo de contaje es siempre suficiente para minimizar en lo posible el error estadístico de medida.

## 2.7. Tratamiento estadístico

Los errores manuales y de los aparatos se han calculado como errores tipo (standard) de, al menos, tres determinaciones.

Las diferencias lógicas observadas al experimentar con generaciones y camadas diferentes de animales, aunque se mantenga constantes las condiciones ambientales, se controlan mediante el cálculo de error estándar de la media (ESM).

Los datos analíticos recogidos en las gráficas representan una media de 3 o 4 determinaciones, considerando significativas las diferencias cuando al calcular la t de Student de las medias entre medidas, se obtiene  $P < 0,05$ .

Las curvas logísticas son curvas de la familia de las sigmoideas, y su ecuación es  $y = K/(1+ce^{-ax})$ , donde K, c y a son magnitudes reales. Para la valoración de estos parámetros a fin de obtener el ajuste de la figura 18 (en 3.1) se ha procedido como se describe a continuación. A la constante K (valor máximo estimado, en mg de próstata ventral) se le ha asignado  $K = 750$ . Tanto por motivaciones biológicas como por indicaciones indirecta obtenidas a partir del tratamiento numérico de los datos.

Por otra parte la transformación  $Y = \log \left( \frac{k-y}{y} \right)$  convierte a la ecuación logística en una recta  $Y = Ax + B$ , siendo  $A = -a$  y  $B = \lg c$ . Por lo tanto, conocido el valor de  $K$ , se puede ajustar a la nube de puntos  $(X_i, Y_i)$  su recta de regresión lineal, lo que permite estimar los valores de  $A$  y  $B$ , luego también los de  $a$ ,  $c$ . Así para la recta  $Y = Ax + B$  se pueden calcular los coeficientes de correlación lineal, de regresión y la covarianza.

La incorporación de acetato ( $1-^{14}C$ ) a lípidos totales en experimentos in vivo, con ratas en diferentes estadios del desarrollo, sugiere la existencia de dos tipos de comportamiento opuestos, en función del peso de la rata. Siguiendo esta indicación, se han distinguido dos intervalos de peso, y en cada uno de ellos se procedió a un ajuste polinómico,  $y = ax^2 + bx + c$ , por mínimos cuadrados de los datos respectivos. Los intervalos de peso distinguidos fueron  $80 \leq x \leq 170$  y  $170 \leq x \leq 450$ . Los coeficientes  $a$ ,  $b$ ,  $c$  obtenidos en cada caso se dan en la (fig. 30).

El tratamiento numérico requerido para todos los cálculos anteriores se realizó en una microcomputadora Hispano-Olivetti L1 M-20 equipada con impresora Olivetti PR 1450.

## 2.8. REACTIVOS

Los ácidos grasos patrones y el chromosorb W-HP 80/100 mallas se obtuvieron de Alltech Associates (Illinois, USA); el ATP, NADPH, CoA, fosfoenolpiróico, PPO, POPOP, albúmina y aceite de sésamo de Sigma (Saint Louis Mo USA); la piruvatoquinasa de Boheringer (Mannhein, Alemania); el succinato de dietilenglicol, Tween 20, 80, testosterona, Dihidrotestosterona y reactivo de trifloruro de Boro en metanol de Merck (Darmstad, Alemania Federal);

Naftaleno, Tolueno, Dioxano y Cloroformo de Farmitalia Carlo Erba (Milán, Italia); el acetato ( $1^{14}\text{-C}$ ) de Radiochemical centre (Amersham, Inglaterra) y los gases:  $\text{H}_2$ , aire,  $\text{N}_2$  y  $\text{O}_2$  fueron de la sociedad española de Oxígeno S.A. Los res ta ntes reactivos fueron del máximo grado de pureza.

### III. RESULTADOS Y DISCUSION

### 3.1. RELACION PESO PROSTATICO - PESO RATA

En la fig. 18 se muestra una curva de ajuste que relaciona el peso de la próstata con el peso de la rata. Dicha curva se ha ajustado con 90 puntos, muchos de los cuales son, a su vez, media de 10 determinaciones. La curva de ajuste es una curva logística, de la familia de las sigmoideas, cuya expresión general es  $y = k/(1+ce^{-ax})$ ; en nuestro caso, y a partir de los datos experimentales, se han determinado que los valores de  $k = 750$ ,  $a = 0'012$ ,  $c = 30'635$  son óptimos, en el sentido de que, para  $k = 750$ , si se llama  $A = -a$ ,  $B = \log c$  e  $Y = \lg \left(\frac{k-y}{y}\right)$ , el ajuste, por mínimos cuadrados, de los coeficientes  $A, B$  de la recta de regresión  $Y = Ax + B$  (ver pie de la figura 18), proporciona unos valores que coinciden con  $-a$  y  $\lg c$ , respectivamente. El coeficiente de correlación lineal de las variables  $x$  e  $Y$  resulta ser igual a  $-0'939662$  que, al estar muy próximo a  $-1$ , indica una muy fuerte correlación lineal entre aquellas variables  $y$ , a posteriori, la misma estrecha correlación entre las variables  $x$  e  $y$  originales, aunque ahora con un matiz de no linealidad especificado por la transformación  $Y = \lg \left(\frac{k-y}{y}\right)$ .

Pasemos ahora a la discusión de la curva propiamente dicha. En primer lugar, hay varias razones que justifican la elección de una sigmoidea como curva apropiada para un ajuste de la nube peso próstata/peso de rata; una de ellas es, como ya hemos apuntado, que la curva peso rata/edad de rata sugiere (ver en 2.1, fig. 12) un comportamiento de este tipo, por su propia forma. Por otra parte, también se han realizado ajustes a la nube de puntos por curvas de otro tipo (potenciales, polinómicas de varios grados), obteniéndose coeficientes de correlación más bajos. Finalmente, una curva logística puede tener un valor de aproximación global al fenómeno del crecimiento de la próstata en función del peso de la rata, contrariamente a lo que sucedería con

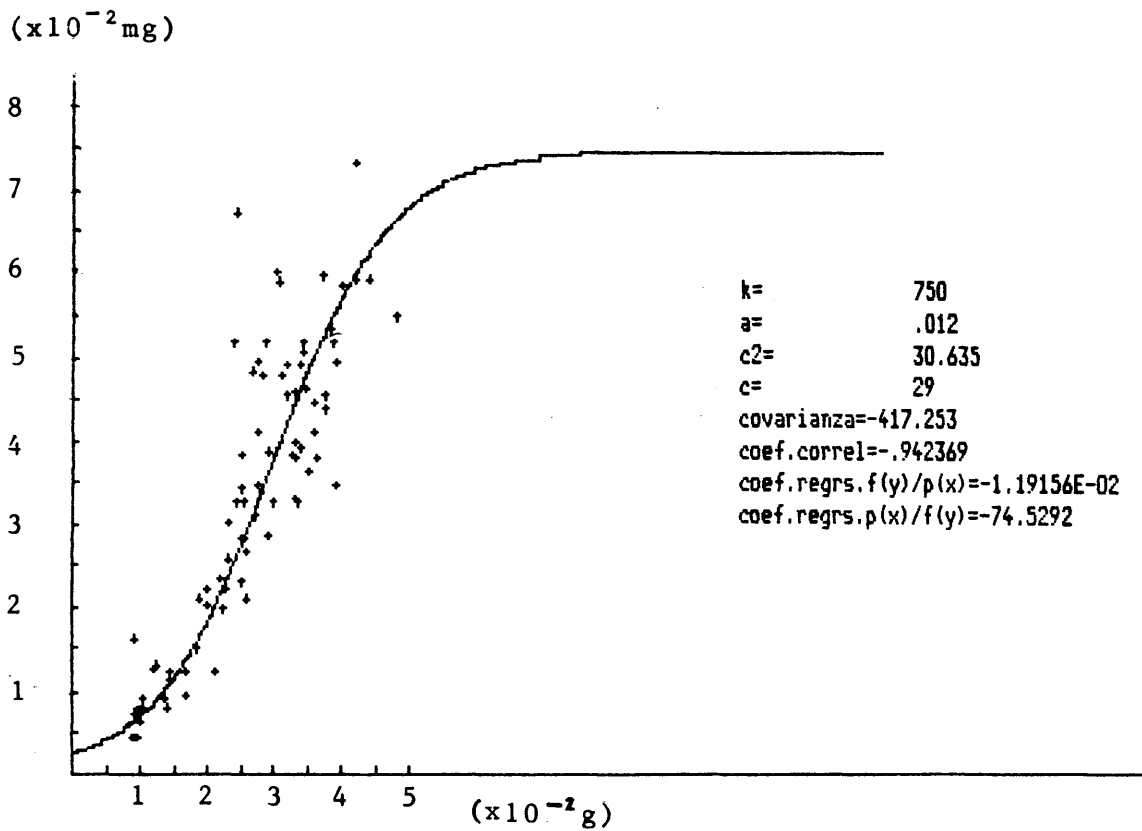


Figura 18.- Curva logística que relaciona el crecimiento corporal de la rata (g) con el de la próstata ventral (mg). La ecuación de la curva logística es  $y = K / (1 + ce^{-ax})$ , siendo  $x$  = peso de la rata e  $y$  = peso de la próstata. Se indican los coeficientes  $K$ ,  $a$ ,  $c$ , y coeficiente de correlación. Para calcular este último, se transforma la curva logística en una recta  $Y = Ax + B$ , llamando  $A = -a$ ,  $B = \log c$  e  $Y = \lg(\frac{K-y}{y})$ .

las otras curvas antes mencionadas, que no pueden simular dicho crecimiento para valores altos del peso de rata.

En cuanto al crecimiento de la próstata se advierte que:

- en ratas inmaduras, el crecimiento de la próstata es esencialmente lineal, aunque ya se advierte, al final de dicha etapa del desarrollo, una tendencia a una mayor velocidad de crecimiento.
- centrado en las etapas intermedias del desarrollo (pubertad, adultas jóvenes) se alcanza la más alta tasa de crecimiento de la próstata, tasa que, posteriormente y aproximadamente para ratas de peso mayor o igual a 400 g, va decreciendo rápidamente hasta la estabilización del peso de la próstata en  $\approx 700$  mg.

Estos datos experimentales (peso próstata-peso rata) presentan una correlación muy acusada con la evolución de la cantidad de hormonas androgénicas a lo largo del desarrollo de la rata. Efectivamente, la organogénesis del tejido prostático en el período embrionario se inicia por acción de los andrógenos (Lasnitzki y Mizuno, 1977). Durante la pubertad, que es donde encontramos un crecimiento mayor de la próstata (fig. 18) Corpéchet y col 1981, encuentran un incremento acusado de andrógenos tanto en plasma como en próstata. Este incremento de andrógenos con la pubertad origina también en la glándula prostática una organización tisular y un incremento en la función secretora (Moger, 1977). En la vida adulta las cantidades de testosterona y DHT presentes en plasma y próstata de rata descienden respecto a la pubertad (en 1.6 figs. 10, 11) pero son suficientes para mantener constantes el peso de la próstata (fig. 18) y su función secretora. En este sentido Higgins y col., 1981 han comunicado que para la adquisición de la actividad funcional

de los tejidos sexuales accesorios en rata adulta son fundamentales tres estadios del desarrollo (neonatal, prepubertal y pubertad).

En la figura 19 se da la nube de puntos obtenida, para una población de ratas castradas 7 días antes, tomando puntos (peso de rata y peso de próstata). Como en el caso anterior, se buscaron diversos tipos de curvas de ajuste (polinomios, logísticas, potenciales) para dicha nube, pero las curvas que se obtuvieron poseían, en todos los casos, coeficientes de correlación más bajos, hasta de un 50% inferiores a las obtenidas para poblaciones de ratas no castradas; este es el motivo de que no se reproduzca curva alguna en dicha figura, sino sólo la nube, como evidencia de la "mala correlación" de los puntos.

Esta falta de correlación puede explicarse por la drástica disminución de testosterona en plasma provocada por la castración. Al ser la testorena responsable del crecimiento prostático con el desarrollo es lógico que al faltar se origine una degradación tisular lo que está de acuerdo con la bibliografía (Heyns y col., 1977; Hosoya y col., 1978; Singhal y Schaffner, 1980). No obstante, de la figura 19 se desprende comparandola con la fig. 18, que un período de castración de 7 días origina un descenso en el tamaño de la próstata de rata adulta hasta pesos semejantes a los que presentan las ratas en la etapa inmadura. Estos descensos son comparables a los obtenidos por diversos autores (Schaffner, 1981; Huttunen y col., 1981).

Todo esto conduce, a su vez, al estudio de la pérdida de peso en próstata, con respecto al peso de la rata. Y, en este sentido, se llega a demostrar que la pérdida de peso de la próstata, y el peso de la rata están fuertemente correlacionados linealmente con un coeficiente positivo de correlación lineal que vale aproximadamente 0,99, y con covarianza también positiva.

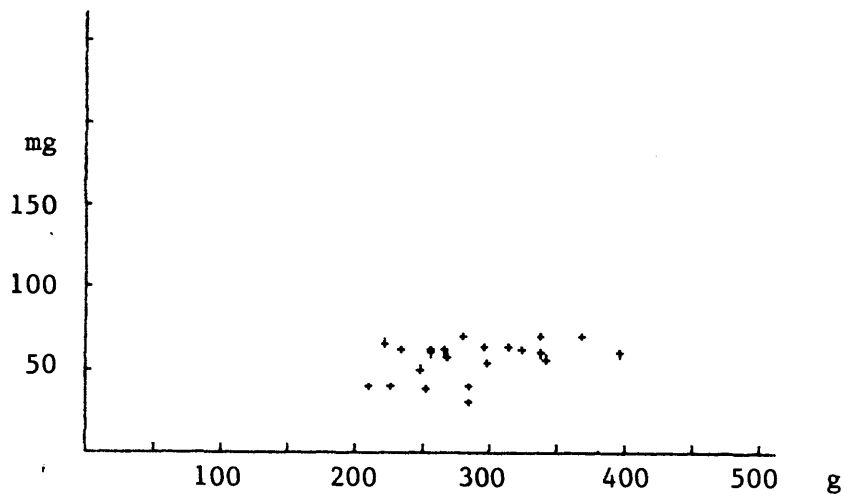


Figura 19. Nube de puntos obtenida al representar el peso de las ratas (g) frente al peso de sus próstatas (mg), 7 días después de la castración.

### 3.2. CONTENIDO EN LIPIDOS DE LA PROSTATA VENTRAL DE RATA

#### 3.2.1. *Contenido en lípidos totales de próstata ventral de rata.*

Un primer paso, previo al estudio del metabolismo lipídico en próstata ventral de rata, ha consistido en averiguar el contenido de lípidos en próstata, así como la composición relativa de los distintos ácidos grasos presentes en los lípidos totales.

En la tabla II se muestran los resultados obtenidos en una experiencia tipo, con un conjunto de 66 próstatas ventrales de rata adulta. Este lóbulo de la próstata tiene, relativamente, un bajo contenido en lípidos (11% del peso seco y 2,2% del peso húmedo), si se le compara con el hígado de la rata, cuyo contenido en lípidos es el doble 4,4% en ratas adultas (Sinclair, 1974) También, la próstata dorsolateral del Hamster tiene un contenido superior en lípidos totales, 3,4% del peso húmedo (Rajalakshmi y col., 1973).

Tabla II

Relación en peso entre la próstata de rata adulta y los lípidos totales extraídos de la misma.

Número de próstatas	Peso Liofilizado	Peso húmedo	Extracto lipídico	% lípidos totales (respecto peso húmedo)
66	6,2 g	31,4 g	682 mg	2,2

### 3.2.2. Contenido de ácidos grasos en los lípidos totales

Los ésteres de los ácidos grasos procedentes del extracto lipídico anterior se han separado por cromatografía gas-líquido (2.4.3), obteniéndose el cromatograma tipo que se muestra en la figura 20. En él aparecen indicados los distintos picos, identificados con ésteres metílicos de ácidos grasos patrones, así como las atenuaciones a las que se ha realizado el cromatograma.

Para llevar a cabo el análisis cuantitativo se han utilizado, como patrones internos (Christie y col., 1970), los ésteres metílicos de tres ácidos grasos (n-undecanoico, n-pentadecanoico y n-heptadecanoico), que no entran a formar parte de los lípidos totales de la próstata ventral de rata. Se ha elegido el n-undecanoico, dado que de entre los tres, es el que aparece con mayor resolución. El n-pentadecanoico y el n-heptadecanoico aparecen solapados con ácidos grasos endógenos (Fig. 21). Así, en todas las determinaciones cuantitativas realizadas en el presente trabajo mediante cromatografía gas-líquido, se ha empleado el ácido n-undecanoico como patrón interno. El cromatograma tipo que se muestra en la fig. 21 corresponde a los ésteres metílicos de los ácidos grasos del extracto lipídico total adicionado de ácido n-undecanoico.

Los porcentajes de los distintos ácidos grasos presentes en el extracto lipídico han sido calculados a partir de cromatogramas semejantes al que aparece en la fig. 21 y se dan en la tabla III. Se observa que el ácido saturado que se encuentra en mayor cantidad es el ácido palmítico (16:0), mientras que entre los insaturados, el ácido oleico (18:1) es el mayoritario, junto con el linoleico (18:2). Es de resaltar el alto contenido del ácido graso 20:4, con un contenido cercano al del ácido linoleico.

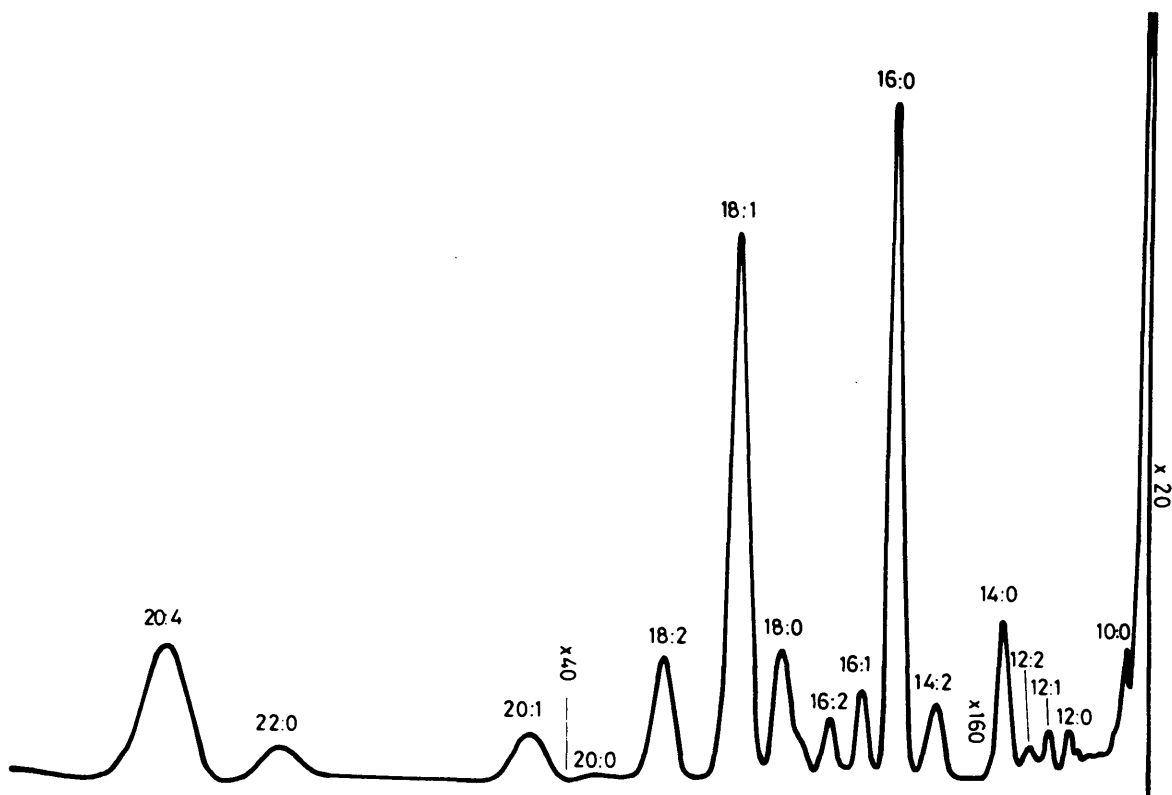


Figura 20.- Cromatograma tipo de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que forman parte de los lípidos totales de próstata de rata adulta. Separación realizada por cromatografía gas líquido, con una columna de vidrio de 2 m de longitud y 2 mm de diámetro rellena de succinato de dietilenglicol al 20%, sobre cromosorb W-HP, operando en un gradiente discontinuo de temperatura de 150 a 178°C. Se indican las atenuaciones y todos los picos identificados.

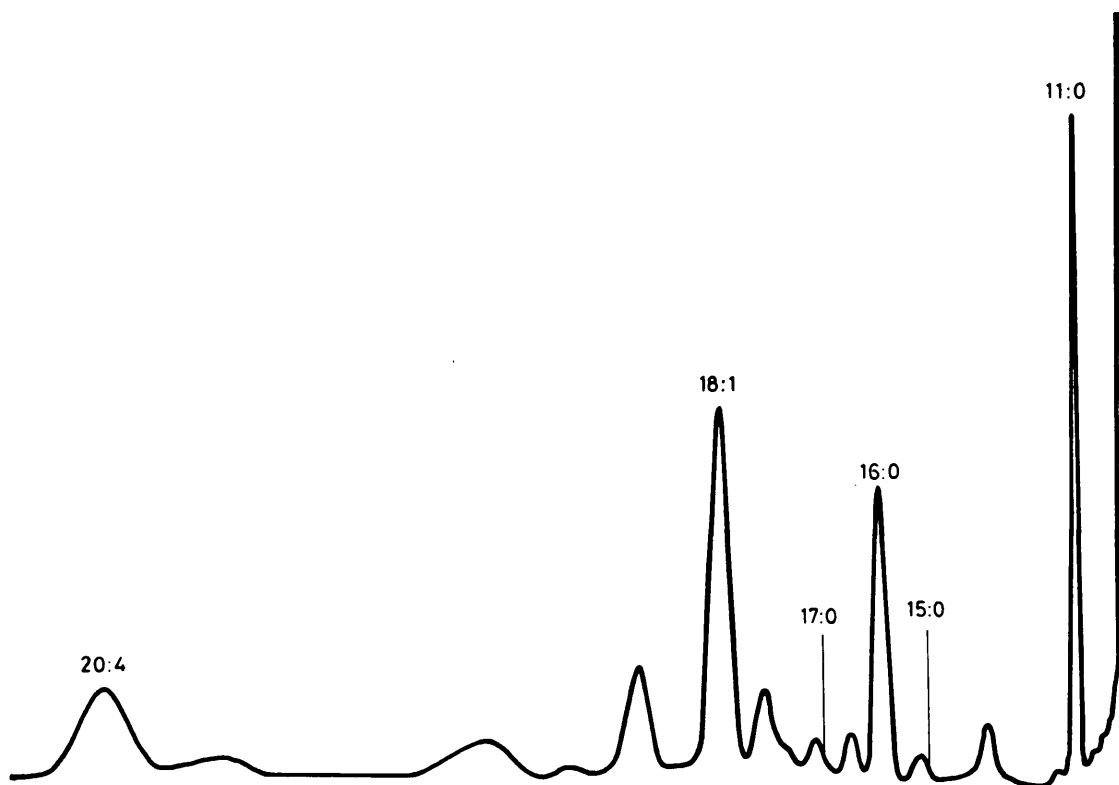


Figura 21.- Cromatograma tipo de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que forman parte de los lípidos totales de la próstata de rata adulta a los que se ha adicionado el ácido undecanoico (11:0) como patrón interno. Se indican los lugares en los que aparecerían los ácidos 15:0 y 17:0 si se adicionaran a los lípidos totales. Condiciones como en fig. 20.

Tabla III

Porcentajes de ácidos grasos presentes en los lípidos totales de próstata ventral de rata adulta. Porcentajes menores a 0,3 se consideran como trazas (Tr).

Acidos grasos saturados (%)		Acidos grasos monoinsaturados (%)		Acidos grasos poliinsaturados (%)	
10:0	Tr	12:1	Tr	12:2	Tr
12:0	Tr	14:1	Tr	14:2	2,4 ± 0,1
14:0	0,9 ± 0,1	16:1	3,5 ± 0,1	16:2	1,6 ± 0,1
16:0	27,6 ± 0,2	18:1	34,0 ± 0,9	18:2	11,3 ± 0,1
18:0	5,4 ± 0,5	20:1	2,1 ± 0,7	20:2	Tr
20:0	0,3 ± 0,1			20:3	Tr
22:0	0,7 ± 0,2			20:4	8,7 ± 0,5
Total (%)	34,6		39,6		24,0

Para determinar el contenido en ácidos grasos del extracto lipídico total de la próstata ventral de rata adulta, se utilizó el ácido n-undecanoico como patrón interno, a una concentración de 4-5% respecto del total de lípidos. A este conjunto, lípidos totales más patrón interno, se le realizó la metanolisis, como en (2.4.3.1), procediéndose a continuación a la separación (2.4.3.2) y cuantificación de sus ésteres metílicos, según se describe en (2.5.1). Se obtuvieron valores de  $67'7 \pm 5'6$  mg de ácidos grasos en 100 mg de lípidos totales, siendo este valor netamente superior al obteni

do por Nyden y Williams-Ashman (1953) mediante precipitaciones con ácido de un homogeneizado de próstata ventral de rata y posterior extracción del precipitado con disolventes orgánicos. Tal diferencia es, posiblemente, debida a las múltiples operaciones realizadas por aquellos autores para el aislamiento y purificación de los ácidos grasos.

Con esta información se construye la tabla IV, en la que se dan los  $\mu$ Moles de los distintos ácidos grasos en 100 mg de lípidos.

Tabla IV

$\mu$ M de los distintos ácidos grasos, en 100 mg de lípidos totales de rata adulta. Valores por debajo de 0,5  $\mu$ M se consideran como trazas (Tr)

Acidos grasos saturados		Acidos grasos Monoinsaturados		Acidos grasos poliinsaturados	
$\mu$ Moles/100 mg de lípidos totales					
10:0	Tr	12:1	Tr	12:2	Tr
12:0	Tr	14:1	Tr	14:2	7,3 $\pm$ 0,3
14:0	2,8 $\pm$ 0,3	16:1	9,3 $\pm$ 0,2	16:2	4,3 $\pm$ 0,3
16:0	72,9 $\pm$ 0,5	18:1	81,6 $\pm$ 2,1	18:2	27,3 $\pm$ 0,2
18:0	12,9 $\pm$ 1,2	20:1	4,6 $\pm$ 1,4	20:2	Tr
20:0	0,7 $\pm$ 0,2			20:3	Tr
22:0	1,4 $\pm$ 0,4			20:4	19,4 $\pm$ 1

De esta tabla se deduce aproximadamente el mismo número de  $\mu$ Moles de ácidos grasos saturados que de monoinsaturados, alrededor de 90  $\mu$ Moles aunque éstos últimos predominan ligeramente. Por otro lado, los ácidos grasos poliinsaturados constituyen sólo el 60% de los monoinsaturados.

### 3.2.3. *Contenido en fosfolípidos, triacilglicéridos y ácidos grasos libres en los lípidos de la próstata.*

Con el fin de conocer las clases de lípidos más importantes en el extracto lipídico total de la próstata, se procedió a separar los lípidos polares de los neutros, así como a las distintas clases de entre estos últimos, según se indica en (2.4.2). El análisis cuantitativo de los triacilglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos libres se realizó por el método de Christie y col. (1970) (2.5.1). Así mismo, con el fin de comprobar los resultados obtenidos por el método anterior, basado en la separación de ésteres metílicos de los ácidos grasos en cromatografía gas líquido, se procedió a la utilización de métodos colorimétricos para los triacilglicéridos y fosfolípidos, como se describe en (2.5.2). Ambos métodos proporcionan datos análogos, lo que da gran fiabilidad a los mismos. Los ácidos grasos libres no se han determinado por titulación ácido-base (Ko y Royer, 1967), debido a que estas medidas vienen afectadas de un error mayor que aquellas dadas por el método cromatográfico.

En la tabla V se dan las concentraciones de las tres clases de lípidos, expresadas en mg por gramo de próstata húmeda, para tres lotes de ratas que se encuentran en tres estadios del desarrollo. Recordemos que la relación edad-peso aparece en 2.1 fig. 12 mientras que la relación entre el peso de la rata y el peso de la próstata es como se indica en la figura 18.

Tabla V

Peso de próstata y concentraciones de triacilgli  
céridos (TG), fosfolípidos (FL) y ácidos grasos libres (AGL) en  
tres estadios del desarrollo de la rata

Peso Rata (g)	Peso Próstata (mg)	concentración (mg/g próstata húmeda)			
		lípidos totales	FL	TG	AGL
100 ± 9	54 ± 7	25 ± 0,8	9,16±1,8	5,6±0,1	0,3±0,1
270 ± 20	350 ± 46	21 ± 1,2	11,2 ±2,6	4,2±0,8	1,1±0,3
350 ± 19	493 ± 70	20 ± 0,6	12,1 ±1,7	2,1±0,4	0,7±0,3

Puede observarse en la tabla V una variación del con  
tenido en lípidos de la próstata ventral con el desarrollo  
de la glándula, de tal forma que, al aumentar el tamaño de  
la glándula, disminuye la proporción de lípidos totales. Lo  
mismo ha sido observado por Sinclair (1974) en los lípidos  
totales de hígado de rata, cuyo contenido desciende entre  
los 35 días y la etapa adulta. De esta tabla se deduce tam  
bién que la concentración de fosfolípidos, triacilglicéridos  
y ácidos grasos libres, no permanece constante con la  
evolución de la glándula, teniéndose los valores más altos  
de triacilglicéridos en ratas de 100 g, en comparación con  
las ratas adultas, en las que se alcanzan valores más bajos.  
Algo semejante observa Sinclair (1974) para los triacilgli  
céridos del hígado de rata entre los 35 días y la etapa adul  
ta, momento, éste último, en el que se alcanzan los valores  
mínimos desde el primer día de nacimiento. A los fosfolípi  
dos les sucede lo contrario: aumenta su contenido con la  
edad.

El contenido en colesterol de la próstata ventral es un 10% del extracto lipídico total (Alcaide y col., 1980), para el mismo período de tiempo que el estudiado en la tabla V.

#### 3.2.4. *Distribución de ácidos grasos en triacilglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos libres*

Una vez conocida la distinta composición lipídica de la próstata ventral de rata a lo largo del desarrollo, se procedió al estudio comparado de la distribución de los distintos ácidos grasos en fosfolípidos, triacilglicéridos y ácidos grasos libres. Se escogieron para estos ensayos dos etapas del desarrollo animal, correspondientes a ratas en edad inmadura y a ratas adultas.

En las figuras 22 y 23 se muestran los cromatogramas tipo correspondientes a triacilglicéridos extraídos de próstatas de ratas inmaduras y de ratas adultas, respectivamente. No se observan cambios notables, al crecer la rata, entre los ácidos grasos componentes de los triacilglicéridos pues, si bien al comparar las figuras 22 y 23 parece aumentar el pico correspondiente al ácido graso 18:2, al pasar de rata inmadura a rata adulta, esto se debe a un cambio en la atenuación entre los picos 18:1 y 18:2 correspondientes al cromatograma de la fig. 23.

En las figuras 24 y 25 aparecen representados dos cromatogramas tipo correspondientes a fosfolípidos extraídos de próstatas ventrales de rata en los dos estadios del desarrollo mencionados en el caso anterior. Tampoco aparecen cambios notables entre los ácidos grasos componentes de fosfolípidos al crecer la rata. Sin embargo, al comparar los cromatogramas correspondientes a triacilglicéridos (figs. 22 y 23) con los correspondientes a fosfolípidos (figs. 24 y 25), se observa que, en estos últimos, es mayor el pico co-

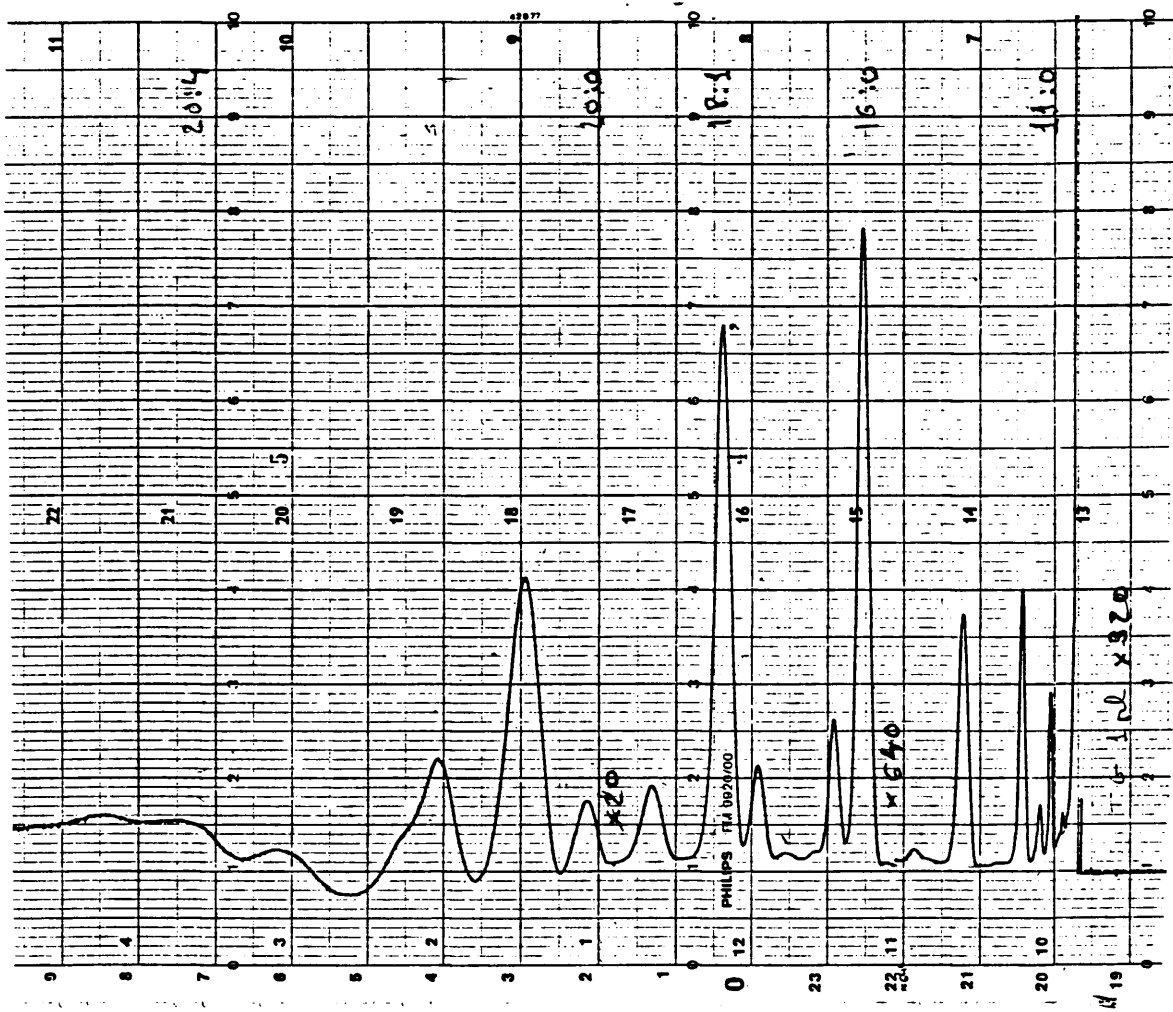


Figura 22.- Cromatograma de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que forman parte de los triacilglicéridos de próstata de rata in madura más el ácido undecanoico (11:0). Condiciones como en fig. 20.

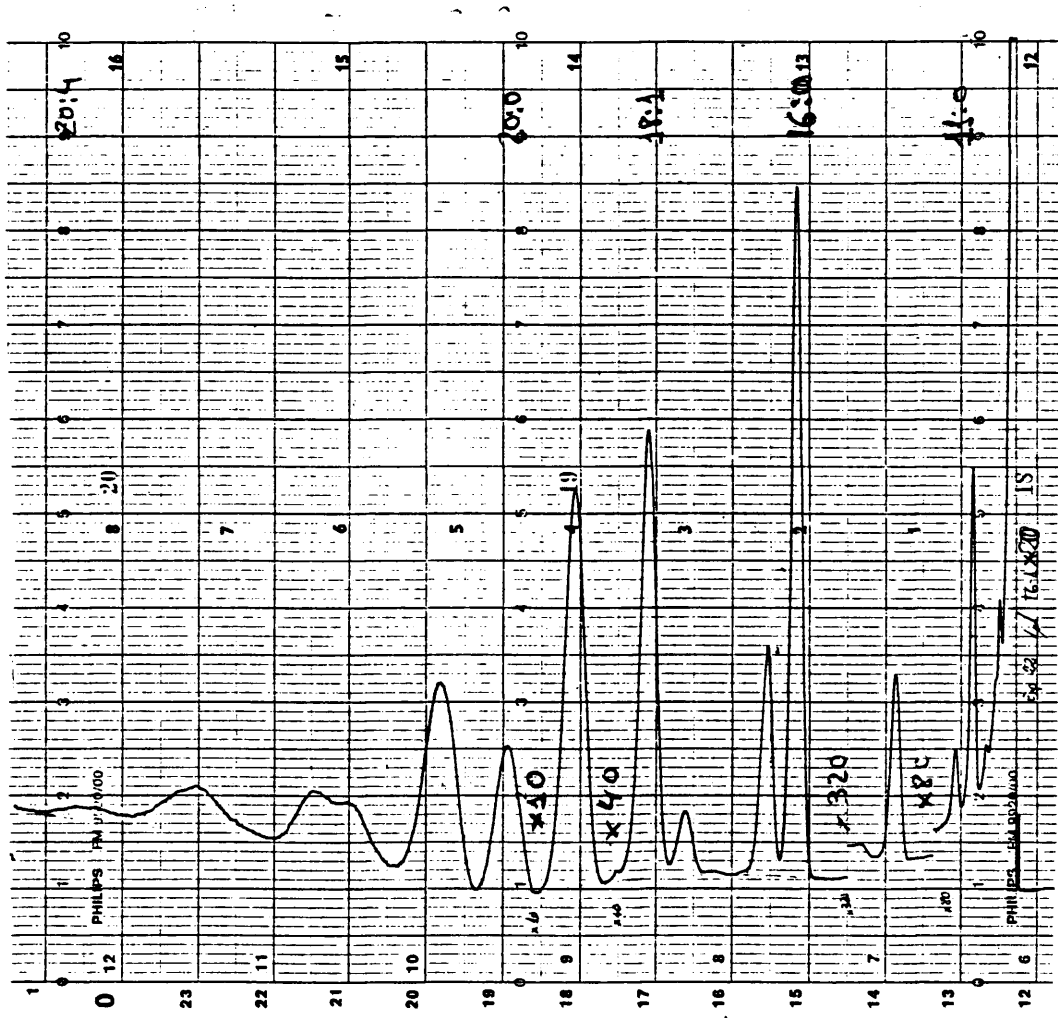


Figura 23.- Cromatograma de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que forman parte de los triacilglicéridos de próstata de rata adulta más el ácido undecanoico (11:0). Condiciones como en fig. 20.

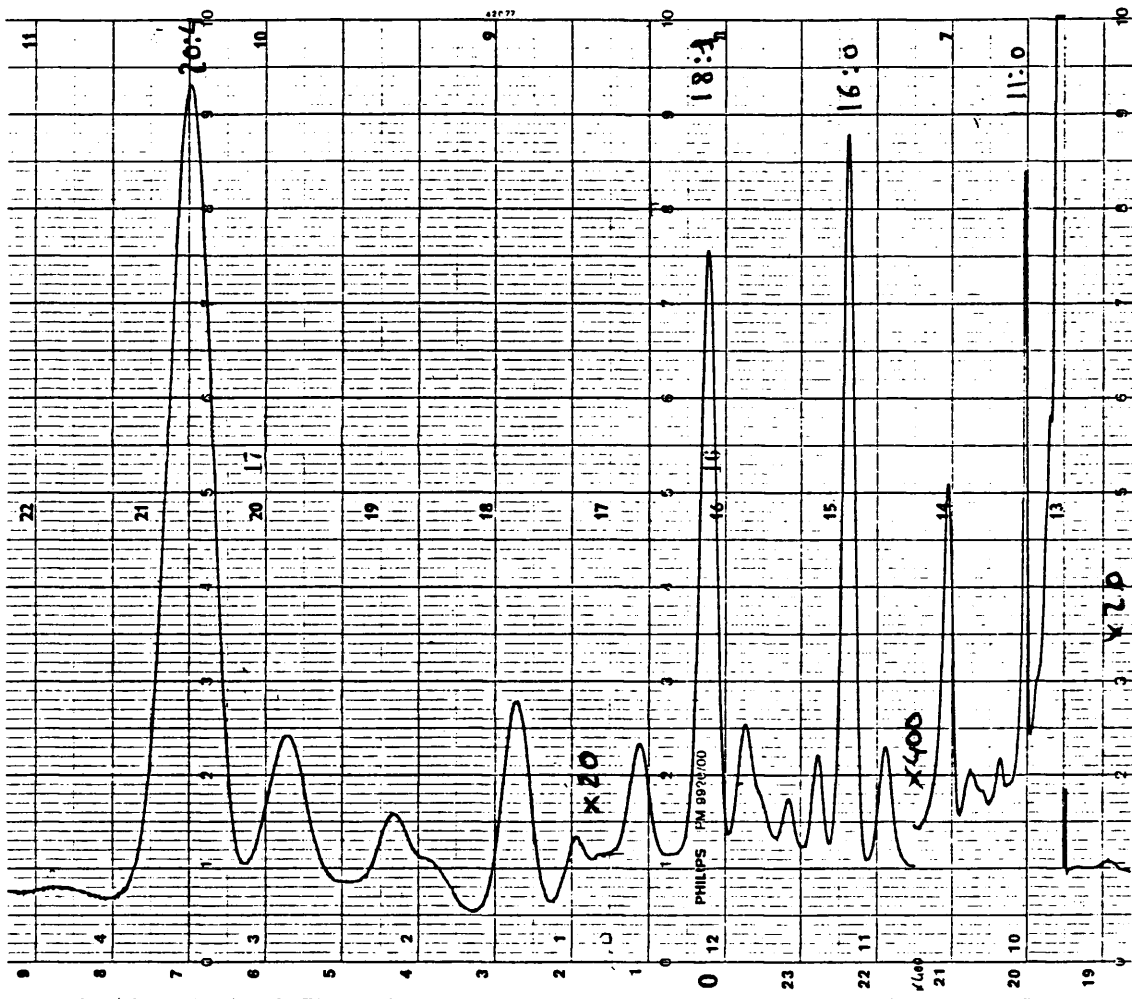


Figura 24.- Cromatograma de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos de próstata de rata inmadura más el ácido undecanoico (11:0). Condiciones como en fig. 20.

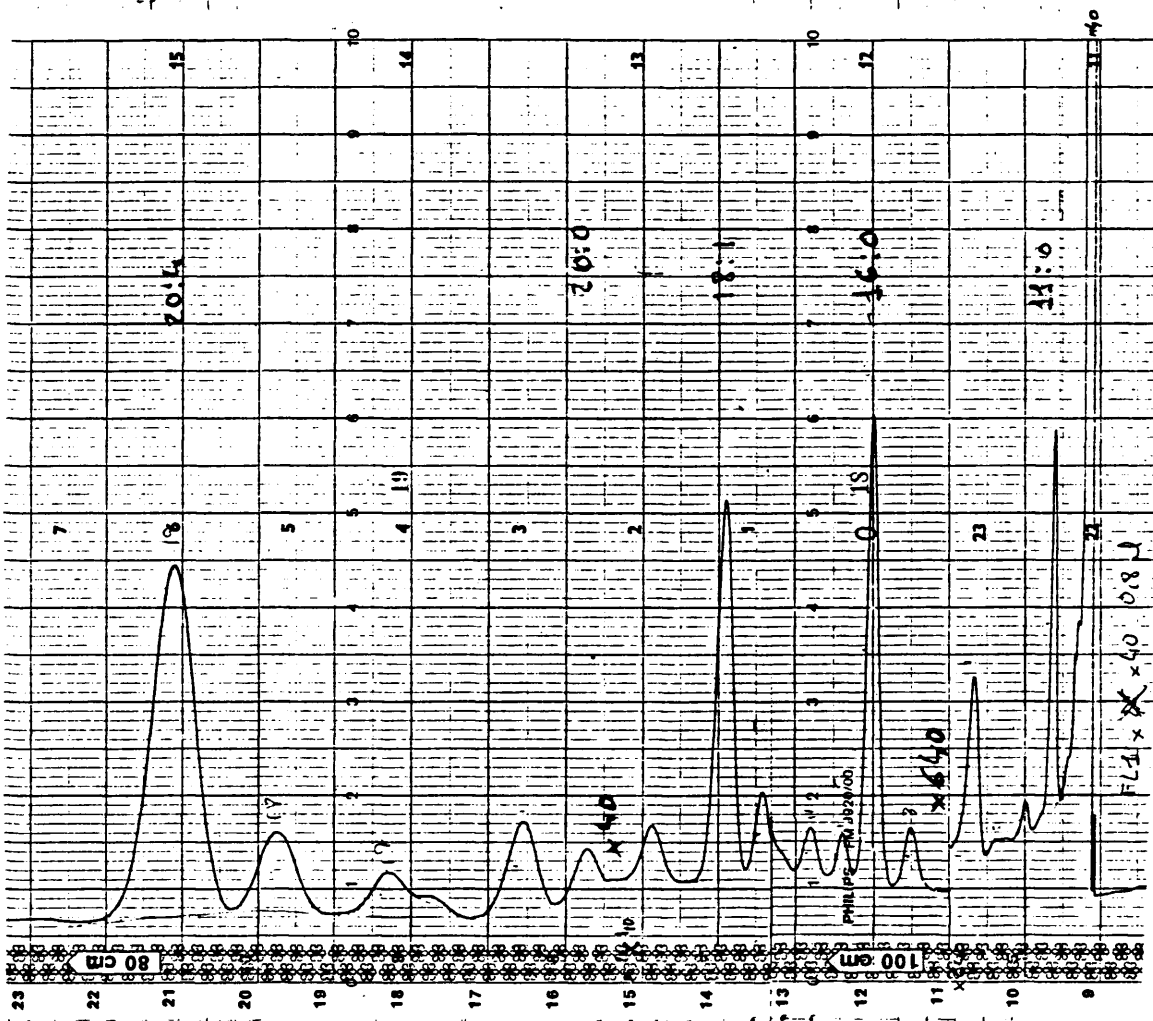


Figura 25.- Cromatograma de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos de próstata de rata adulta más el ácido undecanoico (11:0). Condiciones como en fig. 20.

rrespondiente al ácido graso de 20 átomos de carbono y 4 dobles enlaces. La importancia de este hecho se discutirá al estudiar los datos presentados en las figuras 28 y 29.

Las figuras 26 y 27 corresponden a los cromatogramas tipo de ácidos grasos libres, en las mismas condiciones que en los casos anteriores. Al estar presentes los ácidos grasos libres en próstata (tabla V) a concentraciones mucho menores que los triacilglicéridos y fosfolípidos, las cantidades disponibles son más escasas. Esto hace que las atenuaciones a las que se trabaja sean menores, y que, por lo tanto, sea más difícil controlar la línea de base. Sin embargo, los cromatogramas son perfectamente calculables, y las áreas totalmente significativas. Al igual que en los casos anteriores, no se observan variaciones en la composición de ácidos grasos libres de próstata ventral de rata al pasar de ratas inmaduras a ratas adultas jóvenes.

Las figuras 28 y 29 recopilan los porcentajes en que se encuentran los distintos ácidos grasos en triacilglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos libres. La fig. 28 corresponde a lípidos extraídos de próstata de ratas inmaduras, mientras que la fig. 29 corresponde a ratas adultas jóvenes. Comparando ambas figuras no se observan cambios notables en la composición de los ácidos grasos con el desarrollo animal, tanto en triacilglicéridos como en fosfolípidos y ácidos grasos libres.

En triacilglicéridos, el ácido graso saturado más abundante en el ácido palmítico (16:0), disminuyendo mucho el porcentaje de los ácidos grasos con el mismo número de átomos de carbono pero con algún grado de insaturación. Otro ácido graso que se presenta en cantidades importantes es el oleico (18:1), bajando mucho el porcentaje de los correspondientes ácidos grasos con el mismo número de átomos de carbono pero con ninguno o con dos dobles enlaces.

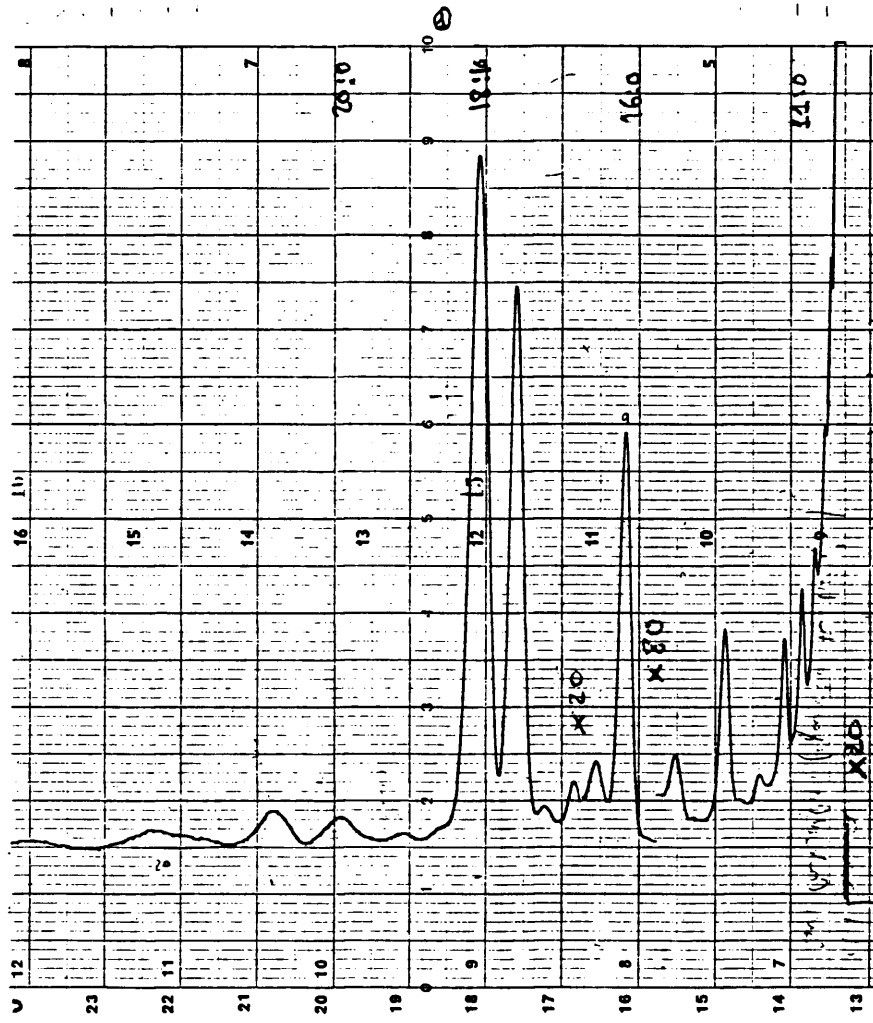


Figura 26.- Cromatograma de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que forman parte de los ácidos grasos libres de próstata de rata inmadura más el ácido undecanoico (11:0). Condiciones como en fig. 20.

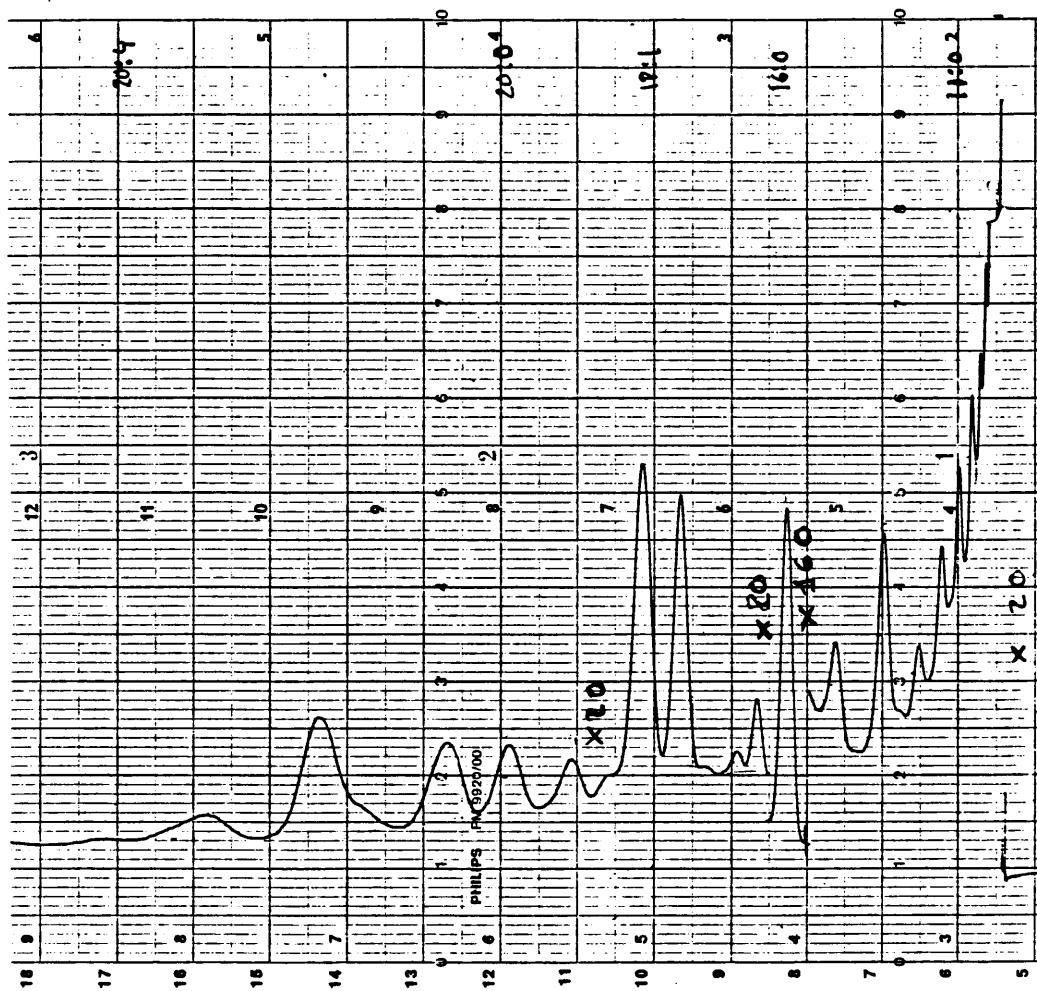
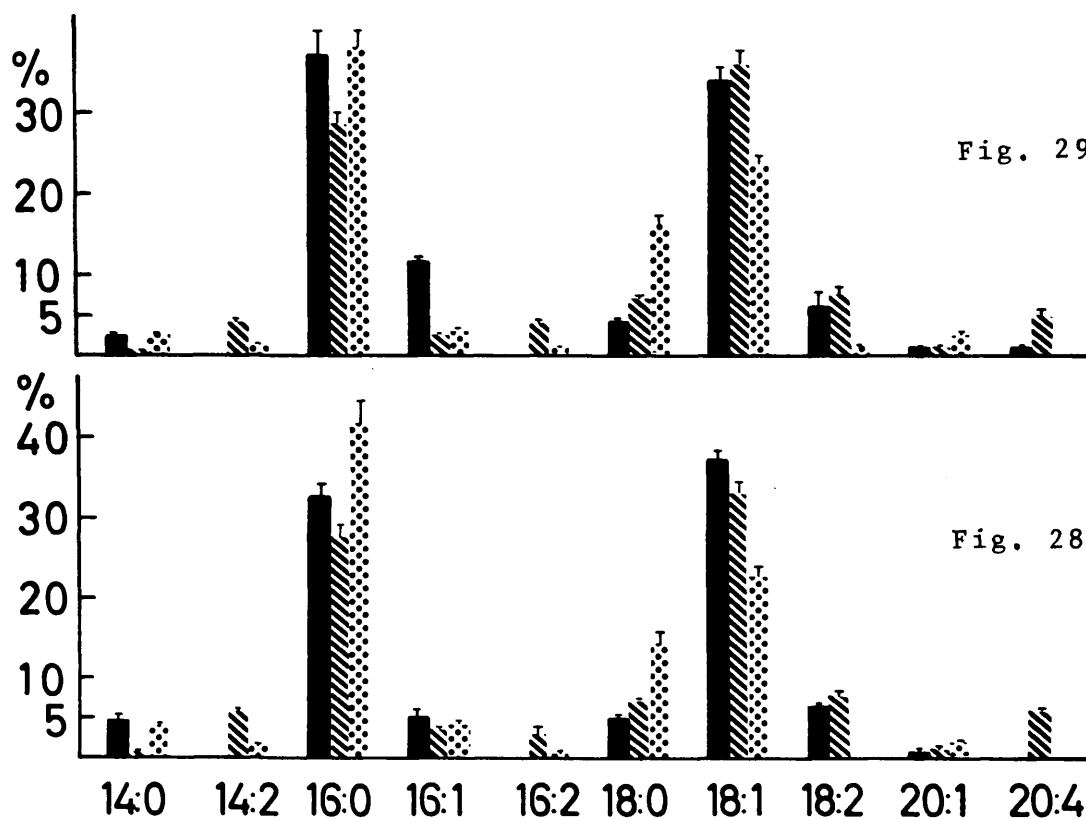


Figura 27.- Cromatograma de los ésteres metálicos de los ácidos grasos que forman parte de los ácidos grasos libres de próstata de rata adulta, más el ácido undecanoico (11:0). Condiciones como en fig. 20.



Figuras 28 y 29.- Distribución de los ácidos grasos de la próstata de rata inmadura fig. 28 y adulta fig. 29 en triacilglicéridos (barras ne gras) fosfolípidos (barras rayadas) y ácidos grasos libres (barras punteadas).

En los fosfolípidos se mantiene la tónica anterior, salvo en que se invierte el orden en cuanto a la abundancia, ya que el porcentaje superior corresponde al ácido oleico, siguiéndole el ácido palmítico.

El ácido graso poliinsaturado 20:4 aparece fundamentalmente en los fosfolípidos de próstatas de ratas, tanto inmaduras como adultas. Esta acumulación de ácidos grasos poliinsaturados en fosfolípidos se produce normalmente en animales alimentados con dietas en las que las únicas grasas poliinsaturadas presentes son el linoleico (18:2) y el linolenico (18:3) (Hilditch y Williams, 1964). Es bien conocido que estos dos ácidos grasos no pueden ser sintetizados por mamíferos, pero que, cuando se incluyen en la dieta, pueden convertirse en el animal en ácidos grasos de cadena más larga y más insaturadas. Estos ácidos grasos insaturados así formados pasan a formar parte de los diversos lípidos. (Privett y col., 1969; Brockerhoff y col. 1969).

La acumulación del ácido graso 20:4 en fosfolípidos puede estar relacionada con la síntesis de prostaglandinas, que comienza con la liberación de un ácido graso poliinsaturado de 20 átomos de carbono, procedente de fosfolípidos (fosfatidilcolina o fosfatidilinositol), liberado por acción de la fosfolipasa A. En próstata se sintetiza la prostaglandina  $PGF_{2\alpha}$  (Cavanaugh y col. 1980)., y su formación tiene lugar a partir del ácido araquidónico (20:4).

Para comparar los ácidos grasos que se encuentran libres en próstata; es decir, sin esterificar a ningún alcohol, con los ácidos grasos presentes en triacilglicéridos y fosfolípidos, se ha confeccionado la tabla VI.

En esta tabla se muestran los porcentajes de ácidos grasos, saturados e insaturados, en triacilglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos libres de próstata ventral de ra

ta, en dos estadios del desarrollo. La relación entre ácidos grasos saturados e insaturados en fosfolípidos y triacilglicéridos se mantiene en los márgenes que se obtuvieron para lípidos totales (tabla III), mientras que esta relación se invierte para ácidos grasos libres, ya que, en este caso, la proporción de ácidos grasos saturados es mucho mayor que la de insaturados. Esto sugiere, en la misma línea que lo descrito por otros autores (Municio y col., 1975), una modificación en el grado de insaturación de los ácidos grasos incorporados a clases de lípidos.

Tabla VI

Porcentajes de ácidos grasos, saturados e insaturados, en triacilglicéridos (TG), fosfolípidos (FL) y ácidos grasos libres (AGL), de la próstata ventral de rata.

Acidos grasos %	Peso de Rata 100 g			Peso de Rata 350		
	TG	FL	AGL	TG	FL	AGL
saturados	47,6	37,6	64,6	44,2	38,3	61,5
insaturados	52,4	62,4	36,4	57,6	61,7	38,5

### 3.3. INCORPORACION DE ACETATO (1-<sup>14</sup>C) A LIPIDOS DE PROSTATA EN EXPERIMENTOS "IN VIVO"

#### 3.3.1. Incorporación a lípidos totales

Con el fin de conocer el origen de los lípidos en la próstata, se procedió a estudiar la incorporación de acetato (1-<sup>14</sup>C) a los lípidos totales, en experimentos llevados a cabo "in situ", es decir, mediante la inyección directa en

próstata de acetato radiactivo como se describe en (2.2.3). Los datos, expresados en la figura 30, muestran la incorporación de acetato a lípidos totales en cpm/mg de próstata húmeda a lo largo de un período del desarrollo que comprende desde la prepubertad hasta la edad adulta.

Se observa en la figura 30 un crecimiento lineal en la incorporación de acetato radiactivo a lípidos totales en función del peso de la rata, hasta un máximo de incorporación situado, aproximadamente, a unas 7 semanas de vida del animal, momento en el que se produce la irrupción de la madurez sexual. Recuérdese que, en este estadio del desarrollo, la próstata de rata y la rata misma en general están sufriendo un fuerte incremento en peso (figuras 12 18).

Por otra parte, la figura 30 sugiere la existencia de un punto, situado hacia la 7<sup>a</sup> semana de vida, a partir del cual, y dependiendo en cada caso concreto, parece apreciarse una caída rápida en la incorporación, resaltada en la figura por el hecho de haberse realizado un ajuste, por subintervalos, de tipo mínimos cuadrados, lo que da lugar a una discontinuidad; es decir, se han ajustado dos curvas, una para pesos de ratas comprendidos en 0-170 g, la otra entre 170-450 g, elección sugerida, a su vez, no sólo por la nube de puntos, sino por la bibliografía ya existente (Lee y col., 1975; Corpéchet y col., 1981). Finalmente, a partir de las siete semanas, la caída en la incorporación de acetato radiactivo a lípidos totales se ralentiza aun cuando persista durante cierto tiempo, para estabilizarse finalmente en el período adulto.

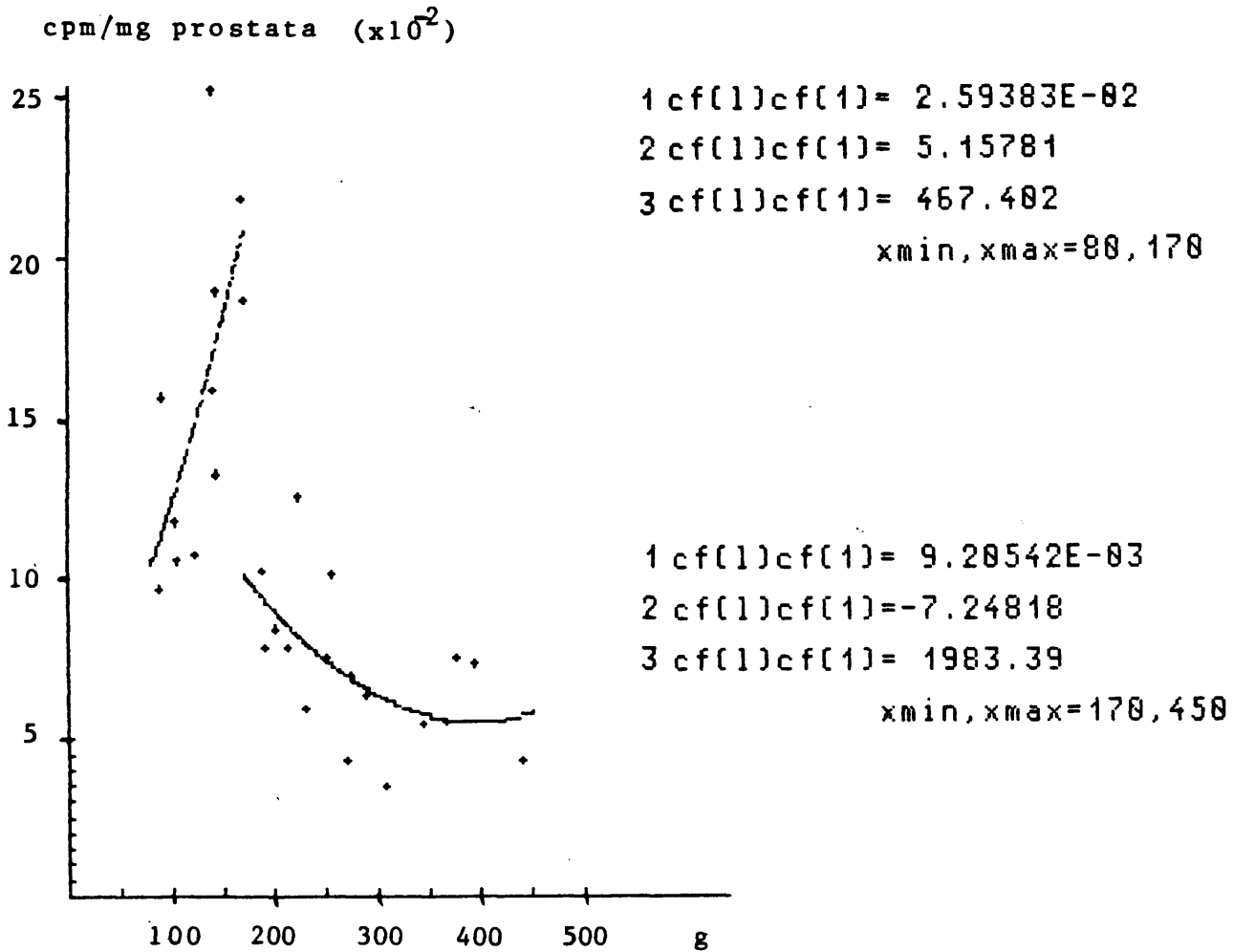


Figura 30.- Variación en la incorporación *in vivo*, de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a lípidos totales de la próstata (cpm/mg de próstata húmeda) en función del desarrollo de la rata (g). Se han ajustado dos curvas polinómicas  $y = ax^2 + bx + c$  por mínimos cuadrados en los intervalos de  $x$  (peso de rata) 80-170 g y 170-450 g.  $a = 1cf(1)$ ;  $b = 2cf(1)$  y  $c = 3cf(1)$ .

### 3.3.2. Incorporación a clases de lípidos.

La distribución de este acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) incorporado a material lipídico, en distintas clases de lípidos, se muestra en la figura 31, en la que se observa una incorporación preferente a triacilglicéridos en la próstata ventral de ratas inmaduras, mientras que, en ratas adultas, predomina la incorporación a fosfolípidos. Hay que resaltar la existencia de una zona de cruce en las curvas de incorporación de acetato a triacilglicéridos y fosfolípidos. Este cruce coincide precisamente con la época de la pubertad, en las condiciones de cría de nuestras ratas.

Tanto los diacilglicéridos como los ácidos grasos libres, muestran incorporación de acetato constante en todo el período del desarrollo estudiado, Recio y col. (1982) han demostrado que la incorporación de acetato a colesterol, en el período de crecimiento que se estudia en la figura 31, presenta también valores constantes. La incorporación de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) en colesterol es el 10% de la observada para el extracto lipídico total.

La pobre incorporación del precursor radioactivo en ácidos grasos libres, con respecto a la incorporación encontrada en fosfolípidos y triacilglicéridos, refleja una rápida utilización de los ácidos grasos, según se van formando por biosíntesis, para formar nuevos lípidos, permaneciendo, de este modo, sus niveles de incorporación constantes (fig. 31).

Para relacionar los datos de incorporación de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) en triacilglicéridos y fosfolípidos, a lo largo del desarrollo de la próstata ventral de rata, con el contenido en masa de estos lípidos, se ha confeccionado, a partir de los datos expresados en la tabla V una relación (tabla VII) en la que se recogen los porcentajes relativos de éstos lípidos.

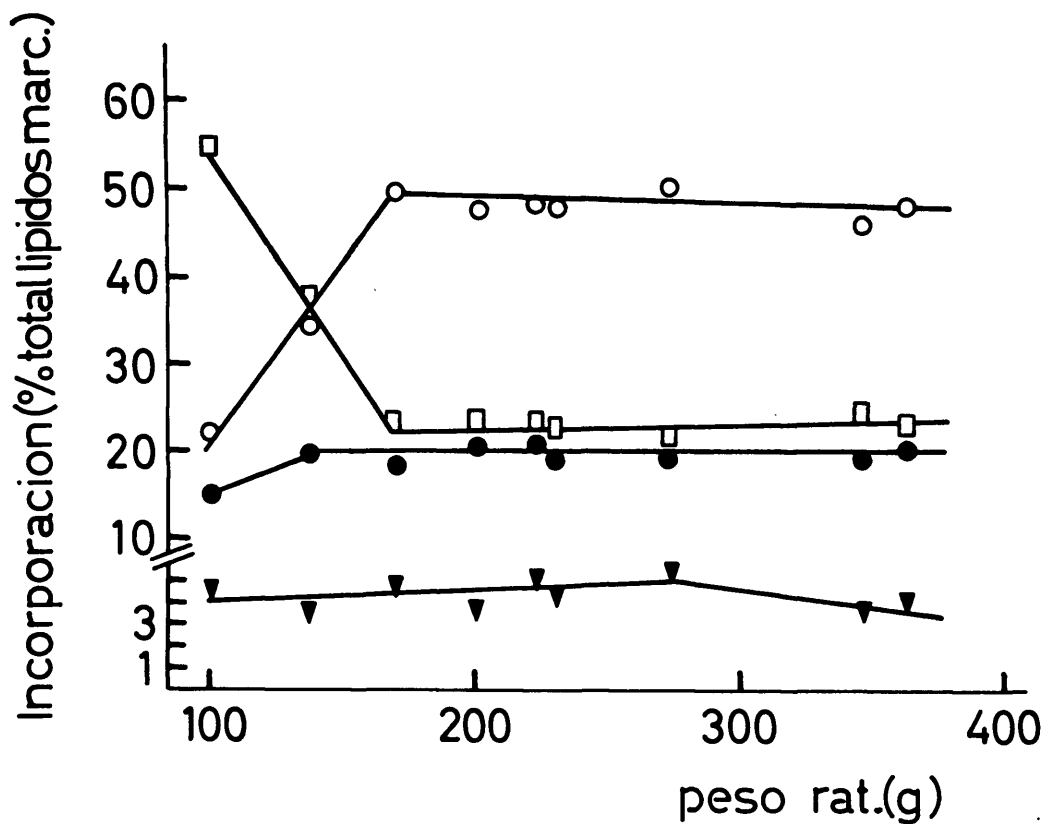


Figura 31.- Incorporación *in vivo* de Acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) en triacilglicéridos (□) fosfolípidos (○) diacilglicéridos (●) y ácidos grasos libres (▼) durante el desarrollo de la rata. La radiactividad se da como un porcentaje del total de lípidos marcados.

Tabla VII

Porcentaje en peso de FL, TG, AGL durante el desarrollo de la próstata ventral de rata.

Peso de rata (g)	Peso de Próstata (mg)	FL	TG %	AGL
100 ± 9	54 ± 8	61,3 ± 1,8	37,1±8,1	1,6±0,1
270 ± 20	350 ± 46	67,9 ± 2,6	25,6±1,1	6,4±0,3
350 ± 19	493 ± 70	80,8 ± 1,8	14,7±0,7	4,6 ±0,3

Tanto los datos de la figura 31 como los de la tabla VII son totalmente concordantes y muestran una variación en la clase de lípidos sintetizados prioritariamente durante el desarrollo de la rata. Así, tanto la incorporación de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a fosfolípidos, como el contenido de éstos, aumenta con el desarrollo, mientras que a los triacilglicéridos les sucede lo contrario, disminuyen con él; en cuanto a los ácidos grasos, se observa un máximo tanto en el contenido como en la incorporación radiactiva, en una etapa intermedia del desarrollo.

Este progresivo desplazamiento en la incorporación de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) desde triacilglicéridos hasta fosfolípidos, podría explicarse en base a unas mayores necesidades energéticas (en forma de triacilglicéridos) durante la pubertad para posteriormente sintetizarse preferentemente los lípidos estructurales de membrana, tales como los fosfolípidos.

3.4. INFLUENCIA DE LOS ANDROGENOS EN LA INCORPORACION DE ACETATO A TRIALGLICERIDOS Y FOSFOLIPIDOS EN PROSTATA VENTRAL: ESTUDIOS "IN VIVO".

Los cambios producidos durante la pubertad de las ratas, en cuanto a incorporación de acetato marcado a triacilglicéridos y fosfolípidos, y que se reflejan en los contenidos en masa de estos lípidos en próstata ventral de rata, pueden deberse a causas distintas y ser objetivo de varias interpretaciones. Por una parte, se ha descrito que los niveles de testosterona en plasma y próstata alcanzan un máximo hacia la pubertad de la rata (Smith y col., 1977; Moger, 1977; Corpéchet y col., 1981). El incremento de las hormonas sexuales durante la pubertad provoca el crecimiento de la glándula prostática, conjuntamente con la reorganización tisular y un aumento de su función secretora (Siiteri y Wilson, 1970; Moger, 1977). El peso prostático, su ordenación tisular y la función exocrina, persisten durante la vida adulta, debido a la influencia de los andrógenos (Siiteri y Wilson, 1970). En este sentido, hay tres períodos en el desarrollo de la rata (neonatal, prepubertal y pubertal) que son cruciales en cuanto a la adquisición de la actividad funcional de los tejidos sexuales accesorios en rata macho adulta (Higgins y col., 1981).

Por otro lado la castración causa un descenso brusco de los niveles de testosterona en suero, lo que origina una disminución del peso y función prostática. La administración de testosterona a ratas castradas provoca un incremento de estos parámetros (Heyns y col., 1977; Singhal y Schaffner, 1980; Huttunen y col., 1982). Parece, pues, evidente que la función y condición de la próstata depende de la producción de andrógenos por los testículos. Puesto que la testosterona estimula la síntesis de lípidos (Doeg, 1968) y, en particular, de colesterol (Singhal y col., 1978, 1979, 1980), se puede considerar que los cambios que ocurren durante la pu-

bertad, descritos en los experimentos anteriores, son una respuesta a la producción de andrógenos en este estadio del desarrollo. El estudio de esta hipótesis es complicado, pues las hormonas esteroídicas presentan el problema, como todos los compuestos lipídicos, de tener que transportarse en un medio acuoso como es el plasma. Para que las hormonas esteroídicas exógenas lleguen a las células de la próstata, se unan a sus receptores citoplasmáticos, y puedan ejercer su acción en el núcleo, es preciso presentarlas convenientemente solubilizadas.

Se ha decidido utilizar comparativamente dos sistemas, uno "*in vivo*" y otro "*in vitro*". En el sistema "*in vivo*" se inyectan, subcutáneamente, los andrógenos para que se movilicen de manera fisiológica espontánea, y en el sistema "*in vitro*" se comparan varios medios de dispersión.

Para los ensayos "*in vivo*" con andrógenos exógenos, es preciso controlar los niveles endógenos de hormonas sexuales. Con próstatas pertenecientes a ratas en etapas inmaduras, previas a la pubertad, podría trabajarse, ya que en estos estadios la testosterona endógena, tanto circulante en plasma como en próstata, presenta bajos niveles (Corpéchet y col., 1981). Sin embargo, en la práctica es difícil trabajar con estas próstatas, dado su pequeño tamaño, las fluctuaciones bioquímicas y fisiológicas en el comienzo de la prepubertad, y la corta duración de este período.

Otra posibilidad es influir sobre el sistema hormonal que actúa en la glándula prostática de rata adulta para suprimir el concurso de andrógenos endógenos. Una alternativa descrita en la bibliografía consiste en tratar al animal con un antagonista (estrógenos) por un tiempo, e interrumpir el tratamiento en el momento adecuado, el inconveniente es, incluir en el sistema un factor perturbador que puede tener una serie de acciones "per se" (Higgins y col.,

1981). Otras alternativas muy empleadas consisten en procedimientos de ablación, como la hipofisectomía o la castración, que tienen el inconveniente de ser métodos irreversibles, y debe de mantenerse continuamente una correcta terapia si se pretende que la perturbación no sea indefinida.

En este trabajo, se ha utilizado la castración, debido a su amplia utilización en el estudio de la acción de los andrógenos en el metabolismo de lípidos en próstata (Nyden y Williams - Ashman (1953); Farnsworth y Brown, 1961; Hollander, 1963; Doeg, 1968; Singhal y col., 1978, 1979; Singhal y Schaffner, 1980).

Con la castración se obtiene un sistema *in vivo* libre de la acción de andrógenos, ya que T y DHT no son detectables por RIA en plasma de ratas adultas previamente castradas (Corpechot y col. 1981). El descenso de los niveles de T en plasma conlleva a descensos en peso de la próstata, como se muestra en la fig. 19 (3.1) para ratas adultas, siete días después de la castración. Los pesos de estas próstatas semejan a los que presentan las ratas normales en la etapa inmadura (ver fig.18 (3.1)).

Si posteriormente se suministra T a estas ratas castradas, se restauran los niveles de T en plasma y de DHT en próstata (ver fig.14 en 2.2.2). Esta promueve la regeneración rápida del tejido prostático (Huttunen y col., 1981), en cierta forma semejante a la que se obtiene en la pubertad del animal. Obteniéndose así un crecimiento controlado del tejido prostático.

Las dosis de testosterona y dihidrotestosterona elegida (ver 2.2.2) para promover la regeneración de estas próstatas (de ratas castradas 7 días antes) han sido 0,07 y 0,7 mg/día de ambas hormonas. Hay autores que también han utilizado dosis semejantes de testosterona: 0'05-2 mg cada 2 días (Arvola, 1961). De propionato de testosterona;

0,5-1 mg/día (Yamanaka y col., 1975; Tuohimaa y col., 1973); la dosis de 1 mg/día restaura en 4 días la altura de las células epiteliales de la próstata de ratas castradas 30 días antes y a los 30 días del tratamiento es predominante el crecimiento del parénquima acinar, no pudiéndose demostrar ninguna respuesta considerable en el tejido interacinar (Huttunen y col. 1982). Otros autores han utilizado dosis más altas: 5 mg/día (Deklerk y Coffey, 1978), e incluso más altas: 10 mg/día (Brandes, 1974). Todos los datos están referidos a 100 g de peso corporal de rata.

La inyección "*in situ*" de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) en la próstata nos va a permitir medir la incorporación del mismo a las distintas clases de lípidos como se muestra en la tabla IX.

Tabla IX

Influencia de los andrógenos en la incorporación de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a FL, TG, AGL. Siete días después de la castración de ratas adultas se les suministra por vía subcutánea y durante 4 días consecutivos, 0,2 ml de aceite de sésamo. Control: vehículo solo; DHT: vehículo más dihidrostosterona; T: vehículo más testosterona. (1) 0,07 y (2) 0,7 mg de andrógeno/100g de peso corporal/día.

	FL	TG	AGL
CONTROL	52,6 ± 2,5	31,5 ± 2,0	0,5 ± 0,1
DHT (1)	53,6 ± 2,2	24,3 ± 1,1	1,4 ± 0,3
DHT (2)	57,6 ± 3,1	25,5 ± 1,4	0,7 ± 0,2
T (1)	61,1 ± 4,1	22,1 ± 1,2	1,7 ± 0,3
T (2)	63,0 ± 3,1	18,3 ± 1,3	1,5 ± 0,3

Tanto la administración de testosterona como la de dihidrotestosterona origina un aumento en la incorporación de acetato a fosfolípidos con respecto al control, al que sólo se le ha inyectado el vehículo (tabla IX). Este aumento va acompañado de un descenso concomitante en la incorporación a triacilglicéridos. Estas variaciones son más acusadas según aumentan las dosis de hormonas. Por otra parte, estos resultados son concordantes con los obtenidos en la incorporación de acetato radiactivo a las distintas clases de lípidos en experimentos llevados a cabo "in vivo" con ratas normales (3.3.2).

El que la testosterona presente una capacidad mayor de actuación, puede explicarse en función de los receptores prostáticos de andrógenos. En efecto, los receptores prostáticos de andrógenos decrecen progresivamente entre los 4-7 días después de la castración, y con inyecciones diarias de testosterona a ratas castradas se consigue recuperar, e incluso superar, los niveles de receptores androgénicos prostáticos (Blondeau y col., 1982). No se ha descrito todavía si estos receptores se comportan en todo como los primitivos. Otra posibilidad es que, al ser la testosterona el andrógeno circulante más abundante, la movilización y transporte de la misma por medio de la globulina transportadora de la hormona sexual (HSBG) sea más rápida y eficaz que la correspondiente a la dihidrotestosterona.

### 3.5. INCORPORACION DE ACETATO (1-<sup>14</sup>C) A LIPIDOS EN SISTEMAS IN VITRO

Como se ha visto en el apartado 3.4, la dificultad encontrada en el trabajo con hormonas esteroideas hace preciso contrastar los experimentos "in vivo" e "in vitro". Los sistemas "in vivo", aunque más correctos a nivel fisiológico, son complejos y difícilmente controlables. Así, por ejemplo,

se controlan mal tanto las concentraciones de hormonas de origen exógeno que llegan a la glándula, como sus velocidades de flujo a través de las distintas vías metabólicas. Todo ello acompañado de una gran dispersión de las sustancias exógenas introducidas en el sistema.

Entre los sistemas "in vitro" se encuentran los que utilizan el tejido entero, aislado y perfundido. Este sistema se ha utilizado para glándulas prostática de perro (Campbell y col., 1966), pero no se ha utilizado en próstata ventral de rata debido a las dificultades de caniculación.

Otro sistema "in vitro" consiste en el empleo de cortes o troceado de tejido. Este método tiene la ventaja, respecto del sistema libre de células (que veremos a continuación) de mantener la integridad morfológica y la estructura celular, si bien el tejido está desposeído de su natural interacción con otros órganos, y además está desnervado. La principal desventaja sin embargo, va a ser la posible alteración en el transporte de metabolitos desde el exterior hasta el interior celular. Podría obtenerse además, una falta de reproductividad en los resultados debida a daños al azar producidos en el troceado o a la utilización de trozos procedentes de zonas fisiológica y citológicamente distintas del tejido en cuestión.

Los sistemas libres de células engloban todos los métodos "in vitro" en los que la integridad celular ha sido destruída por ruptura de la membrana plasmática. Como principales ventajas de estos sistemas deben citarse la buena reproductividad, la facilidad de las preparaciones y la ausencia de barreras de permeabilidad que podrían impedir la acción de los compuestos añadidos. Entre las desventajas de estos sistemas están la desviación del sistema original, entendido este último como el tejido en el seno del ser vivo

en cuestión, la ruptura de la organización celular, y la dilución de los sistemas enzimáticos en un medio extraño. A veces es necesario enriquecer estos medios con sustancias metabólicamente activas.

### 3.5.1. Sistema libre de células

Se han empleado dos medios de incubación ampliamente descritos en la bibliografía.

Uno de ellos es el medio de incubación Tris-fosfato enriquecido con algunos cofactores, que ha sido utilizado con profusión en distintos materiales biológicos (Castro y col., 1974; Municio y col., 1975; Mejías y col., 1977), y se describe detalladamente en (2.3.2). En estas condiciones, la incorporación de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a lípidos apenas superó el valor de los tubos de control (incubaciones a tiempo cero). Esta falta de actividad en el sistema no puede explicarse en función de una rápida hidrólisis de los compuestos de alta energía química, como el ATP. Efectivamente, cuando se utilizaron bajas concentraciones de ATP pero con un sistema generador del mismo de forma gradual, creado añadiendo fosfonolpiruvato, a intervalos regulares de tiempo, al medio Tris-fosfato enriquecido, que contiene piruvatoquinasa (como se describe en (2.3.2), tampoco se obtuvieron resultados positivos.

Para tratar de mejorar el método se realizó una optimización de los cofactores, precursores, tiempos de incubación, proteínas, como a continuación se especifica.

Tiempo de incubación .....	0-120 min.
Concentración de proteínas (sobrenadante 3500 rpm) .....	5-18 mg/ml
" " " homogenizado total.	1-25 mg/ml
" " acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) .....	1 $\mu\text{Ci}$ -5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$
" " NADPH .....	0,5-2 mM
Adicionando Estreptomina .....	1 mg/ml
" Acetato sódico .....	0-2 mM
" $\beta$ mercaptoetanol .....	2'5 mM
" Citrato sódico .....	3 mM
" Bicarbonato sódico .....	10 mM

Homogenización en un potter con émbolo accionado a mano.

Se ha observado una clara inhibición del acetato sódico, que se ha desechado en las sucesivas incubaciones. En resumen, las condiciones óptimas de incubación se obtuvieron en el medio Tris-fosfato enriquecido con cofactores, con las siguientes variaciones: 5  $\mu\text{Ci}$  de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ), 20 mg de proteínas de homogenizado total, en 1 ml de incubación a  $37^\circ\text{C}$ , y durante 60 minutos, obteniéndose en estas condiciones hasta 200 cpm/mg de proteínas procedente de próstatas de ratas adultas. Como se desprende de estas condiciones, el sistema requiere grandes cantidades de próstata para un reducido número de experimentos, por lo que se procede a ensayar otros medios.

El medio de homogenización-incubación de Hank, descrito en (2.3.2), contiene como nutriente celular glucosa. Los resultados obtenidos son análogos a los correspondientes encontrados con el medio Tris-fosfato ensayado anteriormente.

Una posible explicación de la baja incorporación encontrada en estos sistemas libres de células es que, al romperse los lisosomas, las enzimas proteolíticas de los mismos procedieran a la digestión de los sistemas proteicos que catalizan la biosíntesis lipídica.

Con objeto de controlar las proteasas se han añadido al medio de incubación de Hank inhibidores específicos de las mismas. Algunos de estos inhibidores ya han sido probados con éxito para prevenir la degradación de los receptores de andrógenos en próstata ventral de rata (Prins y Lee, 1982 a ), o reduciendo la actividad proteolítica en otros órganos (Diezel y col., 1973).

Los inhibidores empleados han sido los siguientes:

- a) PMFS
- b)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1 M)
- c) PMFS (1mM) y EDTA (0'1 mM)

Los mejores resultados se han obtenido con PMFS y EDTA en las concentraciones indicadas en c). De esta manera se logra aumentar en un 50% la incorporación de acetato radioactivo con respecto a los controles incubados de igual manera, pero sin inhibidores de proteasas.

Teniendo en cuenta que un gran número de los sistemas enzimáticos responsables de la síntesis de lípidos se encuentran asociados a membranas (Bell y col., 1981), la ruptura de éstas, provocada por la homogenización, podría dañar sus estructuras tridimensionales y, por lo tanto, su capacidad catalítica. Por otra parte, la pérdida de la organización tisular sería suficiente para disminuir considerablemente la biosíntesis lipídica ya que, según Cunha y col. (1981), las inter-relaciones entre el estroma y las células acinares prostáticas tiene gran importancia para explicar la funcionalidad

de la glándula.

Ambos inconvenientes, ruptura celular y pérdida de organización tisular, se evitan utilizando tejido troceado.

### 3.5.2. *Sistemas con tejido troceado*

Los cortes de tejido en general, y de próstata ventral de rata en particular, en ensayos "in vitro", han sido muy utilizados en la bibliografía (Nyden y Williams-Ashman 1953; Farnsworth y Brown, 1961; Hollander, 1963; Singhal y col. 1978 y 1979; Singhal y Schaffner, 1980). Concretamente, en próstata ventral de rata, este método presenta gran reproductibilidad, ya que Romppanen y col. (1980) han comprobado un ordenamiento al azar de sus componentes celulares. Es pues indiferente la parte de tejido prostático que se trocea.

#### 3.5.2.1. *Elección del medio de incubación*

Básicamente se utilizan dos medios de incubación, y a cada uno de ellos se le va a realizar alguna modificación, como se indicará en cada caso.

Uno de los medios está formado por un tampón Tris-fosfato. El otro es la solución de Hank, que contiene, además de las sales minerales, la glucosa como nutriente celular (ambos descritos en 2.3.2).

Las condiciones de incubación fueron: 1 hora, 40 mg de próstata troceada y 2  $\mu$ Ci de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) en 2 ml de medio.

En los cuatro medios de incubación utilizados (tabla X), se observa una incorporación apreciable de acetato marcado a lípidos totales, a diferencia de lo que ocurría en el sistema libre de células. Se observa también que, para todos los medios de incubación, existe una variación en

la incorporación de acetato a lípidos, dependiendo del estado del desarrollo en que se encuentra el animal (tabla X). La incorporación es máxima en ratas jóvenes inmaduras, y de sc ciende con la edad.

Tabla X

Incorporación de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a lípidos totales, en incubaciones "in vitro" de próstata, 40 mg de próstata ventral troceada, con 2  $\mu\text{Ci}$  de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ), en 2 ml de medio.

- 1: Tampon Tris-fosfato pH=7,4 y NADPH 1 mM;
- 1\*: Medio 1 adicionado con ATP 6 mM, CoA 0'5 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM;
- 2: Hank con calcio;
- 2\*: Medio 2 + NADPH 1 mM.

Peso de rata g $\pm$ ESM	cpm/mg $\pm$ ESM			
	1:	1*:	2:	2*:
95 $\pm$ 5	2304 $\pm$ 230	2332 $\pm$ 463	2490 $\pm$ 311	2366 $\pm$ 326
275 $\pm$ 10	1880 $\pm$ 155		2075 $\pm$ 150	2660 $\pm$ 243
330 $\pm$ 8		1698 $\pm$ 200		
460 $\pm$ 12	1020 $\pm$ 101	1114 $\pm$ 250	956 $\pm$ 201	1404 $\pm$ 192

Comparando los distintos medios de incubación entre sí, se observa una incorporación de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a lípidos, que es superior en los medios que utilizan la solución de Hank (2 y 2\*), con respecto a los que utilizan tampón Tris-fosfato (1 y 1\*). En este último medio no se observa variación en la incorporación de acetato a lípidos, ya se

adicione o no al medio CoA, ATP, (quienes no atraviesan la membrana) ó  $Mg^{2+}$ . El medio que utiliza la solución de Hank se ve favorecido por la adición de NADPH 1 mM al mismo.

Los porcentajes de incorporación de acetato ( $1-^{14}C$ ) a las distintas clases de lípidos, obtenidas en las incubaciones "in vitro" con los medios de incubación de la tabla X, se dan en la figura 32 para dos estadios del desarrollo diferentes, en ratas inmaduras, así como en las adultas plenas.

En los medios en que se utilizó el tampón Tris-fosfato (fig. 32, 1 y 1\*), se observan básicamente los mismos perfiles de incorporación, tanto en el medio enriquecido 1\*, como en el que no lo está, 1. En ambos medios, los fosfolípidos son los que sufren mayor incorporación, mientras que la cantidad de radioactividad encontrada en los ácidos grasos libres, lo mismo que en triacilglicéridos, no supera el 3%. Todo esto es válido tanto para ratas inmaduras como adultas.

En las incubaciones con solución de Hank, al compararlas con aquéllas en las que se emplea tampón Tris-fosfato, se observa un incremento en la incorporación de acetato a triacilglicéridos, y este efecto es todavía más acusado en las incubaciones en las que se adiciona NADPH.

Los porcentajes de fosfolípidos son, básicamente, constantes en los cuatro medios de incubación utilizados, por todo esto se elige la solución de Hank como medio de incubación.

La semejanza encontrada en los perfiles de incorporación de acetato radiactivo a las distintas clases de lípidos en la fig. 32 tanto en ratas en período inmaduro como en ratas en estado adulto hace pensar que a estos medios de incubación concretas les falta el entorno hormonal, como el que existe "in vivo" para que alcance la actividad óptima

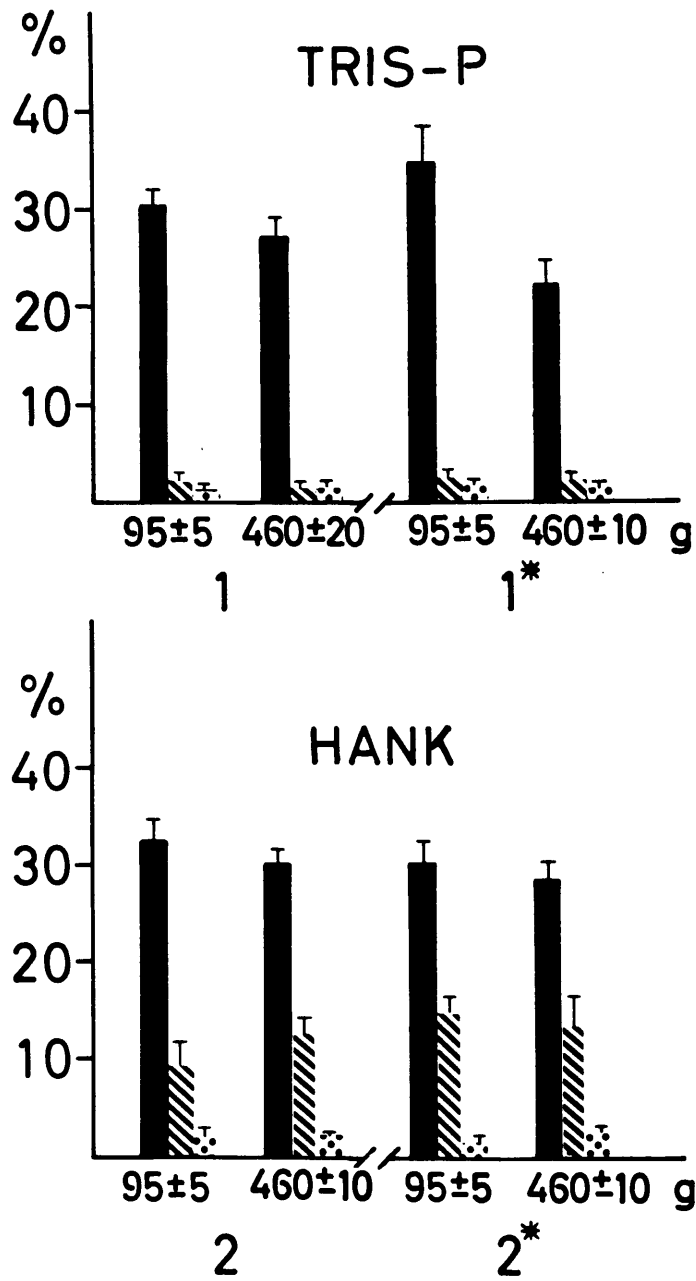


Figura 32.- Incorporación *in vitro* de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a fosfolípidos (barras negras), triacilglicéridos (barras rayadas) y ácidos grasos libres (barras punteadas). La radiactividad se da como un porcentaje del total de lípidos marcados. Las condiciones son las de la tabla X.

(fig. 31). Con todo lo descrito en los apartados 3.1, 3.2 y 3.3, cabe pensar que entre las hormonas mencionadas anteriormente podrían encontrarse los andrógenos.

Previo al estudio con andrógenos vamos a proceder a la optimización del medio de Hank.

#### 3.5.2.2. *Optimización de las condiciones de incubación "in vitro", con tejido troceado*

Una vez escogido el medio de Hank para las incubaciones "in vitro" con tejido troceado, se trataron de encontrar las condiciones óptimas para la síntesis de triacilglicéridos y fosfolípidos, que serán objeto de nuestro estudio posterior, bajo la acción de los andrógenos.

#### *Control del crecimiento bacteriano en el medio de incubación*

Las concentraciones diluidas de glucosa existentes en el medio de incubación elegido, facilitan un crecimiento bacteriano que podría falsear los resultados de la síntesis lipídica. Para determinar el crecimiento bacteriano en el medio se hicieron dos series de incubaciones (a tiempo 0 y 270 min.) con 40 mg de próstata húmeda. A una serie de incubaciones se añade estreptomycin (1 mg/ml) y penicilina (100 U/ml). La otra serie actúa como control. Ninguna de estas dos series contiene precursor radioactivo.

Las colonias bacterianas se contaron a tiempos 0 y 270 min. como se describe en (2.3.3). En presencia de antibióticos se obtuvieron 25 colonias, como máximo, a los 270 minutos, no obteniéndose ninguna a tiempo 0. En cambio, los tubos sin antibióticos dieron un total de 60 y 400 colonias a 0 y 270 minutos, respectivamente.

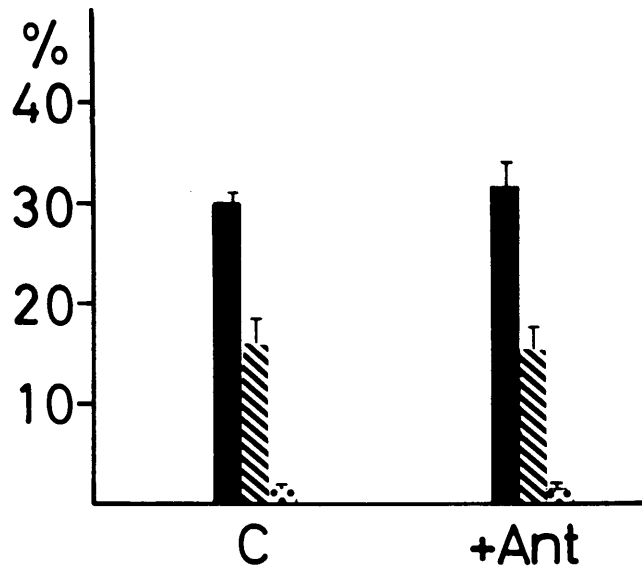


Figura 33.- Influencia de los antibióticos en los porcentajes de incorporación de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a fosfolípidos (barras negras), Triacilglicéridos (barras rayadas) y ácidos grasos libres (barras punteadas) con respecto al total de los lípidos marcados. Incubaciones *in vitro* con 40 mg de próstata de rata adulta en ml de solución de Hank con  $2\mu\text{Ci}$  de Acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) como precursor radiactivo. (C) control; (+ Ant) control más 1 mg/ml de estreptomomicina y 100 U/ml de penicilina.

En consecuencia, y puesto que los antibióticos pueden afectar de alguna manera a las células de eucariotas, se realizaron nuevas incubaciones en presencia de precursor radiactivo. Se trata de ver ahora las diferencias entre incubaciones con y sin antibióticos, así como el efecto de éstos en la síntesis de las distintas clases de lípidos.

Con próstatas de ratas adultas ( $350 \pm 5$  g), se obtuvo una incorporación a lípidos totales de  $1841 \pm 150$  cpm/mg, en ausencia de antibióticos, y de  $2711 \pm 181$  cpm/mg en su presencia. Esto parece indicar que la estreptomicina y penicilina en el medio activan la síntesis lipídica, si bien no parecen tener influencia en la incorporación a las distintas clases de lípidos, como se observa en la figura 33. Ya que el número de colonias no parece ser excesivo, se ha suprimido el empleo de antibióticos, evitándose así los posibles efectos secundarios de éstos sobre el funcionamiento normal de la próstata.

#### *Influencia de la presencia de $Ca^{2+}$ en el medio de incubación*

Algunos autores añaden  $CaCl_2$  al medio de incubación de Hank, (descrito en 2.3.2), con el fin de crear una concentración de ión calcio, suficiente para el funcionamiento de un número de enzimas. Dado que algunas de ellas intervienen en el metabolismo lipídico, como por ejemplo lipasas y proteasas, parece conveniente estudiar la influencia del ión calcio en este sistema.

Las incubaciones en ausencia y presencia de ión  $Ca^{2+}$  (1 mM) se realizan durante una hora con próstatas de ratas adultas ( $325 \pm 5$  g). La incorporación a lípidos totales de acetato ( $1-^{14}C$ ) fue de  $515 \pm 81$  cpm/mg con  $Ca^{2+}$ , y de  $726 \pm 87$  cpm/mg, sin calcio. Ello parece indicar que, efectivamente, el calcio pudiera activar las lipasas o las

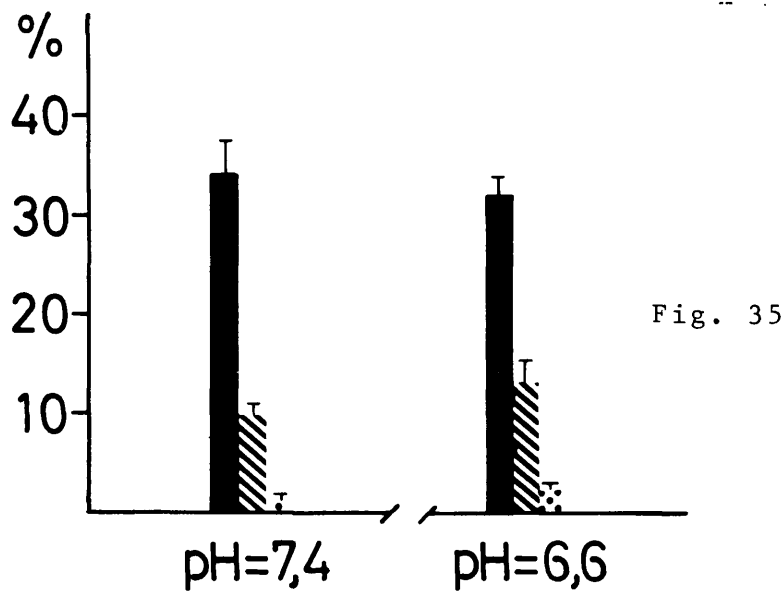


Fig. 35

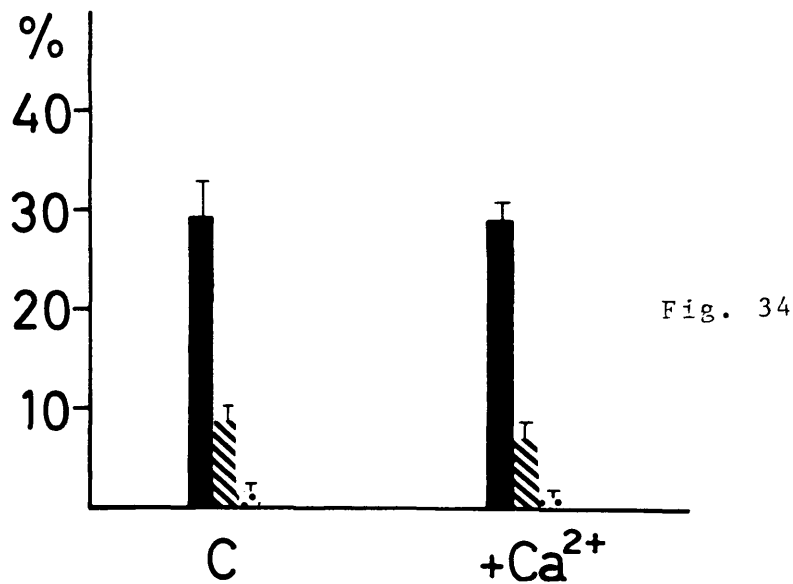


Fig. 34

Figura 34.- Influencia del ion calcio en la incorporación de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a fosfolípidos, triacilglicéridos y ácidos grasos libres (% del total de lípidos marcados). (C) control; (+  $\text{Ca}^{2+}$ ) control +  $\text{CaCl}_2$  (1 mM). Condiciones como en fig. 33.

Figura 35.- Influencia del pH en la incorporación de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a fosfolípidos, triacilglicéridos y ácidos grasos libres (% del total de lípidos marcados). (pH = 6,6) solución de Hank; (pH = 7,4) solución balanceada de Hank. Condiciones como en fig. 33.

proteasas en general, pues se obtiene menos incorporación con calcio que sin él. Sin embargo, la diferencia entre clases de lípidos no es significativa, como se observa en la fig. 34. Por lo tanto, se va a utilizar en adelante el medio de Hank sin calcio, ya que se obtiene una mayor incorporación a lípidos totales, simplificándose además la preparación del medio debido a la baja estabilidad de las soluciones de  $\text{CaCl}_2$ . Por otro lado se sabe que la enzima 5- $\alpha$ -reductasa nuclear, procedente de próstatas humanas hiperplásicas es inhibida por el ion  $\text{Ca}^{2+}$  a concentraciones 2 mM (Hudson, 1981).

#### *Influencia del pH*

El medio de Hank (2.2.3) tiene un pH de 6'6, y puede ser llevado a pH 7'4 con  $\text{NaHCO}_3$ , obteniéndose así la solución balanceada de Hank. Para observar el efecto de estos dos pH en la incorporación de acetato ( $1\text{-}^{14}\text{C}$ ) a lípidos totales, y los porcentajes de distribución de la radiactividad en las distintas clases de lípidos, se llevaron a cabo incubaciones a pH 6'6 y 7'4 con próstatas de ratas de  $270 \pm 10$  g de peso, obteniéndose  $1091 \pm 101$  y  $938 \pm 20$  cpm incorporadas a lípidos totales por mg de próstata húmeda, respectivamente.

Los diagramas de distribución de radiactividad en las distintas clases de lípidos se muestran en la figura 35, para los dos pH, y son básicamente idénticos, aunque con un incremento de los triacilglicéridos a pH 6'6.

El pH de la próstata ventral de rata, se ha medido en un homogenizado de próstata de ratas de  $250 \pm 20$  g de peso en agua destilada con una relación peso/volumen de 1:3, y el pH obtenido ha sido de 6'8.

La preparación de Hank a pH 6'6 es más sencilla y rápida, como conviene para impedir el crecimiento bacteriano; por este motivo, así como por el valor del pH en la próstata ventral de rata, se ha decidido utilizar la solución de Hank a pH 6'6. En las incubaciones realizadas a este pH se ha controlado el pH final de la reacción al cabo de una hora, así como en incubaciones de mayor duración, comprobándose se que no varía.

*Influencia del tiempo de incubación y de la oxigenación en la síntesis de lípidos en próstata ventral de rata.*

En las incubaciones "in vitro" con tejido troceado es habitual que se enriquezca el medio con una mezcla de O<sub>2</sub> al 95% y CO<sub>2</sub> al 5% para asegurar la respiración celular y la supervivencia del tejido. Este factor, junto con el tiempo que dura la incubación del tejido, han sido controlados simultáneamente en un experimento realizado con próstata de ratas de 335 ± 35 g, en presencia de acetato (1-<sup>14</sup>C) y en un intervalo de tiempo que va desde 0 hasta 270 minutos. Para cada tiempo de experimentación se realizan dos grupos de incubaciones, uno con oxigenación, y otro sin ella, en un medio de Hank.

Los resultados de la incorporación a lípidos totales en función del tiempo pueden verse en la figura 36. Obsérvese que, a todos los tiempos estudiados, los medios gaseados con oxígeno presentan una mayor incorporación a lípidos totales. En estas curvas con oxígeno y sin él se observa un gran aumento de la incorporación radiactiva a medida que aumenta el tiempo de incubación, y los perfiles de ambas curvas son semejantes, llegándose a máximos de incorporación a tiempos similares en ambas curvas.

Esta diferencia cuantitativa no tiene repercusión cualitativa, pues la incorporación de acetato (1-<sup>14</sup>C) a las di

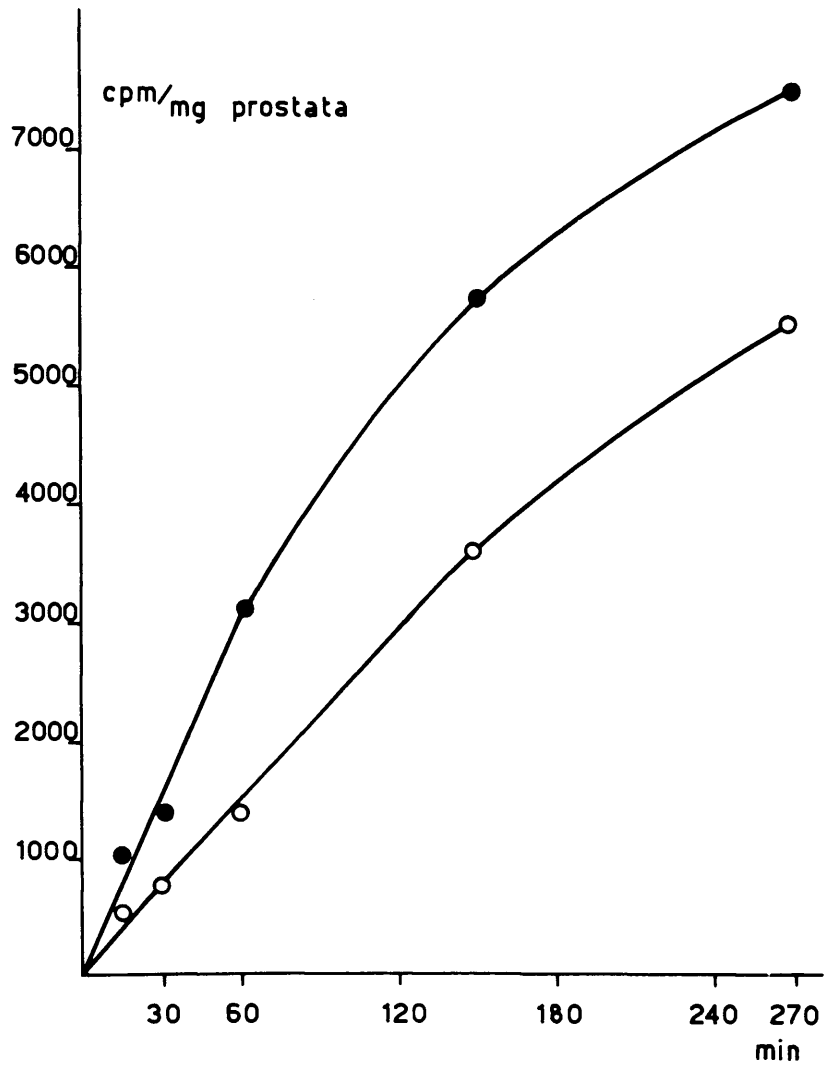


Figura 36.- Influencia del tiempo de incubación en la incorporación de Acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a lípidos totales, con (●) y sin oxigenación (○) adicional del medio. Resultados expresados como cpm/mg de próstata húmeda. Condiciones como en fig. 33.

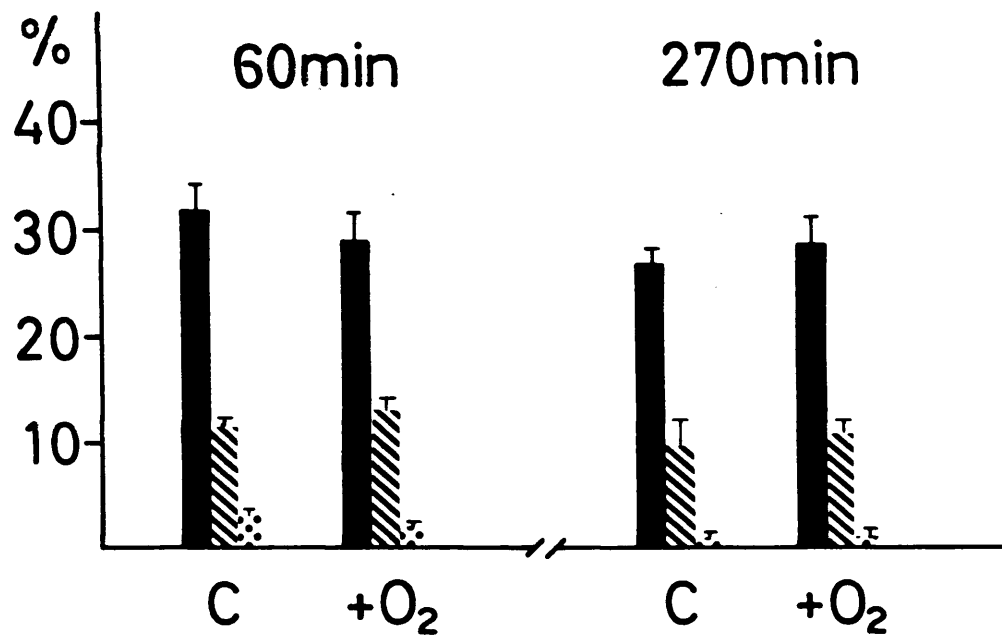


Figura 37.- Influencia del tiempo de incubación en la incorporación de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a fosfolípidos, triacilglicéridos y ácidos grasos libres (% del total de lípidos marcados). (C) control; (+O<sub>2</sub>) control más oxigenación adicional del medio. Condiciones como en fig. 33.

ferentes clases de lípidos (figura 37) son similares, ya sea con oxigenación o sin ella, escogiéndose para este estudio, de entre todos los tiempos de incubación, dos suficientemente distintos, como son 60 y 270 min.

Estos resultados indican que, en ambos medios, el te jido es activo, si bien la oxigenación adicional favorece la respiración y el metabolismo celular. Dado que, en ambas series de incubaciones, hay suficiente oxígeno, ya que se han realizado con 40 mg de próstata en 2 ml de medio, en tubos B-29 de 60 ml de capacidad, con agitación continua, y que no existen diferencias cualitativas, no se va a gasear el medio, salvo en los casos en los que se necesite un mayor rendimiento, como se especificarán oportunamente.

*Influencia de la cantidad de próstata troceada en la incorporación de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a lípidos totales.*

Otro factor a controlar es la cantidad de próstata húmeda en el medio de incubación. Para ello se realizaron unos experimentos con 2  $\mu\text{Ci}$  de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) en 2 ml de Hank con oxigenación, incubándose durante una hora, y con cantidades de próstata troceada que van desde 0 hasta 120 mg, procedentes de ratas adultas de  $334 \pm 20$  g. La relación entre las cpm incorporadas a los lípidos totales y la can ti dad de próstata húmeda se da en la figura 38, observándose un tramo lineal, hasta aproximadamente 80 mg de próstata ven tr al, en el cual la incorporación es proporcional a la cantidad de próstata húmeda. Por encima de este peso de pr ós ta ta se satura el sistema y apenas se obtienen aumentos signi fic ati vos en la incorporación a lípidos totales.

Otra relación que se ha calculado es la que existe entre el peso seco y el peso húmedo de la próstata. El peso seco se ha determinado por dos métodos, hasta pesada constan

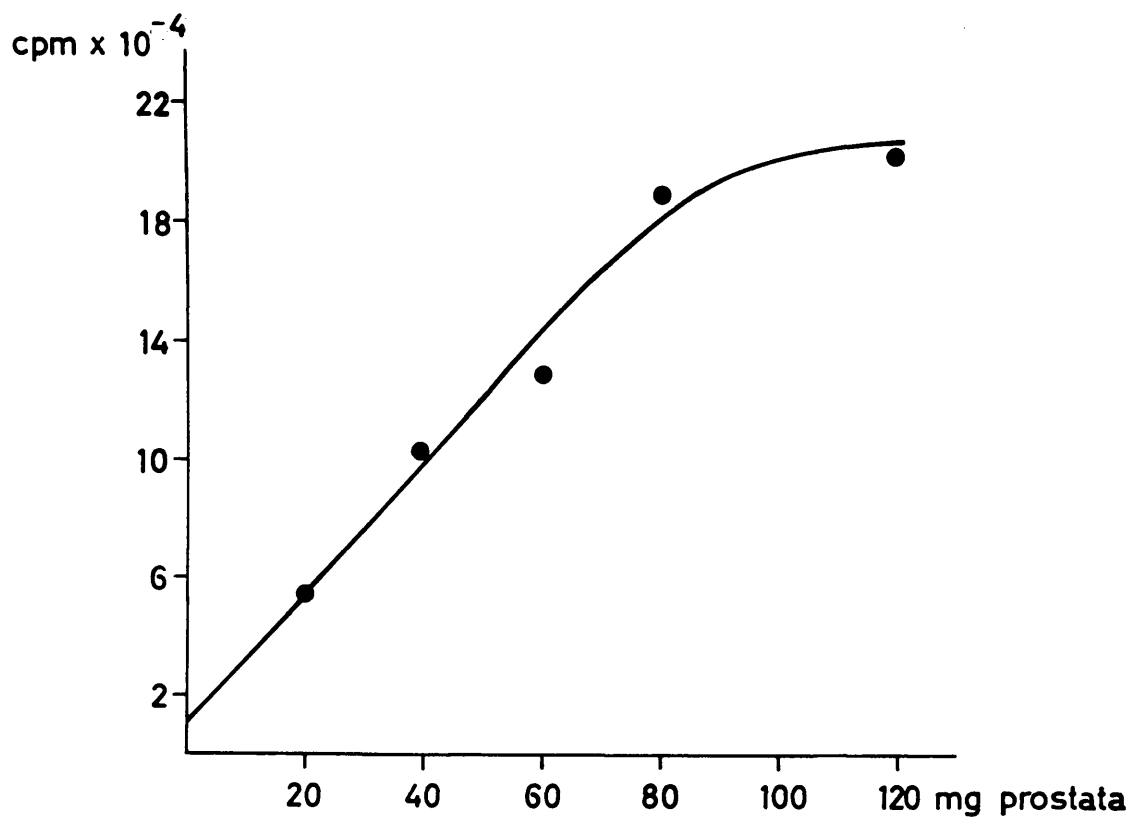


Figura 38.- Influencia de la cantidad de próstata húmeda (mg) en la incorporación de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a lípidos totales (c.p.m.). Condiciones como en la fig. 33.

te a 80°C, y mediante liofilización de próstatas procedentes de ratas de 280 ± 10 g. El peso seco es de 18,2 ± 0'8% del peso húmedo, obteniéndose resultados análogos por los dos métodos, y por lo tanto se dan conjuntamente.

Nosotros hemos elegido 40 mg de próstata en 2 ml, por obtenerse con este peso suficiente incorporación de radiactividad a lípidos totales, por estar dentro de la zona lineal, así como porque la pesada de 40 mg resulta bastante exacta, y porque nos permite realizar un número suficientemente alto de ensayos por próstata.

*Incubación con próstata ventral de rata almacenada a 4°C y a -20°C*

Se tuvo en cuenta la posibilidad de utilizar próstatas congeladas para la biosíntesis de lípidos "in vitro", lo que sería muy cómodo desde el punto de vista experimental.

Las incubaciones realizadas a este fin, tanto en el medio de Hank como en el tampón Tris-fosfato con troceado de próstata congelada, a -20°C unas, y otras que han permanecido 24 horas a 4°C, han dado valores de incorporación de acetato radiactivo a lípidos totales que no superan las 50 cpm/mg de próstata, por tanto, el material a utilizar será siempre el recién extraído del animal, sin haber estado sometido a congelación o almacenamiento a 4°C.

De todos estos apartados se deduce que las condiciones óptimas de incubación son: 40 mg de trozos de próstata en 2 ml de solución de Hank, incubándose durante 1 hora con 2 µCi de acetato (1-<sup>14</sup>C).

### 3.6. ACCION DE ANDROGENOS SOBRE LA BIOSINTESIS DE LIPIDOS EN ESTUDIOS "IN VITRO"

Una vez optimizado un sistema "in vitro" para la incorporación de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a lípidos totales en un troceado de tejido prostático, se procede al estudio de la acción de los andrógenos en próstata empleando este sistema "in vitro". Con tal fin se va a adicionar a nuestro medio de incubación testosterona o dihidrotestosterona. Dado que estas hormonas esteroidicas no son solubles en un medio acuoso, como ya se ha discutido en el apartado 3.4, es necesario probar en primer lugar, una serie de agentes que solubilicen o dispersen la testosterona. De esta forma se permite el equilibrio entre la testosterona unida a la partícula solubilizadora y la testosterona libre, que es en definitiva la que va a entrar en las células diana del tejido prostático para allí ejercer su acción (Farnsworth, 1981). Se han estudiado varias formas de solubilizar la testosterona: 1) disolventes orgánicos, 2) detergentes, 3) otros productos, 4) proteínas. Así mismo debe probarse la cantidad óptima de hormonas.

Los disolventes orgánicos más empleados en la bibliografía son la acetona y el etanol (Bruchovsky y col., 1981). Se ha elegido la acetona, por ser el que admite mayores concentraciones de testosterona antes de llegar a la saturación, y permite utilizar un volumen menor de disolvente. Además, el etanol inhibe la biosíntesis de testosterona "in vitro" Badr y col. 1979; Murono y col. 1980; Eriksson y col. 1983. La adición de 50  $\mu\text{l}$  de acetona a los 2 ml de medio que se incuban en las condiciones optimizadas en (3.5), que se describen en 2.3.2, se dan en la figura 39.

Entre los detergentes no iónicos, se ha ensayado el Tween 20 y el 80. Estudiados por Hata y col. (1982) en la síntesis de lípidos en un sistema libre de células de levadura, y no alteran (Tween 80), o lo hacen muy ligeramente

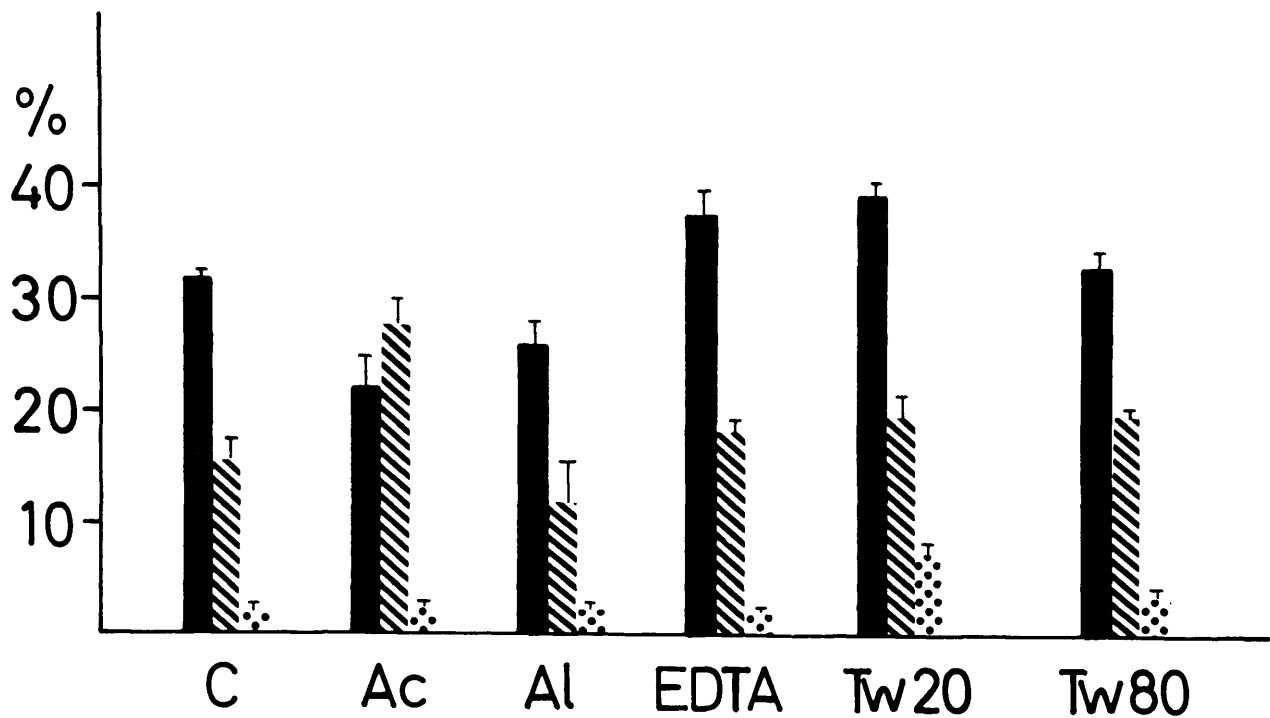


Figura 39.- Efecto de los diferentes medios de dispersión de hormonas esteroídicas. En la incorporación de acetato radiactivo a fosfolípidos (barras negras), triacilglicéridos (barras rayadas) y ácidos grasos libres (barras punteadas). Datos expresados como porcentajes del total de lípidos marcados. (C) control; (AC) control más 300 mM acetona; (Al) control más 5 mg/ml de albúmina; (EDTA) control más 0,05 mM EDTA; (Tw 20) control más 5 mg/ml de Tween 20; (TW 80) control más Tween 80 5 mg/ml. Incubaciones de 40 mg de próstata en 2 ml de Hank durante 60 min.

(Tween 20), los porcentajes de acetato radiactivo incorporado a los distintos lípidos cuando se comparan con el control. Otros autores han utilizado también Tween 80 (Erickson y Nes, 1982) y Tween 20 (Jamdar y col., 1981). Nuestros resultados, al incubar durante una hora estos dos detergentes a las concentraciones indicadas en (2.3.2), se muestran en la figura 39.

En las incubaciones de núcleos con andrógenos para medida de receptores, se añade testosterona sin ningún agente dispersante (Bression y col., 1979). Al comparar estos medios de incubación con los utilizados por nosotros se observa que la única diferencia sustancial es la presencia de EDTA (etilen diamino tetraacetato) en los primeros. En la figura 39 se muestran los efectos del EDTA (0,05 mM), en nuestro medio de incubación enriquecido con  $MgSO_4$  (5 mM), en la incorporación del acetato radiactivo a los distintos lípidos.

Entre las proteínas que participan en el transporte de andrógenos, y concretamente de la testosterona en suero, se encontraría la albúmina. Aunque se ha descrito que la adición de proteínas plasmáticas a un medio sin suero hace decrecer la adsorción de esteroides en cultivo de tejidos, al mismo tiempo que protege la expresión de los efectos morfológicos y bioquímicos de las hormonas, no por ello se ha dejado de ensayar la adición al medio de incubación de 5 mg/ml de albúmina. Los resultados obtenidos en la incorporación de acetato radiactivo a las distintas clases de lípidos se muestran igualmente en la figura 39.

Otra posibilidad de solubilizar esteroides consiste en aprovechar el exudado de proteínas que se produce al incubar durante un tiempo cortes de próstata.

Entre estas proteínas es probable que juegue un papel importante la proteína PBP, que se ha estudiado extensa-

mente en la introducción

Este método, que ha sido utilizado y puesto a punto por Singhal y col. para el estudio de la biosíntesis de colesterol, "in vitro", en próstata ventral de rata, consiste en incubar en medio de Hank, durante treinta minutos la próstata. Después de esta incubación se adiciona directamente al medio testosterona como una dispersión en el medio de Hank, o bien depositándose en el fondo del tubo de incubación disuelta la acetona, que se hace evaporar a continuación, antes de añadir el preparado enzimático.

El conjunto tejido-hormona se incuba durante dos horas para que la hormona realice su acción a nivel de la biosíntesis de proteínas.

Pasado este tiempo se procede a la decantación del medio. El tejido ya está preparado para estudiar la influencia de la hormona sobre la incorporación de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a lípidos. Esto se consigue mediante la adición de nuevo medio con el precursor radiactivo y la correspondiente concentración de hormona.

Los resultados obtenidos por nosotros con este método se muestran en la figura 40.

Como vemos, en estas condiciones, la testosterona no ejerce ninguna acción sobre los triacilglicéridos y fosfolípidos. Es, sin embargo, un buen método para estudiar biosíntesis de colesterol, pues la incorporación de acetato al mismo (fig. 27) aparece muy potenciada por este sistema. Tanto se incrementa la síntesis de colesterol en estos ensayos "in vitro" que se obtienen valores muy alejados de los obtenidos "in vivo" (fig. 40).

Como nuestros trabajos se centran en otros lípidos

distintos del colesterol y, además, en todo momento tratamos de correlacionar y comparar los resultados "in vitro" e "in vivo", rechazamos este método para nuestro propósito.

Es de destacar en la fig. 39 la inversión de los niveles de fosfolípidos y triacilglicéridos observada en las incubaciones con acetona, probablemente alterando la polaridad del medio y produciendo un cambio en el entorno de la mayoría de los sistemas enzimáticos que nos ocupan.

La albúmina, EDTA y Detergentes no modifican de manera apreciable los resultados obtenidos con el control y ya que los detergentes proporcionan soluciones homogéneas de esteroides mientras que con otros medio se obtienen dispersiones, nos ha hecho decidirnos por los detergentes como agentes solubilizantes.

Con el Tween 20 se obtiene una proporción de ácidos grasos libres ligeramente más elevada que con el resto de los disolventes utilizados (fig. 39), incluido el Tween 80, todo esto junto con los resultados de Hata y col., (1982) nos ha hecho decidirnos por el Tween 80 como agente solubilizante de la testosterona en las incubaciones in vitro.

Una vez elegido el Tween 80 como agente dispersante, se ha ensayado la acción de la testosterona y dihidrotestosterona sobre la incorporación del acetato radiactivo a los distintos lípidos en tejido troceado y en presencia de medio de Hank. Se considera como suficiente el tiempo de dos horas para que las hormonas ejerzan su acción (ver en 1.5) y otras dos horas para la incorporación de acetato, siguiendo la metodología de Singhal y Schaffner (1980).

La figura 41 mostrará, para experimentos "in vitro", como afectan distintas concentraciones de testosterona y dihidrotestosterona al porcentaje de radiactividad incorporado en triacilglicéridos y fosfolípidos con respecto al total

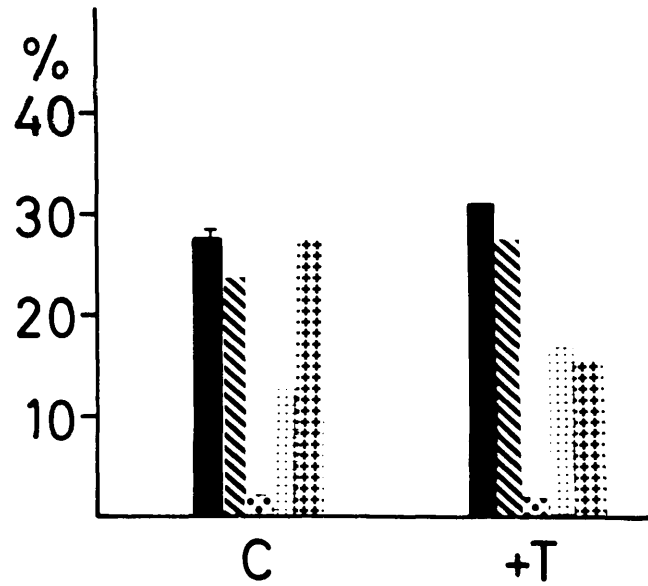


Figura 40. Incubaciones de cuatro horas decantando el medio a las 2 horas y añadiendo nuevo medio. El acetato radiactivo se adiciona a las 2 horas. (C) Control; (+T) control más testosterona (175  $\mu$ M). Las barras de izquierda a derecha son: fosfolípidos, triacilglicéridos, ácidos grasos libres, diacilglicéridos y colesterol.

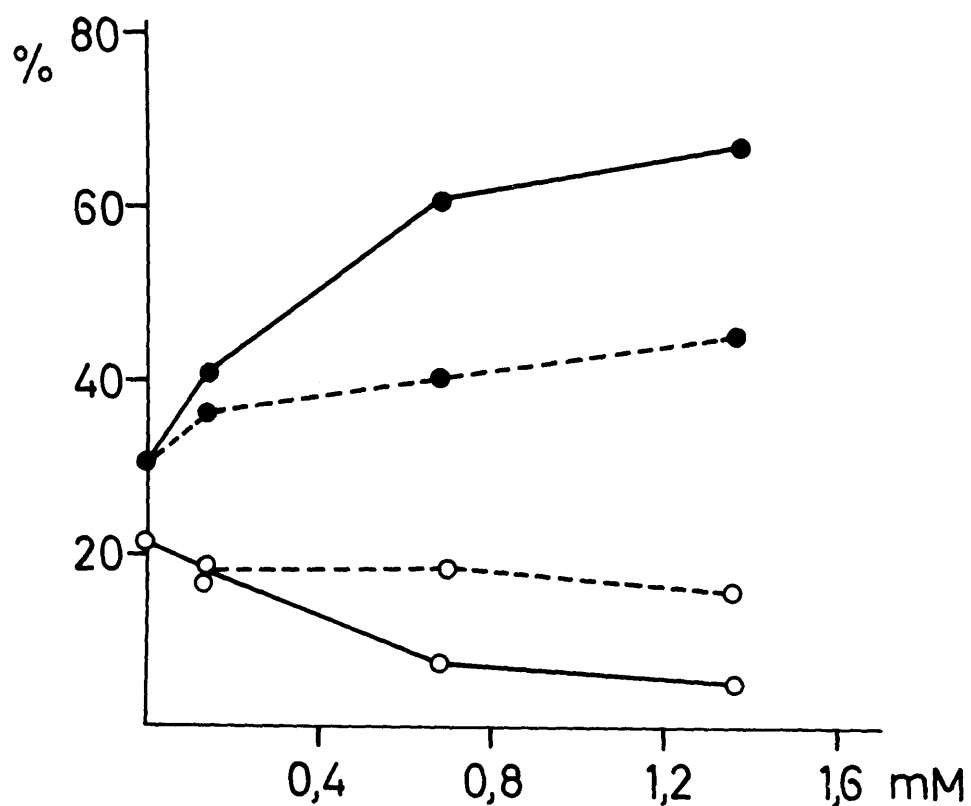


Figura 41.- Influencia de la testosterona (—) y dihidro testosterona (----) en la incorporación de acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) (% del total de lípidos marcados) en fosfolípidos (●) y triacilglicéridos (○). Incubaciones *in vitro* con Tween 80 (5 mg/ml) para solubilizar las distintas concentraciones de hormona. Los tubos se incuban con andrógenos durante dos horas; al finalizar, se decanta el medio y se añaden 2 ml de solución de Hank con la misma cantidad de hormona y el acetato radiactivo incubándose otras dos horas.

de lípidos marcados. Las concentraciones de andrógenos han sido elegidas de acuerdo con los resultados obtenidos "in vitro" por Singhal y Schaffner (1980) y por Farnsworth y Brown (1961) en sus trabajos sobre la incorporación de acetato radiactivo a lípidos totales.

Nuestros resultados sugieren que concentraciones crecientes de testosterona y dihidrotestosterona originan un aumento significativo ( $p < 0'05$ ) en la incorporación de acetato ( $1-^{14}C$ ) en fosfolípidos y un descenso en triacilglicéridos. Estos efectos son más acusados para la testosterona que para la dihidrotestosterona.

Los resultados "in vitro" coinciden cualitativamente con los correspondientes resultados hallados "in vivo" (tabla IX), si bien cuantitativamente las variaciones son más acusadas para el caso "in vitro".

Comparados pues ambos resultados, "in vivo" e "in vitro", se puede concluir que la próstata ventral de rata puede utilizar acetato para la síntesis de ácidos grasos, que son incorporados posteriormente en las diferentes clases de lípidos. Esta incorporación depende de la testosterona y de su metabolito activo en próstata, la dihidrotestosterona. En efecto, ambas hormonas provocan un aumento en la incorporación de acetato en fosfolípidos y un descenso en la incorporación a triacilglicéridos. Estas variaciones se han detectado en ambos experimentos "in vivo" e "in vitro".

Este control hormonal de la incorporación de acetato en clases de lípidos, no puede ser interpretado en función de una acción de los andrógenos sobre la acetil CoA-Sintetasa (E.C. 6.2.1.1.), puesto que la activación del acetato a acetil CoA ocurre rápidamente en próstata de rata y no está bajo control hormonal (William-Ashman and Banks, 1954; Harkonen y col., 1982).

Es más probable que esta influencia hormonal se ejerza, de alguna manera, sobre las rutas de síntesis de fosfolípidos provocando un aumento de la síntesis de estos lípidos estructurales. Esto estaría de acuerdo con los datos de otros autores que han establecido una relación directa entre incremento de andrógenos en plasma y próstata, y el crecimiento prostático (Gloyna and Wilson, 1969; Moger, 1977; Higgins y col., 1981). También concuerda esta hipótesis con el hecho experimental discutido en la introducción, ver 1.6, de que en la pubertad coinciden un aumento de andrógenos circulantes y un acusado crecimiento prostático; recuérdese también que el descenso del peso prostático ocasionado por la castración se invierte al suministrar de manera exógena extas hormonas. En este crecimiento prostático serían siempre necesarios los fosfolípidos como componentes fundamentales de las membranas de las células prostáticas.

Toghrol y col., (1980) han sugerido que los ácidos grasos son la mejor fuente de acetyl CoA para la síntesis de citrato que se acumula y secreta en próstata ventral de rata. En este sentido Barrow y Huggins (1946) han señalado la ausencia de un ciclo de los ácidos tricarboxílicos en próstata ventral de rata, siendo la aconitasa (EC 4.2.1.3) la responsable última de este hecho (Costello y Franklin, 1981). Por otra parte, la acumulación de citrato en esta glándula está bajo control androgénico (Harkonen y col., 1982). Se puede, pues, considerar, de acuerdo con nuestros resultados, una contribución androgénica a la movilización de los triacilglicéridos, para proporcionar los ácidos grasos necesarios en la biosíntesis del citrato.

En resumen, podemos concluir que existe una relación entre incremento de los niveles de andrógenos, como los que tienen lugar durante la pubertad de ratas macho, y el aumento y descenso de la incorporación de acetato en fosfolípidos

y triacilglicéridos respectivamente, durante este período del desarrollo.

#### IV: CONCLUSIONES

1. La curva de ajuste que correlaciona el peso de la próstata con el peso de la rata es una sigmoidea de ecuación  $y = K / (1 + ce^{-ax})$ . Estos pesos están fuertemente correlacionados por ser el coeficiente de correlación muy próximo a 1.
2. A los 7 días de realizada la castración a ratas adultas, los pesos de las próstatas descienden hasta valores homogéneos, perdiéndose la correlación entre el peso de la rata y el peso de la próstata. Existe, sin embargo, una correlación entre la pérdida de peso de la próstata en los 7 días de castración y el peso de la rata.
3. El ácido undecanoico (11:0) no se encuentra presente entre los ácidos grasos que forman parte de los lípidos totales de la próstata. Dado que, éste ácido graso aparece bien resuelto en cromatografía de gases se utiliza como patrón interno en las determinaciones cuantitativas.
4. Los ácidos grasos presentes en lípidos totales en proporciones superiores al 10% son 16:0; 18:1 y 18:2. Entre el 3 y el 10% están: 18:0, 16:1 y 20:4. El resto de los ácidos grasos se encuentran en proporciones inferiores al 3%.
5. El estudio comparado de la distribución de los ácidos grasos en triacilglicéridos y fosfolípidos no muestra variaciones apreciables, salvo para el 20:4 que se encuentra en su mayor parte en fosfolípidos.
6. Los ácidos grasos saturados se encuentran en menor proporción que los insaturados tanto en los lípidos totales, como en los triacilglicéridos y fosfolípidos. En los ácidos grasos libres ocurre lo contrario. Esto sugiere una modificación en el grado de insaturación de los ácidos grasos incorporados a clases de lípidos.

7. Las conclusiones 4, 5 y 6 son válidas tanto para próstatas de rata inmadura como para adultas, pues no se han observado cambios apreciables durante la evolución de la glándula.
8. Se ha realizado un análisis cuantitativo de lípidos totales, triacilglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos libres presentes en próstata ventral de rata. Las cantidades de triacilglicéridos y los fosfolípidos no son constantes con la evolución de la glándula; los primeros presentan valores más altos en ratas inmaduras con respecto a las ratas adultas; a los fosfolípidos les sucede lo contrario, aumenta su contenido con la edad.
9. La próstata de rata incorpora acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) a lípidos en experimentos *in vivo* mediante inyección directa del acetato en la glándula. La incorporación es máxima en la pubertad, para estabilizarse en el periodo adulto.
10. La distribución del acetato radiactivo, en experimentos *in vivo* en las distintas clases de lípidos varía con el desarrollo de la glándula. En próstata ventral de rata inmadura la incorporación se realiza preferentemente a triacilglicéridos, mientras que, en ratas adultas, predomina la incorporación a fosfolípidos. Hay que resaltar la existencia de una zona de cruce en las curvas de incorporación de acetato a triacilglicéridos y fosfolípidos. Este cruce ocurre con la pubertad ~~en las condiciones de cría de nuestras ratas.~~
11. La inyección subcutánea, durante 4 días, de testosterona o de dihidrotestosterona a ratas castradas 7 días antes, provoca un aumento de la incorporación del acetato ( $1-^{14}\text{C}$ ) en fosfolípidos y un descenso en la incorporación a triacilglicéridos, con respecto a los controles a los que se in-

yecta solo aceite de sésamo.

12. En experimentos *in vitro* con sistemas libres de células no se obtiene incorporación apreciable de acetato radiactivo a lípidos, independientemente del medio de reacción y de los inhibidores de proteasas empleados.
13. En experimentos *in vitro* con tejido troceado en medio trisfosfato o solución de Hank, se obtiene una incorporación apreciable de acetato radiactivo a lípidos. Esta incorporación es máxima para ambos medios con próstatas troceadas procedentes de ratas inmaduras, lo que coincide con los resultados obtenidos "*in vivo*".
14. Se ha elegido la solución de Hank como medio más apropiado para las incubaciones *in vitro*, en lugar del medio trisfosfato, por coincidir más exactamente la distribución de la radiactividad en clases de lípidos con la encontrada *in vivo*.
15. La optimización del medio de incubación, para el estudio de la influencia de andrógenos *in vitro*, es:
  - solución de Hank sin calcio ni antibióticos pH 6,6
  - Se gasea (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>) o no el medio según convenga.
  - Se utilizan 40 mg de próstata en 2 ml de medio.
  - Se elige Tween 80 como agente solubilizante de la testosterona y de la dihidrotestosterona.
  - Tiempo total de incubación 4 horas.
  - Temperatura de incubación 37°C.

16. La adición de testosterona ó dihidrotestosterona, en experimentos *in vitro*, estimula la incorporación de acetato a fosfolípidos, y disminuye la correspondiente a triacilglicéridos. Estos resultados son análogos y de mayor proporción a los obtenidos *in vivo*.

## V. BIBLIOGRAFIA

ALCAIDE, A., CARMENA, M.J., LOPEZ-RUIZ, P., PEREZ-ALBARSANZ, M.A. y RECIO, M.M.

Estudios estructurales en próstata ventral de rata.  
I. Colesterol libre y esterificado. XVIII Reunión Bie  
nal de Física y Química, Com. 28.9. 1980.

ANDERSON, D.C.

Sex-hormone-binding globulin. Clin. Endocrinal. 3:69-  
73, 1974.

ARVOLA, I.

The hormonal control of the amounts of the tissue com-  
ponents of the prostate. A histoquantitative investiga-  
tion performed on rats. Ann. Chir. Gynaecol Genniae  
(Suppl.) 102, 3-120, 1961.

AUMULLER, G.

Prostate gland and seminal vesicles. En Handbuch der  
mikroskopischen Anatomie des Menschen. Bd. 7, T.6,  
Vol. VII Springer-Verlag, Berlin, 380 pp. 1979.

Morphologic and Endocrine Aspects of Prostatic function.  
The Prostate 4, 195-214, 1983.

AUMULLER, G., SLITZ, J., HEYNS, W. y FLICKINGER, C.S.

Intracellular localization of prostatic binding protein  
(PBP) in rat prostate by light and electron microscopic  
immunocytochemistry. Histochemistry 76, 497-516, 1982.

BADR, F.M., SMITH, M.S., DALTERIO, S.L. y BARTKE, A.

Role of Pituitari and the adrenals in mediating the  
effects of alcohol on testicular steroidogenesis in  
mince. Steroids 34, 477-482, 1979.

BARRON, E.S.G. y HUGGINS

The metabolism of the prostate: Transamination and citric acid. J. UROL. 55, 385-396, 1946.

BELL, R.M., y COLEMAN, R.A.

Enzymes of glycerolipid Synthesis in Eukariotes. Ann. Rev. Biochem. 49, 459-487, 1980.

BELL, R.M., BALLAS, L.M. y COLEMAN, R.A.

Lipid Topogenesis. J. Lipid Res. 22, 391-403, 1981.

BERNERT, J.T.Jr. y SPRECHER, H.

Studies to determine the vole rates of chain elargation and desaturation play in regulating the unsaturated fatty acid composition of rat liver lipids. Biochim, Biophys. Acta, 398, 354-363, 1975.

BLIGH, E.G. y DYER, W.J.

A rapid method of total lipids extraction and purification. Can. J. Biochem, Physiol. 37, 911-917, 1959.

BLOCH, K., VANCE, D.

Central mecanisms in Synthesis of Saturated Fatty Acids. Ann. Rev. Biochem 46; 263-298, 1977.

BLONDEAU, J.P., CORPECHOT, C., Le GOASCOGNE, C., BAULIEU, E.E. y ROBEL, P.

Androgen receptors in the rat ventral prostate and their hormonal control. Vitam. Horm. 33, 319-344, 1975.

BLONDEAU, J.P., BAULIEU, E.E. y ROBEL, P.

Androgen-Dependnt Regulation of Androgen nuclear Receptor in the Rat Ventral Prostate. Endocrinology 110, 1926-1933, 1982.

BOESEL, R.W., KLIPPER, R.W. y SHAIN, S.A.

Androgen regulation of androgen receptor content and distribution in the ventral and dorsolateral Prostates of aging AxC Rats. *Steroids*, 35, 157-177, 1980.

BOONE, S.C. y WAKIL, S.J.

In Vitro Synthesis of lignoceric and Nervonic Acids in Mammalian Liver and Brain. *Biochemistry* 9, 1470-1479, 1970.

BOONSEENG, V. y TECHA-UDOMTAWORN

Prostatic Origen of Piruvate Kinase activity in human Seminal Plasma. *Andrologia* 12, 559-564, 1980.

BOURRE, J.M., POLLET, S., CHAIX, G., DAUDU, O. y BAUMANN, N.

Etude "in vitro" des acides gras synthetisés dans les microsomes des cerveaux de souris normales et guaking. *Biochimie* 55; 1473-1479, 1973.

BRANDES, D.

The fine structure and histochemistry of prostatic gland in relation to sex hormones. *Int. Rev. Cytol.* 20, 207-276, 1966.

Fine structure and cytochemistry of male sex accessory organs. In: *Male Accessory sex Organs Structure and functions in Manuals*. D. Brandes, ed. Academic Press, New York, pp. 17-117, 1974.

BRAUNSTEIN, H.

Staining lipid in carcinoma of the prostate gland. *Am. J. Clin. Pathol.* 41, 44-48, 1964.

BREMER, J. y GREENBERG, D.M.

Methyltransferring enzyme system of microsomes in the Biosynthesis of lecithin (Phosphatidylcholine).

Biochim. Biophys. Acta 46, 205-216, 1961.

BRESSION, D., SNOCHOWSKI, M., BELANGER, A., POUSETTE, A., EKMAN, P., HOGBERG, B. y GUSTAFSSON

Cyclic uptake of steroids in cells and cell nuclei from prostate, Liver and Pituitary. Febs Letters, 103, 2, 355-361, 1979.

BROPHY, P.J., van den BESSELAAR, A.M.H.P. y WITZ, K.W.A.

Phospholipid-exchange proteins for the topological distribution of microsomal phospholipids. Biochem. Soc. Trans. 6, 280-281, 1978.

BROCKERHOFF, H., HOYLE, R.J. y HWANG, P.C.

Incorporation of fatty acids of marine origin into triglycerides and phospholipids of mammals. Biochim, Biophys, Acta 144, 541-549, 1967.

BRUCHOVSKY, N., LESSER, B. van DOOM, E. y CRAVEN, S.

Hormonal effects on cell proliferation in rat prostate. Vit. Horm. 33, 61-102, 1975.

BRUCHOVSKY, N., McLOUGHLIN, M.G., NENNIE, P.S. y TO, M.P.

Partial characterization of Stromal and Epithelial forms of  $5\alpha$ -Reductasa in human prostate en The Prostatic cell: Structure and function. Part A. (G.P. Murphy: A. A. Sandberg y J.P. Karr ed.). Alan R. Liss, New York, pp. 161-175, 1981.

CALLWAY, T.W., BRUCHOVSKY, N., RENNIE, P.S. y COMEAU, T.

Mechanisms of action of adrogen and Antiandrogens: effects of antiandrogens on translocation of cytoplasmic androgen receptor and nuclear abundance of dihydrotestosterone. Prostate 3, 599-610, 1982.

CAMPBELL, T.M., HAGOPIAN, M. y ROSENKRANTZ, H.

Lipid patherns in canine prostatic fluid and serum.  
Invest. Urol. 4, 257-261, 1966.

CARLSTEDT-DUKE, J., OKRET, S., WRANGE, O. y GUSTAFSSON, J.A.

Immunochemical analysis of the glucocortioid receptor:  
Identification of a third domain separate from the  
steroid-binding and DNA-binding domains. Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA, 79, 4260-4264, 1982.

CASTRO, I., MUNICIO, A.M., ODRIOZOLA, J.M., PEREZ-ALBARSANZ,  
M.A. y RAMOS, J.A.

In vitro regulation of enzymes of the fatty acid  
Synthesis in liver from adult and fetal vabbits.  
Int. J. Biochem. 5, 561-567, 1974.

CAVANAUGH, A.H., FARNSWORTH, W.E., GREIZERSTAIN, H.B. y  
WOJTOWICZ, C.

The influence of testosterone and lactogen on synthe-  
sis and metabolism of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  by the human  
prostate. Life Sci. 26, 29-34, 1980.

CHAISIRI, N. y PIERREPOINT, D.G.

Demostration of differences in receptor site concen-  
tration for oestogens in separated epithelial and  
stromal fractions of the canine prostate. J. Endocr.  
81, 147-152, 1979.

CHAN, S.W.C., LEATHEN, J.H. y ESASHI, T.

Testicular Metabolism and serum Testosterone in aging  
Male Rats. Endocrinology, 101, 128-133, 1977.

CHEN, C., SCHILLING, K., HIIPAKKA, R.A., HUANG, I.Y. y  
LIAO, S.

Prostate  $\alpha$ -Protein. Isolation and characterization  
of the Polypeptide components and cholesterol Binding.  
J. Biol. Chem. 257, 116-121, 1982.

CHRISTIE, W.W., NOBLE, R.C. y MOORE, J.R.

Determination of lipid classes by a Gas-chromatographic Procedure. *Analyst* 95, 940-944, 1970.

COLEMAN, R.A. y BELL, R.M.

Phospholipid Synthesis in Isolated fat Cells. Studies of microsomal Diacylglycerol choline-phosphotransferase and diacylglycerol Ethanolaminephosphotransferase activities. *J. Biol. Chem.* 252, 3050-3056, 1977.

COOK, H.W. y SPENCE, M.W.

Biosynthesis of Fatty acids in vitro by homogenate of developing rat Brain: Desaturation and CHAIN-Elongation. *Biochim. Biophys. Acta.* 369, 129-141, 1974.

CORPECHOT, C., EYCHENNE, B. y ROBEL, P.

Simultaneous radioimmunoassay of testosterone, dihydrotestosterone,  $5\alpha$ -androstene- $3\alpha$ ,  $17\beta$ -diol and  $5\alpha$ -androstane- $3\beta$ ,  $17\beta$ -diol in the plasma of adult male rats. *Steroids* 29, 503-516, 1977.

CORPECHOT, C., BAULIEU, E.E. y ROBEL, P.

Testosterone, dihydrotestosterone and androstanediol in plasma, Testes and Prostates of rats during Development. *Acta Endocrinologica*, 96, 127-136, 1981.

COSTELLO, L.C., FRANKLIN, R.B. y STRANCEY, R.

Mitochondria isocitrate dehydrogenase and isocituate oxidation of rat ventral prostate. *Enzyme* 21, 495-506, 1976.

COSTELLO, L.C., FADIKA, G. y FRANKLIN, R.B.

Citrate and isocitrate utilization by rat ventral prostate mitochondria. *Enzyme* 23, 176-181, 1978 a).

COSTELLO, L.C., LITTLETON, G.K. y FRANKLIN, R.B.

Regulation of citrate related metabolism in normal and neoplastic prostate, en: Endocrine Castrol of Noplasia. Ed. R.K. Sharma y W.E. Criss, New York, Raven Press, pp. 303-314, 1978 b).

COSTELLO, L.C. y FRANKLIN, R.B.

Aconitase Activity, citrate oxidation and zinc inhibition in RAT ventral prostate. Enzyme 26, 281-287, 1981.

CUNHA, G.R. y LUNG, B.

The importance of strome in morphogenesis and functional activity of urogenital epithelium. In Vitro 15, 50-71, 1979.

CUNHA, G.R., FUJII, N., NEUBAUER, B.L., SHANNON, J.M. y REESE, B.A.

Stromal influence on expression of morphological and functional characteristics of urogenital epithelia. En: Kogan, S.J. y Hafez E.S.E. (eds.). Pediatric Andrology, 21-36. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague 1981.

DEKLERK, D.P. y COFFEY, D.S.

Quantitative determination of prostatic epithelial and stromal hyperplasia by a new technique biomorphometrics. Invest. Urol. 16, 240-245, 1978.

DEKLERK, D.P. y SCOTT, W.W.

Prostatic aldevelopment intro prune belly syndrome: a defect in prostatic stromal-epithelial interaction. Journal of Urology 120, 341-344, 1978.

DEVAUX, P. y McCONNELL, H.M.

Lateral diffusion in spin-labeled phosphatidylcolina multilayers. J. Am. Chem. Soc. 94, 4475-4481, 1972.

DIDIO, L.J.A.

Correlative light and electron microscopy of the normal prostatic ventral lobe in rats. Anat. Anz. Bd., 128: 170-190, 1971.

DIEZEL, W., BOHNE, H.J., NISSLER, K., FREYER, R., HEILMANN, W., KOPPERSCHLAGER, G. y HOFMANN, E.

A New Purification Procedure for Yeast phosphofructokinase Minimizing Proteolytic Degradation: Aspects of Subunit composition and other Properties of the Enzyme Eur. J. Biochem 38, 479-488, 1973.

DOEG, K.A.

Control of mitochondrial lipid biosynthesis by testosterone in male sex accesory gland Tissue and liver of castrate rats. Endocrinology 82, 535-539, 1968.

DOUGHERTY, J.J., PURI, R.K. y TOFT, D.O.

Phosphorylation in Vivo of Chicken Oviduct Progesterone Receptor. J. Biol. Chem. 257, 14226-14232, 1982.

DUAX, W.L., GRIFFIN, J.F., ROHRER, D.C., SWENSON, D.C. y WEEKS, C.M.

Molecular details of receptor binding and hormonal action of steroids derived from x-ray crystallographic investigations. J. Steroid Biochem. 15, 41-49, 1981.

EBRIGHT, R.H. y WONG, J.R.

Mechanism for transcriptional action of cyclic AMP in Escherichia coli: Entry into DNA to disrupt DNA secondary structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4011-4015, 1981.

EDELMAN, I.S.

Mechanism of action of steroid hormones. J. Steroid, Biochemistry 6, 147-159, 1974.

EDWARDS, W.D., BATES, P.R. y YUSPA, S.H.

Organ culture of rodent prostate. Effects of polyamines and testosterone. Invest. Urol. 14, 1-5, 1976.

EHRlichMAN, R.J., ISAACS, J.T. y COFFEY, D.S.

Differences in the effects of Estradiol on Dihydrotestosterone Induced Prostatic Growth of the Castra te Dog and Rat. Investigative Urology 18, 466-471, 1981.

EIK-NES, K.B.

Synthesis and secretion of androstenedione and testosterone, en: The Androgens of the Testis, K.B., Eik-Nes (ed.), New York, Dekker, pp. 1-47, 1970.

ENDO, K., KELMKAMP, G.M. y BLOCH, K.

Made of inhibition of  $\beta$ -Hydroxy decanoyl Thioester Dehydrase by 3-becynoyl-N-acetylcysteamine. J. Biol. Chem., 245, 4293-4296, 1970.

ERICKSON, K.A. y NEST, N.R.

Inhibition of hepatic cholesterol synthesis in mice by steroids with shortened and stereochemically varied side chains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 4873-4877, 1982.

ERIKSSON, C.J.P., NIDENIUS, T.V., YLIKAHRI, R.H.

HARKONEN, M. y LEINONEN, P.

Inhibition of testosterone biosynthesis by ethanol. Biochem. J. 210, 29-36, 1983.

FAHEY, P.F., KOPPEL, D.F., BARAK, L.S., WOLF, E.L., ELSON, E.L. y WEBB, W.W.

Lateral diffusion in planar lipid bilayers. *Science* 195, 305-306, 1977.

FAIR, W., CARDONNIER, J.

The pH of prostatic fluid: A reappraisal and therapeutic implications. *J. Urol.* 120: 695-698, 1978.

FAIR, W.R. y PARRISH, R.F.

Antibacterial substances in Prostatic Fluid *The Prostatic cell: Structure and Function*, part A. (ed.: Murphy, G.P., Sandberg, A.A., Karr, J.P.) Alan R. Liss, New York, pp. 247-264, 1981.

FAIR, W.R. y WEHNER, N.

The antibacterial action of canine prostatic fluid and human seminal plasma in an agar diffusion assay system. *Invest. Urol.* 10: 262-265, 1973.

FAIR, W.R., CRANE, D.D., SCHILLER, N., y HESTON, W.D.

A reappraisal of treatment in chronic bacterial prostatitis. *J. Urol.* 121, 437-441, 1979.

FANG, S. y LIAO, S.

Androgen receptors: Steroid and specific retention of  $17\beta$ -hydroxy- $5\alpha$ -androstane-3-one-protein complex by cell nuclei of ventral prostate. *J. Biol. Chem.* 246, 16-24, 1971.

FARNSWORTH, W.R.

A Proposed Physiological Role of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  in Prostatic function. *The Prostatic cell: Structure and Function*. Part A. (Murphy, Sandberg, Karr, ed.) Alan R. Liss, New York, pp. 225-230, 1981.

FARNSWORTH, W.E. y BROWN, J.R.

Androgen on prostate Biosynthetic Reactions. Endocrinology 68, 978-986, 1961.

FELDMAN, S.C. y BLOCH, E.

Development Pattern of testosterone Synthesis by fetal Rat Testes in Response to Luteinizing Hormone. Endocrinology 102, 999-1007, 1978.

FRANKLIN, R.B. y COSTELLO, L.C.

Isocitrate uptake and citrate production by rat ventral prostate fragments. Invest. Urol. 16, 44-47, 1978.

FRANKLIN, R.B., COSTELLO, L.C. y LITTLETON, G.K.

Citrate uptake and oxidation by fragments of rat ventral prostate. Enzyme, 22, 45-51, 1977.

FRANKLIN, R.B., BRANDLY, R.L. y COSTELLO, L.C.

Mitochondrial aspartate aminotransferase and the effect of Testosterone on citrate production in rat ventral prostate. J. Urol. 127, 798-802, 1982.

FORSGREN, B., BJORLE, P., CARLSTROM, K., GUSTAFFSON, J.,  
POUSETTE, A. y HOGBERG, B.

Purification and distribution of a major protein in rat prostate that binds estramustine, a nitrogen mustard derivative of estrodiol-17 $\beta$ . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 3149-3153, 1979.

FURBRINGER, P.

Untersuchungen uber die herkunft und klinischebedeutung der sogen. Spermakrystalle nebst bemerkungen uber die componenten des menschlichen samens und die prostatorrhoe. Ztschr. Klin. Med. 3, 287-316, 1881.

GHANADIAN, R., LEWIS, J.G. y CHISHOLM, G.D.

Serum testosterone and dihidrotestosterone changers with age in rat. Steroids 25, 753-762, 1975.

GINSBURG, M., JUNG-TESTAS, I. y BAULIEU, E.E.

Specific high affinity oestradiol binding in rat ventral prostate. J. Endocr. 87: 285-292, 1980.

GIORGI, E.P.

The Transport of Steroid Hormones into Animal cells. International Review of Cytology, 65, 49-115, 1980.

GLOYNA, R.E. y WILSON, J.D.

A comparative study of the conversion of testosterone to  $17\beta$ -hydroxy- $5\alpha$ -androstan-3-one (dihydrotestosterone) by prostate and epididymis. J. Clin. Endocrinol. Metab. 29, 970-977, 1969.

GOLDBERG, I., SHECHTER, I., BLOCH, K.

Fatty Acyl-Coenzyme A Elongation in Brain of Normal and Quaking Mice. Science, 182, 497-499, 1973.

GOLDSTEIN, N.I.

Cholesterol synthesis in the prostate gland and its relationship to benign prostatic hyperplasia. Ph. D. Dissertation, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, 1975.

GOLDSTONE, A. y KOENIG, H.

Physicochemical modifications of lysosomal hydrolases during intracellular transport. Biochem J. 132, 267-282, 1973.

GORSKI, J. y GANNON, F.

Current models of steroid Hormon action: a critique. Annu. Rev. Physiol. 38, 425-450, 1976.

GOUVELIS, A., BAKER, J.R., ROSENKRANTZ, H.

Prostate and endocrines III. Effect of somatotrophin on the sensitivity of the rat prostate to sex hormone. Investoe Urol. 8: 246, 1971.

GRAY, S.P., BILLINGS, J. y BLACKLOCK, N.J.

Distribution of immunoglobulins G, A y M in prostatic fluid of patients with prostatitis. Clin Cam Acta 57: 163-168, 1974.

GREEN, E.C.

The Anatomy of the rat. Ed. Hafner Publishing Company New York-London p. 103, 1968.

GUCHHAIT, R.B., PUTZ, G.R. y PORTER, J.W.

Synthesis of larg-chain fatty Acids by Microsomes of Pigeon Liver. Arch. Biochem. Biophys. 117, 541-549, 1966.

GURR, M.I. y JAMES, A.T.

Lipid Biochemistry: An introduction. 2<sup>a</sup> ed., 18, Chapman y Hall. Londres, 1975.

GURR, M.I., ROBINSON, M.P., JAMES, A.T., MORRIS, L.J. y HOWLING, D.

The substrate specificity of desaturases: the conversion of cis-12-octadecenoic acid into acid in different animal and plant species. Biochim. Biophys. Acta 280, 415-421, 1972.

GYORKEY, F., MIN, K.W., HUFF, J.A. y GYORKEY, P.

Zinc and magnesium in human prostate gland: normal, hyperplastic and neoplastic. Cancer. Research. 27, 1348-1350, 1967.

HABIB, F.K., LEE, I.R., STITCH, S.R. y SMITH, P.H.

Androgen levels in the plasma and prostatic tissues of patients with benign hypertrophy and carcinoma of the prostate. J. Endocr. 71, 99-107, 1976.

HAJRA, A.K., JONES, C.L. y DAVIS, P.A.

Studies on the biosynthesis of the O-alkyl bond in glycerol ether lipids. Adv. Exp. Med. Iol. 101: 369-378, 1978.

HARDIE, D.G. y GUY, P.S.

Reversible phosphorylation and Inactivation of Acetyl-CoA Carboxilasa from lactating rat Mammary gland by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase. Eur. J. Biochem, 110, 167-177, 1980.

HARKONEN, P.

Androgenic Control of glycolysis, the pentose cycle and pyruvate dehydrogenase in the rat ventral prostate. J. Steroid, Biochem. 14, 1075-1084, 1981.

HARKONEN, P., ISOTALO, A. y SANTII, R.S.

Studies on the mechanism of testosterone action on glucose metabolism in the rat ventral prostate. J. Steroid Biochem. 6, 1405-1413, 1975.

HARKONEN, P.L., KOSTIAN, M.L. y SANTTI, R.S.

Indirect Androgenic Control of citrate accumulation in Rat Ventral Prostate. Archives of andrology 8, 107-117, 1982.

HARMON, C.K. y NEIDERHISER, D.H.

Lipid Metabolism by the Gall-Bladder. II. The in Vitro conversion of lysophosphatidylcholine to phosphatidylcholine. Biochim. Biophys. Acta 530, 217-226, 1978.

HATA, S., NISHIWO, T., ARIGA, N., KATSUKI, U.

Effects of detergents on sterol synthesis in a cell-free system of yeast. J. Lipid Res 23, 803-810, 1982.

HECHTER, O., YOSHINAGA, F., HALKERSTON, D.K., COHN, C. y DODD, P.

Molecular Bases of some aspects of mental activity . Walaas, O. Academic Press New York p. 291, 1966.

HEYNS, W., De MOOR, P.

Prostatic binding protein. A steroid binding protein secreted by rat prostate. Eur. J. Biochem. 78, 221-230, 1977.

HEYNS, W., PEETERS, B. y MOUS, J.

Influence of androgens on the concentration of prostatic binding protein (PBP) and its mRNA in rat prostate. Biochem. Biophys. Res. Commun, 77, 1492-1499, 1977.

HEYNS, W., VAN DAMME, B. y De MOOR, P.

Secretion of Prostatic Binding Protein by Rat Ventral Prostate: Influence of age and Androgen. *Endocrinology* 103, 1090-1095, 1978.

HIGGINS, S.J., BROOKS, D.E., FULLER, F.M., JACKSON, P.J.  
y SMITH, S.E.

Functional development of sex accesory organs of the male rate. *Biochem, J.* 194, 895-905, 1981.

HILDITCH, T.P. y WILLIAMS, P.N.

The Chemical Constitution of Natural Fats. Fourth Edition, Chapman & Hall, London, England, 1964.

HINSCH, W., SEUBERT, W.

On the Mechanism of Malonyl-CoA-Independent Fatty-Acid Synthesis. Characterization of the Mitochondrial Chain-Elongating System of Rat liver and Pig-Kidney Cortex. *Eur. J. Biochem.* 53, 437-447, 1975.

HINSCH, W., KLAGES, C., SEUBERT, W.

On the Mechanism of Malonil-CoA-Independent Fatty-Acid Synthesis. Different Properties of the Mitochondrial chain elongation and Enoyl-CoA Reductase in variou tissues. *Eur. J. Biochem*, 64, 45-55, 1976.

HOLLANDER, N.

Fatty acid synthesis in the rat ventral Prostate. *Natl. Cancer. Inst. Monograph* No 12, 331, 1963.

HOLUB, B.J.

Differential Utilization of l'-Palmitoyl and l-Stearoyl Homologues of Various Unsaturated 1,2-Diacyl-sn-glycerols for phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine Synthesis in Rat liver Microsomes. *J. Biol. Chem.* 253, 691-696, 1978.

- HOLUB, B.J., MACNAUGHTON, J.A. y PIEKARSKI, J.  
Synthesis of l-Palmitoyl and l-Stearoyl phosphatidylcholines from mixtures of Acyl acceptors via acyl-CoA: l-Acyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine acyltransferase in liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 572, 413-422, 1979.
- HU, A.L., LOOR, R.M., CHAMBERLIN, L. y WANG, T.Y.  
Study of androgen-Binding Cytosol Proteins from Rat Prostate. Purification of Androgen Receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* 185, 134-141, 1978.
- HUDSON, R.W.  
Studies of the nuclear  $5\alpha$ -reductase of human hyperplastic prostatic tissue. *J. Steroid biochemistry* 14, 579-584, 1981.
- HUGGINS, C.  
The physiology of the prostate gland. *Physical Rev.* 25, 281-295, 1945.
- HUNG, S.C., LIANG, T., GLUENSING, L.M. y LIAO, S.  
On the factors affecting de initiation of protein synthesis in the rat ventral prostate: androgens, polyamines and conjugated proteins. *J. Steroid, Biochem* 7, 1001-1004, 1976.
- HUTTUNEN, E., ROMPPANEM, T. HELMINEN, H.J.  
A Histoquantitative Study on the effects of Castration on the Rat Ventral Prostate lobe. *J. Anatomy* 132, 357-371, 1981.

HUTTUNEN, E., ROMPPANEN, T. y HELMINEN, H.J.

Testosterone action on the ventral Prostate lobe of the Castrated Rat as Assessed with a Sterologic Morphometric Method. *Anatomy* 165, 199-209, 1982.

IGARASHI, M. y HOLLANDER, V.P.

Acid phosphatase from rat liver, purification, crystallization and properties. *J. Biol. Chem*, 243, 6084-6089, 1968.

IMPERATO, I., MCGINLEY, J., GUERRERO, L., GAUTIER, T. y PETERSON, R.E.

5 $\alpha$ -Reductase deficiency in man: An inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science* 186: 1213-1215, 1974.

INKPEN, C.A., HARRIS, R.A. y QUACKENBUSCH, F.N.

Differential responses to fasting and subsequent feeding by microsomal systems of rat liver: 6-and 9-desaturation of fatty acids. *J. Lipid. Res.*, 10, 277-287, 1969.

JAMDAR, S.C., OSBORNE, L.J. and ZEIGLER, J.A.

Glycerolipid biosynthesis in rat adipose tissue. *Biochem. J.* 194, 293-298, 1981.

JEFFCOAT, R., BRAUN, P.R., SAFFORD, R. y JAMES, A.T.

Properties of rat Liver Microsomal Stearoil-Coenzyme A Desaturase. *Biochem. J.* 161, 431-437, 1977.

JELESMA, C.L., MORRE, D.J.

Distribution of phospholipid Biosynthesis Enzymes among cell Components of Rat liver. *J. Biol. Chem.* 253: 7960-7971, 1978.

- JESIK, C.J., HOLLAND, J.M. y LEE, C.  
An Anatomic and Histologic Study of the Rat prostate.  
Prostate, 3, 81-90, 1982.
- JONES, C.L., HAJRA, A.K.  
Purification and Properties of acyl CoA: Dihydroxya  
cetone Phosphate acyl Transferase from Liver Mito-  
chondria. Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol. 35, 1724-  
1862, 1976.
- JONES, C.L. y HAJRA, A.K.  
The subcelular Distribution of acyl CoA: Dihydroxya  
cetone Phosphate acyl Transferase in guinea Pig Li-  
ver. Biochem, Biophys. Res, Commum, 76; 1138-1143,  
1977.
- JUNG-TESTAS, I., GROYER, M.T., BRUNER-LORAND, J., HECHTER,  
D., BAULIEU, E.E. y ROBEL, P.  
Androgen and estrogen Receptors in rat ventral pros-  
tate epithelium and Stroma. Endocrinology 109,  
1287-1289, 1981.
- KACHAR, B. y PINTO da SILVA, P.  
Freeze-Fracture Study of Rat Ventral Prostate. The  
columnar Epithelial cell. J. Anatomy, 161, 49-71,  
1981.
- KALER, L.W. y NEAVES, W.B.  
The androgen Status of Aging Male Rats. Endocrinology  
108, 712-719, 1981.
- KANO, H. y OHNO, K.  
Substrate-selectivity of Rat liver microsomal 1,2-dia-  
cylglycerol: CDP choline (etanolamine) choline (etha-  
nolamine) phosphotransferase in utilizing endogenous  
substrates. Biochim. Biophys. Acta, 380, 199-207,  
1975.

KASS, L.R., BROCK, D.J.H. y BLOCH, K.

B-hydroxydecanoil Thioester Dehydrase I. Purification and properties. J. Biol. Chem., 242, 4418-4425, 1967.

KENNEOY, E.P.

Metabolism of lipides. Ann. Rev. Biochem, 26, 119-148, 1957.

KENNEDY, E.P.

Biosynthesis of complex lipids. Fed. Proc. 20, 934-940, 1961.

KISHIMOTO, R., GOMI, T., IZAKE, Y., NAGAI, K. y NAKAGAWA, H.

A novel nuclear protein in rat ventral prostate. Androgen-dependent and age-related change. Biochem. Biophys. acta 718, 165-172, 1982.

KNOBLING, A., SCHIFFMANN, D., SICKINGER, N.D. y SCHWEIZE, E.

Malonyl and Palmitoyl Transferase-less Mutants of the Yeast Fatty-Acid-Synthetase complex. Eur. J. Biochem. 56, 359-367, 1975.

KO, H. y ROGER, M.E.

A submicromolar assay for nonpolar acids in plasma and depot fat. Analist. Biochem, 20, 205-214, 1967.

KOCHAKIAN, C.D.

Free aminoacids of sex organs in the mouse: regulation by androgen. Am. J. Physiol. 228, 1231-1235, 1975.

KORNBERG, A. y PRICER, W.E.Jr.

Enzymatic synthesis of the coenzyme A derivatives of long-chain fatty acids. J. Biol. Chem. 204, 329-343, 1953.

KOSOYA, T., NAGAI, Y., INAJAKI, T. and KAYASHI, M.

"In vivo" effect of androgen and cycloheximide on the RNA synthesis in isolated nucley of rat ventral prostates. J. Biochem. 84, 1519-1528, 1978.

KRIEG, M. y VOIGT, K.O.

In vitro binding and metabolism of androgens in various organs: a comparative study. J. Steroid Biochem. 7, 1005-1012, 1976.

KRIEG, M., KLOTZL, G., KAUFMANN, J. y VOIGT, R.D.

Stroma of human benign prostatic hyperplasia: preferential tissue for androgen metabolism and oestrogen binding. Acta Endocrinol. 96, 422-432, 1981.

KUOSA, A., HARKONEN, P. y SANTTI, R.S.

Studies on the inhibition of testosterone action by cycloheximide: evidence for a protein activator of glucose metabolism in the ventral prostate of the rat. J. Steroid. Biochem, 8, 159-267, 1977.

LABELLE, E.F., HAJRA, A.K.

Purification and Kinetic Properties of Acyl and alkyl Dihydroxyacetone oxidoreductase. J. Biol. Chem. 249: 6936-6944, 1974.

LANDRISCINA, C., GNONI, G.V. y QUAGLIARIELLO, E.

Mechanisms of fatty acid synthesis in rat-Liver microsomes. Biochim. Biophys. Acta, 202, 405-414, 1970.

LANGLEY, K.E. y KENNEDY, E.P.

Energetics of rapid transmembrane movement and of compositional asymmetry of phosphatidylethanolamine in membranes of Bacillus megaterium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 6245-6249, 1979.

LASNITZKI, I. y MIZUNO; T.

Induction of the rat prostate gland by androgens in organ culture. J. Endocr. 74, 47-55, 1977.

LASNITZKI, I., FRANKLIN, H.R. y WILSON, J.D.

The mechanism of androgen uptake and concentration by rat ventral in organ culture. J. Endocrinol. 60, 81-90, 1974.

LEA, D.A., PETRUSZ, P. y FRENCH, F.S.

Prostatein, a mayor secretory protein of the rat ventral prostate. J. Biol. Chem. 254, 6196-6202, 1979.

LEE, V.W.K., KRESTER, D.M., HUDSON, B. y WANG, C.

Variations in serun FSH, LH and testosterone levels in male rats from birt to sexual maturity. J. Reprod. Fertil 42, 121-126, 1975.

LEE, T.C., BAKER, R.C., STEPHENS, N. y SNYDER, F.

Evidence for participation of cytochrome  $b_5$  in microsomal D-6 Desaturation of fatty acids. Biochim. Biophys. Acta, 489, 25-31, 1977.

LEFEBVRE, Y.A. y NOVOSAD, Z.

Binding of androgens to a nuclear envelope fraction from the rat ventral prostate. Biochem. J. 186, 641-647, 1980.

LEVY, B.J., FAIR, W.R.

The location of antibacterial activity in the rat prostatic secretions. Invest. Urol. 11: 173-177, 1973.

LIANG, T. y HEISS, C.E.

Inhibition of 5 $\alpha$ -Reductase, Receptor Binding, and Nuclear Uptake of Androgens in the Prostate by a 4-Methyl-4-aza-steroid. J. Biol. Chem. 256, 7998-8005, 1981.

LIANG, T. y LIAO, S.

Association of the uterine 17 $\beta$ -estradiolreceptor complex with ribonucleoprotein in vivo and in vitro. J. Biol. Chem. 249, 4671-4678, 1974.

LIANG, T. y LIAO, S.

A very rapid effect of androgen on initiation of protein synthesis in prostate. Proc. Nat. Acad. Sci 72, 706-709, 1975.

LIANG, T. TYMOCZKO, J.L., CHAN, K.M.B., HUNG, S.C. y LIAO, S. en Androgens and Antiandrogens ( Martini, L. y Motta, M., eds.) Raven Press, New York. pp. 77-89, 1977.

LIAO, S., LIN, A.H. y TYMOCZKO, J.L.

Adenyl cydase of cell nuclei isolated from rat ventral prostate. Biochim. Biophys. Acta, 230, 535-538, 1971.

LIAO, S., LIANG, T. y TYMOCZKO, J.L.

Ribonucleoprotein binding of steroid-receptor complexes. Nature New. Biol. 241, 211-213, 1973.

LIAO, S., TYMOCZKO, J.L., CASTANEDA, E. y LIANG, T.

Androgen receptors and androgen-dependent initiation of protein synthesis in the prostate. Vitam. Horm. 33, 297-313, 1975.

LIAO, S., ROSSINI, G.P., HIIPAKKA, R.A. y CHEN, C.

Factors that can control the interaction of the androgen-receptor complex with the genomic structure in the rat prostate. En Prespectives in Steroid Receptor Research, Breciani F. (ed.). New York Raven Press. pp. 99-112, 1980a.

LIAO, S., SMYTHE, S., TYMOCZKO, J.L., ROSSINI, G.P., CHEN, C. y HIIPAKKA, R.A.

RNA-dependent release of androgen and other steroid-receptor complexes from DNA. J. Biol. Chem. 245, 5545-5551, 1980b.

LIAO, S., HIIPAKKA, R.A., SCHILLIN, K., OBERHAUSER, A.K., CHANG, C. y JUDGE, S.M.

Cellular Dynamics of androgen Receptor and Protein induction in Rat Ventral Prostate en the Prostatic cell: Structure and function part A. (G.P. Murphy, A.A., Sandberg y J.P. Karr, ed.). Alan R. Liss New York, pp. 381-389, 1981.

LIAO, S., CHEN, C. y HUANG, I.Y.

Prostate  $\alpha$ -Protein, complete aminoacid sequence of the component that inhibits nuclear retention of the androgen-receptor complex. J. Biol. Chem. 257, 122-125, 1982.

LOOR, R. y CHU, T.M.

Comparison of alpha-protein and spermine-binding protein in Rat and human prostate. IRCS Medical Science 10, 105-106, 1982.

LOOR, R.M., CHEN, C. y LIAO, S.

Protein Markers for androgenic activity in rat ventral Prostate. En Clinical and Biochemical Analysis, Vol. II, pp. 351-370, Biochemical Markers for cancer (T.M. Chu, ed.), M. Dekker, N.Y., 1982.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J.

Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193; 265-275, 1951.

LYNEN, F.

Biosynthesis of saturated fatty acids. Fed. Proc. 20, 941-951, 1961.

MAINWARING, W.I.P.

A review of the formation and binding of 5 $\alpha$ -dihydro-testosterona in the mechanism of action of androgens in the prostate of the rat and other species. Reprod Fertil 44, 377-393, 1975.

MANGAN, F.R. y PEGG, A.E.

Mainwaring W.P.; effects of cyclic 3',5'-monophosphate on the function and morphology of the rat prostate gland. Biochem. J. 134, 129-142, 1973.

MANN, T.

The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract. 2nd. edn., pp. 161-192, Methuen, London, 1964.

MARIMOTO, K. y KANO, H.

Acyl Chain length Dependency of Diacylglycerol cholinophosphotransferase and Diacylglycerol Ethanolamine-phosphotransferase. Effect of Different saturated Fatty acids at the C-1 or C-2 position of Diacylglycerol on Solubilized rat livermicrosomal enzymes. J.Biol.Chem. 253,5056-60, 1978.

MARSHALL, M.O. y KNOUSEN, J.

Biosynthesis of triacylglycerols Containing Short-Chain fatty Acids in Lactating cow Mammary Gland. Eur. J. Biochem. 81, 259-266, 1977.

MEIKLE, A.W., COLLIER, E.S., STRINGHAM, J.D., FANG, S.M. y TAYLOR, G.N.

Elevated intranuclear dihydrotestosterone in prostatic hyperplasia of aging Dogs. J. Steroid. Biochem. 14, 331-337, 1981.

MEJIAS, A., MUNICIO, A.M. y PEREZ-ALBARSANZ, M.A.

Biochemistry of development in insects. Triacylglycerol and Phosphoglyceride Biosynthesis by subcellular fractions. Eur. J. Biochem. 72, 9-16, 1977.

MERCURI, O., PELUFFO, R.O. y DE TOMAS, M.E.

Effect of different Diets on the 9-Desaturase activity of Normal and Diabetic Rats. Biochim. Biophys. Acta 369, 264-268, 1974.

METCALFE, L.E. y SCHMITZ, A.A.

The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. Analyst. Chem. 33, 363-364, 1961.

- MIKI, Y., HOSAKA, K., YAMASHITA, S., HANDA, H. y NUMA, S.  
Acyl-Acceptor Specificities of 1-Acylglycerol-phosphate Acyltransferase and 1-Acylglycerophosphorylcholine Acyltransferase Resolved from rat liver Microsomes  
Eur. J. Biochem 81, 433-441, 1977.
- MIYAO, N.  
Male accessory sexual organs and phospholipid in the prostatic secretion and tissue. Acta Urol. Jpn 11, 1197-1202, 1965.
- MOGER, W.H.  
Serum 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol, Androsterone, and testosterone concentrations in the male rat. Influence of age and gonade tropin Stimulation. Endocrinology 100, 1027-1032, 1977.
- MOON, K.H. y BUNGE, R.G.  
Observations on the biochemistry of human semen. 4. Cholesterol. Fertil Steril 21, 80-83, 1970.
- MOORE, R.A.  
Benign hypertrophy and carcinoma of the prostate. Surgery, 16, 152-167, 1944.
- MOORE, R.J. y WILSON, J.O.  
The effect of anrogenic hormones on the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  $\nabla^4$ -3-ketosteroid 5 $\alpha$ -oxidoreductase of rat ventral prostate. Endocrinology 93, 581-592, 1973.
- MORFIN, R., CHARLES, J.F. y BERCOVICI, J.P.  
5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone et adenome de la prostate. J. D'Urologie et de Nephrologie 89, 691-703, 1978.

- MUNICIO, A.M., ODRIOZOLA, J.M., PEREZ-ALBARSANZ, M.A., RAMOS, J.A. y RELAÑO, E.  
Lipogénesis from ( $^{14}\text{C}$ ) acetate during development of *Ceratitidis Capitata*. *Insect. Biochem.* 4, 401-409, 1974a.
- MUNICIO, A.M., ODRIOZOLA, J.M., PEREZ-ALBARSANZ, M.A. y RAMOS, J.A.  
In vitro and in vivo fate of saturated and unsaturated fatty acids during development of insects. 360, 289-297, 1974b.
- MUNICIO, M.A., ODRIOZOLA, J.M. y PEREZ-ALBARSANZ, M.A.  
Biochemistry of development in insects. Incorporation of fatty acids into different lipid classes. *Eur. J. Biochem.* 60, 123-128, 1975.
- MUNIZING, J., KIRDAMI, R., MURPHY, G.P. y SANO  
Hormonal control of zinc uptake and binding in the rat dorsolateral prostate. *Invest. Urol.* 14, 492-495, 1977.
- MUNTZING, J., LILJEKVIST, J. y MURPHY, G.P.  
Chalones and stroma as possible growth-limiting factors in the rat ventral prostate. *Investigative Urology* 16, 399-402, 1979.
- MURONO, E.P., LIN, T., OSTERMAN, J. y NANKIN, H.R.  
Direct inhibition of testosterone synthesis in rat testis interstitial cells by Ethanol: Possible sites of action. *Steroids* 36, 619-631, 1980.
- NUGTEREN, D.H.  
The enzymic chain elongation of fatty acids by Rat-Liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 106, 280-290, 1965.

NINNO, R.E., DE TORRENCO, M.A.P., CASTUMA, J.C. y  
BRENNER, R.R.

Sppecificity of 5-and 6-fatty acid desaturases in rat  
and fish. *Biochim. Biophys. Acta* 360, 124-133, 1974.

NYDEN, S.J. y WILLIAMS-ASHMAN, H.G.

Influence of Androgens on Synthetic reactions in Ven-  
tral prostate Tissue. *Am. J. Physiol.* 172, 588-600,  
1953.

OFNER, P.

Effects and metabolism of hormones in normal and neo-  
plastic prostate tissue. *Vitam. Horm.* 26, 239-291,  
1968.

OSAFUME, M., USAMI, M., MIKI, T., NAKANO, E., MATSUDA, M.,  
KOTAKE, T., SONODA, T. y WADA, F.

Physiologic regulation of colesterol synthesis in rat  
prostate. *Jpn. J. Urol.* 71, 437-448, 1980.

OSHINO, N. y SATO, R.

The Dietary Control of the Microsomal CoA Desaturation  
Enzyme System in Rat Liver. *Arch. Biochem. Biophys.*  
149, 369-377, 1972.

PANG, S.G., CHOW, P.H., WONG, T.M.

The role of the seminal vesicles, coagulating glands  
and prostate glands on the fertility and fecundity of  
mice. *J. Reprod. Fertil* 56: 129-132, 1979.

PARKER, M., NEEDHAM, M. y WHITE, R.

Prostatic steroid binding protein: organisation of  
C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> genes. *Nucleic Acids Research* 10, 5121-5131,  
1982.

PATURNEAU-JOUAS, M., BAUMANN, N. y BOURRE, J.M.

Biosynthese des acides gras dans les mitochondries de cerveau de souris en présence de malonyl-CoA ou d'acetyl-CoA. Biochimie, 58, 341-349, 1976a.

Elongation of Palmityl-CoA in Mouse Brain Mitochondria. Comparison with stearyl-CoA. Biochem. Biophys. Res. Comm., 71, 1326-1334, 1976b.

PODACK, E.R., SEUBERT, W.

On the mechanism of Malonyl-CoA independent fatty acid synthesis. II. Isolation, properties and subcellular location of trans-2,3-Hexenoyl-CoA and Trans-2,3-Decenoyl-CoA Reductase. Biochim. Biophys. Acta, 280, 235-247, 1972.

PODACK, E.R., LAKOMEK, M., SAATHOFF, G. y SEUBERT, W.

On the Mechanism and Control of the Malonyl-CoA-Dependent Chain Elongation of Fatty Acids Characterization of Hexenoyl-CoA Reductase from Liver and Adrenal Cortex as a constituent of the Microsomal Chain elongation. Eur. J. Biochem. 45, 12-23, 1974.

POIRIER, J.

Histologia Humana. ed. Marban . Madrid . p. 436, 1978

POSNER, C. y SCHEFFER, W.

Beitrage zur Klinischen mikorskopie und mikrophoto-graphie. Berl. Klin. Woch, 46, 254-257, 1909.

PRICE, D., WILLIAMS-ASHMAN, H.G.

The accessory reproductive glands of mammals, in young. Sex and internal secretions; 3rd ed vol. 8, pp. 366-488 (Williams & Wilkins, Baltimore, 1961).

PRINS, G.S. y LEE, C.

Effect of Protease inhibitors an androgen receptor ana<sub>l</sub>ysis in rat prostate cytosol. Steroids 40, 189-201, 1982a.

Influence of Prolactin-Producing Pituitary grafts on the vivo uptake Pituitary grafts on the in vivo uptake. Distribution, and Disappearance of (<sup>3</sup>H) Testosterona and (<sup>3</sup>H) Dihidrotosterona by the Rat Prostate lobes. Endocrinology 110, 920-926, 1982b.

PRIVETT, O.S., BLANCK, M.L. y VERDINO, B.

Influence of dietary fat on Triglyceride Structure in the rat. J. Nutr. 85, 187-196, 1965.

PUCA, G.A. y SICA, V.

Identification of specific High Affinity sites for the estradiol receptor in the Erythrocyte cytoskeleton. Biochem. Biophys. Res. Commun. 103, 682-689, 1981.

RAJALAKSHMI, M., REDDY, P.R.K. y PRASAD, M.R.N.

Distribution of fructose, citric acid, sialic acid and lipids in male accessory glands of the hamster, Mesocricetus Auratus. J. Endocrinol. 58, 369-350, 1973.

RANDO, R.R. y BLOCH, K.

Mechanism of action of  $\beta$ -hydroxydecanoyl Thioester dehydrase. J. Biol. Chem. 243, 5627-5634, 1968.

RAZIN, S. y ROSANSKY, R.

Mechanism of the antibacterial action of spermine.  
Arch. Biochem. Biophys. 81, 36-54, 1959.

RECIO, M.N., CARMEN, M.J., PEREZ-ALBARSANZ, M.A., GARCIA  
PEREZ, I. y ALCAIDE, A.

Biosíntesis de Colesterol en prostata ventral de rata.  
X Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Com.  
145, 1982.

ROCK, C.O., FITZGERAL, V. y SNYDER, F.

Activation of Alkyldihydroxyacetone phosphate Synthase  
by Detergents. Arch. Biochem. Biophys. 181, 172-177,  
1977.

ROGERS, M.J. y STRITTMATTER, P.

Lipid-Protein Interactions in the Reconstitution of  
the Microsomal Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleoo  
tide-Cytocrome b<sub>5</sub> Reductase system. J. Biol. Chem.  
248, 800-806, 1973.

ROGERS, M.J. y STRIHMATTER, P.

The Interaction of NADH-Cytochrome b<sub>5</sub> Reductase and  
Cytochrome b<sub>5</sub> Bound to Egg Lecitin Liposomes. J.  
Biol. Chem., 250, 5713-5718, 1975.

ROMPPANEN, T., HUTTUNEN, E. y HELMINEN, H.J.

An improved light microscopical histoquantitative  
method for the stereological analysis of the rat ventral  
prostate lobe. Invest. Urol. 18, 59-65, 1980.

ROTHMAN, J.E. y KENNEDY, E.P.

Rapid transmembrane movement of newly Synthesized  
phospholipids during membrane assembly. Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA. 74, 1821-1825, 1977.

ROUSER, G., SIAKOTOS, A.N. and FLEISCHER

Quantitative analyses of phospholipids by thin layer chromatography and phosphorus analyses of spots. *Lipids* 1, 85-87, 1966.

SABBATINI, D.D. y BLOBEL, G.

Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions. II. Localization of the polypeptides in rough microsomes. *J. Cell. Biol.* 45, 146-157, 1970.

SABINE, J.R.

Lipids in cancer—a functional or a fictional association? *Trends Biochem. Sci.* 8, 734-736, 1983.

SAITO, S., BUSH, I.M., WHITMORE, W.F.

Effects of certain metals and chelating agents on rat and dog epididymal spermatozoan motility. *Fertil Steril* 18, 517-529, 1967.

SALERNO, D.M. y BEELER, D.A.

The Biosynthesis of phospholipids and their precursors in rat liver involving "De novo" Methylation, and Base-exchange pathways, "in vivo". *Biochim. Biophys. Acta*, 326, 325-338, 1973.

SANTTI, R.S., HARKONEN, P.L. y KUOSA, A.

Importance of glucose for the emergence of the testosterone action in the protein synthesis. *Acta endocr. Copenh.* 254, 153-158, 1977.

SCHAFFNER, C.P.

Prostatic cholesterol Metabolism: Regulation and alteration in Prostatic cell: Structure and Function Part A. (G.P. Murphy, A.A., Sandberg, J.P., Karr, ed.) Alan R. Liss. INC. New York, pp. 279-324, 1981.

SCHLOSSMAN, D., BELL, R.M.

Triacylglycerol Synthesis in Isolated Fat Cells  
Evidence that the sn-Glycerol-3-Phosphate and Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase activities are Dual catalytic Functions of a single microsomal Enzyme. J. Biol. Chem. 251, 5738-5744, 1976.

Microsomal sn-glycerol 3-phosphate and Dihydroxiacetone phosphate Acyltransferase Activities from liver and other Tissues. Evidence for a single Enzyme Catalyzing Both Reactions. Arch. Biochem. Biophys. 182, 732-742, 1977.

SCHULTZ, F.M. y JOHNSTON, J.M.

The synthesis of higher glicerides via the monoglyceride pathway in hamster adipose tissue. J. Lipid. Res. 12, 132-138, 1971.

SCHUMM, D.E., MORRIS, H.P. and WEBB, T.E.

Cytosol-modulated transport of Messenger RNA from Isolated Nuclei. Cancer Res. 33, 1821-1828, 1973.

SCHWEIZER, E., KNIEP, B., CASTORPH, H. y HOLZNER, W.

Pantetheine-Free Mutants of the Yeast Fatty-Acid-Synthetase Complex. Eur. J. Biochem. 39, 353-362, 1973.

SCOTT, W.W.

The lipids of prostatic fluid, seminal plasma and enlarged prostate gland of man. J. Urol. 53, 712-718, 1945.

SEUBERT, W. y PODACK, E.R.

Mechanisms and physiological roles of fatty acid chain elongation in microsomes and mitochondria. Mol. Cell. Biochem. 1, 29-40 , 1973.

SHAIN, S., AXELROD, L.R.

Reduced high affinity 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone receptor capacity in the ventral prostate of the ageing rat. Steroids 21: 801-812, 1973.

SHAIN, S.A., BOESEL, R.W. y AXELROD, L.R.

Aging in the rat prostate : Reduction in detectable ventral prostate androgen receptor content. Arch. Biochem. Biophys. 167, 247-263, 1975.

SIITERI, P.K. y WILSON, J.D.

Dihydrotestosterona in prostatic hypertrophy. I. The formation and content of dihydrotestosterone in the hypertrophic prostate of man. J. Clin. Invest., 49, 1737-1745, 1970.

Testosterona formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. J. Clin. Endocrin. Metab. 38, 113-125, 1974.

SINCLAIR, A.J.

Fatty acid composition of liver lipids during development of rat. Lipids Vol. 9, N<sup>o</sup> 10, 809-818, 1974.

SINGHAL, A.K.

Cholesterol metabolism and its regulation in rat ventral prostate. ph. D. Dissertation, Rutgers University New Brunswick, New Jersey, 1978.

SINGHAL, A.K. y SCHAFFNER, C.P.

"In vitro" effect of Testosterone and CAMP on cholesterol synthesis in rat ventral prostate. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 164, 45-50, 1980.

SINGHAL, R.L., VIJAYVARGIYA, R. y LING, G.M.

Cyclic adenosin monophosphate: Andromimetic action on seminal vesicular enzyme. *Science*, 168, 261-263, 1970.

SINGHAL, R.L., THOMAS, J.A. y SUTHERLAND, D.J.B.

Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate-adenyl cyclase system in prostate gland and other androgen-dependent tissues. In Goland M (ed.): *Normal and Abnormal Growth of the Prostate* Springfield Charles C. Thomas, pp. 445-493, 1974.

SINGHAL, A.K., BONNER, D.P. y SCHAFFNER, C.P.

Kinetics of Testosterone induced-cholesterol Synthesis in rat ventral prostate. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 159, 1-5, 1978.

SINGHAL, A.K., BRILL, D.R. y SCHAFFNER, C.P.

Effect of Clofibrate on cholesterol and DNA synthesis in Rat ventral prostate. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 160, 405-409, 1979.

SKIDMORE, W.G., and ENTENMAN, S.

The determination of esterified fatty acids in glycerides, cholesterol esters and phosphatides. *J. Lipid. Res.* 3, 356-363, 1962.

SLUYSER, M.

Interaction of steroid hormone receptors with DNA. *Trends Biochem, Sci.* 8, 236-238, 1983.

SMITH, E.R., DAMASSA, D.A. and DAVIDSON, J.M.

Feedback regulation and male puberty: testosterone and luteinizing hormone relationships in the developing rat. *Endocrinology*, 101, 173-180, 1977.

SONG, C.S. y KIM, K.H.

Reevaluation of Properties of Acetyl-CoA carboxylase from Rat Liver. J. Biol. Chem. 256, 7786-7788, 1981.

SPATZ, L. y STRITTMATTER, P.

A form of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Cytochrome  $b_5$  Reductase Containing Both the Catalytic Site and a additional Hydrophobic Membrane-binding Segment. J. Biol. Chem. 248, 793-799, 1973.

SPRECHER, H.

The influence of dietary alterations, fasting and competitive interactions on the microsomal chain elongation of fatty acids. Biochim. Biophys. Acta 360, 113-123, 1974a.

Feeding studies designed to determine whether competitive reactions Between acids of the oleate and linoleate families for desaturation chain elongation or incorporation regulate the fatty acid composition of rat liver lipids. Biochim. Biophys. Acta, 369, 34-44, 1974b.

STAMEY, T.A., FAIR, W.R., TIMOTHY, M.M. y CHUNG, H.K.

Antibacterial nature of Prostatic fluid. Nature 218, 444-447, 1968.

STRITTMATTER, P., ROGER , M.J. y SPATZ, L.

The binding of Cytochrome  $b_5$  to liver Microsomes. J. Biol. Chem. 247, 7188-7194, 1972.

STRITTMATTER, P., SPATZ, L., CORCORAN, D., ROGERS, M.J., SETLOW, B. y REDLINE, R.

Purification and Properties of Rat Liver Microsomal Stearyl Coenzyme A Desaturase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 4565-4569, 1974.

SUNDLER, R. y AKESSON, B.

Regulation of Phospholipid Biosynthesis in Isolated Rat Hepatocytes. Effect of Different substrates. J. Biol. Chem. 250, 3359-3367, 1975.

SWYER, G.I.

The cholesterol content of normal and enlarged prostates. Cancer. Res. 2, 372-375, 1942.

TADOLINI, B. y ZANOTTI, M.

Isolation of Golgi rich fraction from rat ventral prostate. Ital. J. Biochem. 31, 139-144, 1982.

TAKKAR, G.L. y KAMBOJ, U.P.

Effect of altered hormonal states on histochemical distribution of lipids in the rat prostatic complex. Proc. Indian. Nat. Sci. 37, 91-97, 1971.

TANABE, T., WADA, K., OKAZAKI, T. y NUMA, S.

Acetyl-coenzyme-A Carboxylase from Rat Liver. Subunit structure and Proteolytic Modification. Eur. J. Biochem. 57, 15-24, 1975.

TAYLOR, P.W. y MORGAN, H.R.

Antibacterial substances in human semen and prostatic fluid. Sur Gynecol Obstet. 94, 662-668, 1952.

TENNISWOOD, M., ABRAHAMS, P., BIRD, C.E. y CLARK, A.F.

Effects of castration and androgen replacement on acid phosphatase activity in the adult rat prostate gland. J. Endocrinol. 77, 301-308, 1978.

Age-Associated changes in acid phosphatase characteristics in the rat ventral prostate and other organs. Archives of Andrology 9, 283-292, 1982.

TESAR, C. y SCOTT, W.W.

A search for inhibitors of prostate growth stimulators.  
Invest. Urol. 1, 482-498, 1964.

THOMPSON, S.A., JOHNSON, M.P. y BROOKS, C.L.

Biochemical and immunohistochemical characterization  
of Prolactin Binding in Rat Ventral, Lateral, and  
Dorsal Prostate lobes. Prostate, 3, 45-59, 1982.

TOGHROL, F., FRANKLIN, R.B. and COSTELLO, L.C.

Citrate Synthesis from fatty acids and amine acids  
in rat ventral prostate. Enzyme 25, 371-376, 1980.

TOMPSON, H.

The Diseases of the Prostate. Philadelphia; HC. Lea,  
p. 308, 1873.

TRUMP, B.F., HEATFIED, B.M. y PHELPS, P.C.

The Role of the Cytoskeleton and Related Components  
in Normal and Neoplastic prostatic Epithelium. The  
Prostate cell: Structure and Function, part A. (G.P.  
Murphy; A.A., Soudberg; J.P. Karr, ed.) Alan R. Liss  
New York, 25-53, 1981.

TUOHIMAA, P., OKSANEN, A. y NIEMI, M.

Effects of testosterone and 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone  
on weight gain and <sup>3</sup>H-thymidine incorporation in acce  
sory sex glands of castrated male rats. Acta Endocri-  
nol. Kbh 74, 379-388, 1973.

VAGELOS, P.R.

Lipid Metabolism. Ann. Rev. Biochem., 33, 139-172,  
1964.

Van den BESSELAAR, A.M.H.P., KRUIJFF, B., van den BOSCH, H.  
y van DEENEN

Phosphatidylcholine mobility in liver microsomal membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 510, 242-255, 1978.

Van GOLDE, L.M.G., FLEISCHER, B. y FLEISCHER, S.

Some studies on the metabolism of phospholipids in golgi complex from Bovine and rat liver in comparison to other subcellular fractions. *Biochim. Biophys. Acta* 249, 318-330, 1971.

Van GOLDE, L.M.G., RABEN, J., BATENBURG, J.J., FLEISCHER, B.  
ZAMBRANO, F. y FLEISCHER, S.

Biosynthesis of lipids in golgi complex and other subcellular fractions from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 360, 179-192, 1974.

VIGERSKY, R.A., LORIAUX, D.L., HOWARDS, S.S., HODGEN, G.B.,  
LIPSETT, M.B. y CHRAMBACH, A.

Androgen binding proteins of testis, epididymis, and plasma in man and monkey. *J. Clin. Invest.* 58, 1061-1068, 1976.

VITAL STATISTICS of THE UNITED STATES

Washington, D.C., U.S. Government, Printing Office,  
Vol. 2, 1965.

WAKIL, S.J.

Lipid Metabolism. *Ann. Rev. Biochem.*, 31, 369-406,  
1962.

WAKIL, S.J., STOOPS, J.K. y JOSHI, V.C.

Fatty acid synthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 537-579, 1983.

WEBER, K.

Visualization of tubulin-containing structures by immunofluorescence microscopy: cytoplasmic microtubules, mitotic figures and vinblastine induced paracrystals; in Goldman, Pollard Rosebaum, cell motility, Vol. A, p. 403 (Cold, Spring Harbour Laboratory, New York, 1976).

WEINSTEIN, B.I.

Protein kinase, phospholipid and control of growth. Nature, 302, 750, 1983.

WEISZ, J. y WARD, I.L.

Plasma Testosterone and Progesterone Titters of Pregnant rats, Their Male and Female fetuses, and Neonatal offspring. Endocrinology, 106, 306-315, 1980.

WILGRAN, G.F. y KENNEDY, E.P.

Intracellular Distribution of Some Enzymes Catalizing Reactions in the Biosynthesis of Complex lipids. J. Biol. Chem. 238; 2615-2619, 1963.

WILLIAMS-ASHMAN, H.G.

Changes in the enzymatic constitution of the ventral prostate gland induced by androgenic Hormones. Endocrinology 54, 121-129, 1954.

WILLIAMS-ASHMAN, H.G. y BANKS, J.

The synthesis and degradation of citric acid by ventral prostate tissue. J. Biol. Chem. 208, 337-344, 1954.

WILSON, E.M., VISKOCHIL, D.U., BARTLETT, R.J., LEE, O.A.

NOYES, C.M., PETRUSZ, P., STAFFORD, D.W. y FRENCH, F.S.

Model Systems for Studies on Androgen-Dependent Gene Expression in the Rat Prostate. En The prostatic cell: Structure and function, part A. (G.P. Murphy; A.A. Sandberg; J.P. Karr (ed.) Alan R. Liss. Inc. New York, pp. 351-380, 1981.

WILSON, J.D.

Metabolism of testicular androgens, en Greep R.D. Astwood E.B. (eds.). Handbook of Physiology. Sect. 7: Endocrinology, vol. V. Male Reproductive Systems, Washington, American Physiological Society. p. 491, 1975.

Sexual differentiation. Ann. Rev. Physiol. 40, 279-306, 1978.

WILSON, J.D., GRIFFIN, J.E., LESHIN, M. y MACDONALD, P.C.

The androgen resistance syndromes: 5 $\alpha$ -Reductase Deficiency, Testicular Feminization, and Related Disorders en The Metabolic Basis of inherited disease, (Stambury, Wingarden, Fredickson, Goldstein, Brown) McGraw-Hill Book Company, 1001-1026, 1983.

WIT-PEETERS, E.M.

Synthesis of larg-chain Fatty acids in Mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. 176, 453-462, 1969.

WONG, Y.C., TSE, M.K.W.

Fine structural and Functional study of the Prostatic complex of the Guinea pig. Acta. Anat. 109, 289-312, 1981.

WYKLE, R.L. y SNYDER, F.

Microsomal enzymes involved in the metabolism of ether-linked glycerolipids and their precursors in mammals. In Enzymes of Biological Membranes. A. Martousi, editor. Plenum. Press, New York, 2, 87-117, 1976.

YAMADA, K. y OKUYAMA, H.

Selectivity of Diacylglycerophosphate Synthesis in Subcellular fractions of rat liver. Arch. Biochem. Biophys. 190, 409-420, 1978.

YAMANAKA, H., KIRDANI, R.Y., SAROFF, J., MURPHY, G.P.  
y SANDBERG, A.A.

Effects of testosterone and prolactin on rat prostatic weight,  $5\alpha$ -reductase and arginase. Am. J. Physiol. 229, 1102-1109, 1975.

YAMASHITA, S., HOSAKA, K. y NUMA, S.

Acyl-Donor Specificities of Partially Purified 1-Acylglycerophosphate Acyltransferase, 2-Acylglycerophosphate Acyltransferase and 1-Acylglycerophosphorylcholine Acyltransferase from Rat-liver Microsomes. Eur. J. Biochem, 38, 25-31, 1973.

YAVIN, E. y ZEIGLER, B.P.

Regulation of Phospholipid Metabolism in Differentiating cells from Rat Brain Cerebral Hemispheres in culture: Serine incorporation into serine phosphoglycerides, Base exchange and decarboxilation patterns. J. Biol. Chem. 252: 260-267, 1977.

ZANEVELD, L.J.D. y TAUBER, P.F.

Contribution of Prostatic Fluid Components to the Ejaculate. En The Prostatic cell: Structure and Function (Murphy, G.P., Sandberg, A.A., Karr, J.P. ed.) Alan R. Liss, New York, pp. 265-277, 1981.

ZILVERSMIT, D.B. y HUGHES, M.E.

Extensive exchange of rat liver microsomal phospholipids. Biochim. Biophys. Acta. 469, 99-110, 1977.