

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LOS NIVELES DE mRNA DE LAS ISOENZIMAS DE LA
5ALFA-REDUCTASA EN DIFERENTES SITUACIONES
EXPERIMENTALES DE LA RATA

M^a Pilar Sánchez Medina
2007

AGRADECIMIENTOS

Durante el desarrollo de la presente tesis doctoral, he recibido el apoyo de numerosas personas a las que quisiera expresar mi gratitud:

En primer término, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. D^a. Esperanza Ortega Sánchez, directora de esta tesis, por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza y afecto, fundamentales para convertir este trabajo en realidad.

A D^o Jesús M.Torres de Pinedo, director de esta tesis, por mostrarme sus conocimientos científicos, apoyo, y enseñarme que lo imposible, se puede hacer posible.

A Dra. D^a. M^a. Estrella Ruíz Requena y a las auxiliares del Servicio de radioinmunoanálisis del Hospital Universitario San Cecilio de Granada por su ayuda brindada en este trabajo.

A D^a. Magdalena y D^a.Chari, por su apoyo y disposición constante en el trabajo, como por su ánimo en los momentos difíciles

A D^a Araceli, y D^o Jose Antonio Galindo, por ofrecerme su ayuda durante estos años.

A toda la sección de Inmunología por hacerme sentir parte de ellos. Especialmente quiero agradecer a Irene y Raquel su amistad dentro y fuera del laboratorio, y el haber estado en todos los momentos tan cercanas a mí.

A mi esposo, Alberto, quiero agradecerle la comprensión y paciencia mostrada durante todos estos años. Muchas de las horas aquí invertidas se las he robado a él, y a pesar de ello me ha prestado siempre el apoyo y cariño necesarios que sólo una gran persona puede dar.

A mis padres y hermano por brindarme un hogar cálido y enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos. Soy muy afortunada por contar siempre con vuestro amor, comprensión y ejemplo.

A la Fundación clínico por su colaboración

De esta tesis se han derivado las siguientes publicaciones:

Artículos:

- Quantitation of mRNA levels of steroid 5 α -reductase isozymes in the rat brain by one-step RT-PCR and capillary electrophoresis. *Torres JM, Sánchez, Ortega E. Journal of Neuroscience Methods* 136 (2004) 103
- Effects of dihydrotestosterone on brain mRNA levels of steroid 5 α -reductase isozymes in early postnatal life of rat. *Sánchez P, Torres JM, Ortega E. Neurochem Res.* 2005 Apr; 30(4):577-81.
- Effects of testosterone on brain mRNA levels of steroid 5 α -reductase isozymes in early postnatal life of rat. *Sánchez P, JM Torres, R.G. del Moral, Ortega E. Neurochemistry International* (2006). Nov; 49(6):626-30.

Comunicaciones a congresos:

- Expresión de los isoenzimas de la 5 α reductasa en el cerebro de rata hembra adulta: papel central de la dihidrotestosterona (2004). P. Sánchez , J.M. Torres, E.Ortega. *Congreso de Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.*
- Differential regulation of steroid 5 α -reductase isozymes expression by androgens in adult rata brain.(2005) J.M. Torres, P. Sánchez, E.Ortega . *30TH FEBS CONGRESS AND 30TH IUBMB, ISBN.*
- Effects of dihydrotestosterone on steroid 5 α reductase isozymes in the adult female rat brain. *Torres JM, Gavete P, Sánchez P, Vilchez P, Ortega E. (2006) Scientific Commitee of the 31 st FEBS Congress.*
- Efectos de Testosterona sobre los niveles de mRNA de los isoenzimas de la 5 alfa-Reductasa en cerebro de rata durante la vida postnatal temprana. (2006). P. Sánchez, J.M. Torres, Gavete P, Vilchez P, Ortega E. *XXIX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM)*
- Niveles de mRNA de los isoenzimas 5 alfa-Reductasa en cerebro de rata sometida a estrés psíquico(2006). Sánchez Medina P, Torres Pinedo JM, Gavete Cavo P, Vilchez Campillo P, Ortega E. *CONGRESO: XXV de la SEQC*

INTRODUCCION

1. 5 alfa-reductasa	5
2. Genética.....	8
3. Propiedades bioquímicas.....	9
4. Localización tisular extracerebral	10
5. Localización subcelular	10
6. Efectos de la 5 alfa-Reductasa tipo2.....	11
7. Efectos de la 5 alfa-Reductasa tipo 1	16
8. Patología asociadas con la 5 alfa-Reductasa	18
8.1 Enfermedades prostáticas	18
8.2 Acné	19
8.3 Calvicie	17
8.4 Hirsutismo idiopático	20
9. 5 alfa-Reductasa en el cerebro	21
9.1 Distribución en el cerebro Acné	21
9.2 Las isoenzimas durante la ontogénesis y diferenciación sexual del cerebro	24
10. Regulación en la expresión de la 5 alfa-Reductasa.....	28
OBJETIVOS	33

MATERIAL Y METODOS

1. Material fungible e inventariable	37
--	----

2. Animales de experimentación	39
2.1 Ratas neonatales	39
2.2 Ratas adultas	40
2.2.1 Ratas adultas no tratadas neonatalmente (Grupo control).....	40
2.2.2 Ratas adultas tratadas neonatalmente con T	41
2.2.3 Ratas adultas tratadas neonatalmente con DHT	41
2.3 Tratamientos hormonales recibidos.....	42
2.3.1 Tratamiento en el periodo neonatal	42
2.3.2 Tratamiento en la edad adulta.....	43
2.4 Ratas adultas estresadas	44
2.4.1 Ratas sometidas a estrés físico por natación.....	44
2.4.2 Ratas sometidas a estrés medio ambiental	44
3. Recogida de muestras	45
3.1 Recogida de sangre	45
3.2 Recogida de cerebro	45
4. Análisis hormonal.....	46
5. Extracción de RNA.....	47
6. Cuantificación del RNA	48
7. Diseño de oligonucleótidos para PCR.....	49
8. Construcción del estándar interno.....	51
9. Eficiencia de amplificación de dos moléculas competidoras	54
10. Reverso transcripción y reacción en cadena de la polimerasa.....	58
11. Análisis de los productos de PCR.....	60
11.1 Electroforesis en gel de agarosa	60
11.2 Electroforesis capilar.....	61

RESULTADOS

1. Ratas neonatales	65
1.1. Ratas neonatales tratadas con T	65
1.2. Ratas neonatales tratadas con DHT	68
2. Ratas adultas	72
2.1 Ratas adultas no tratadas neonatalmente	72
2.2 Ratas adultas tratadas neonatalmente con T	76
2.3. Ratas adultas tratadas neonatalmente con DHT	81
2.4 Ratas adultas estresadas	86
2.4.1 Ratas sometidas a estrés físico por natación	86
2.4.1 Ratas sometidas a estrés medio ambiental	89
DISCUSIÓN	95
CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFÍA	121

Abreviaturas comúnmente utilizadas

5 α -R: 5 alfa-Reductasa

5 α -R1: 5 alfa-Reductasa tipo 1

5 α -R2: 5 alfa-Reductasa tipo2

T: Testosterona

DHT: Dihidrotestosterona

3 α -HSD: 3 alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa

DHP: Dihidroprogesterona

THP: Tetrahydroprogesterona

DHDOC: Dihidrodeoxicorticosterona

THDOC: Tetrahydrodeoxicorticosterona

SNC: Sistema Nervioso Central

GABA: ácido gamma aminobutírico

GABA_A-R: Receptor GABA tipo A

BZD: Benzodiazepina

PTX: Picrotoxina

AR: Receptor de andrógenos

ER: Receptor de estrógenos

El desarrollo y diferenciación del cerebro ha atraído la atención de los científicos durante mucho tiempo. Las hormonas esteroideas producidas por el organismo (andrógenos, estrógenos, progesterona, y corticoesteroides), afectan a diversas funciones del cerebro durante su desarrollo y en la vida adulta. Los efectos neuronales que ejercen los esteroides dependen de la estructura nerviosa, del estado de desarrollo del cerebro, de la especie animal considerada, y del tipo o subtipo celular (Negri-Cesi y col., 1996). Los esteroides actúan en la diferenciación sexual del sistema nervioso central (SNC) y representan una serie extremadamente compleja de eventos, que en roedores comienza durante el periodo de gestación y continúa en la vida postnatal temprana.

El principal esteroide que lleva a cabo este proceso de diferenciación sexual del SNC es la testosterona secretada por el testículo. Aunque los esteroides no siempre actúan en el cerebro en su forma nativa, sino que son metabolizados a otra forma que es la verdaderamente “activa”. Una consecuencia de esta última cuestión, es la importancia de estudiar en el SNC, la expresión y regulación de las enzimas implicadas en el metabolismo esteroideo. Prueba de ello, es que en el SNC los caminos enzimáticos están filogenéticamente bien conservados (Callard, 1984).

Las principales enzimas que transforman los esteroides en el cerebro son la aromataasa, 5 alfa-reductasa, 3 alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa. (Fig. 1).

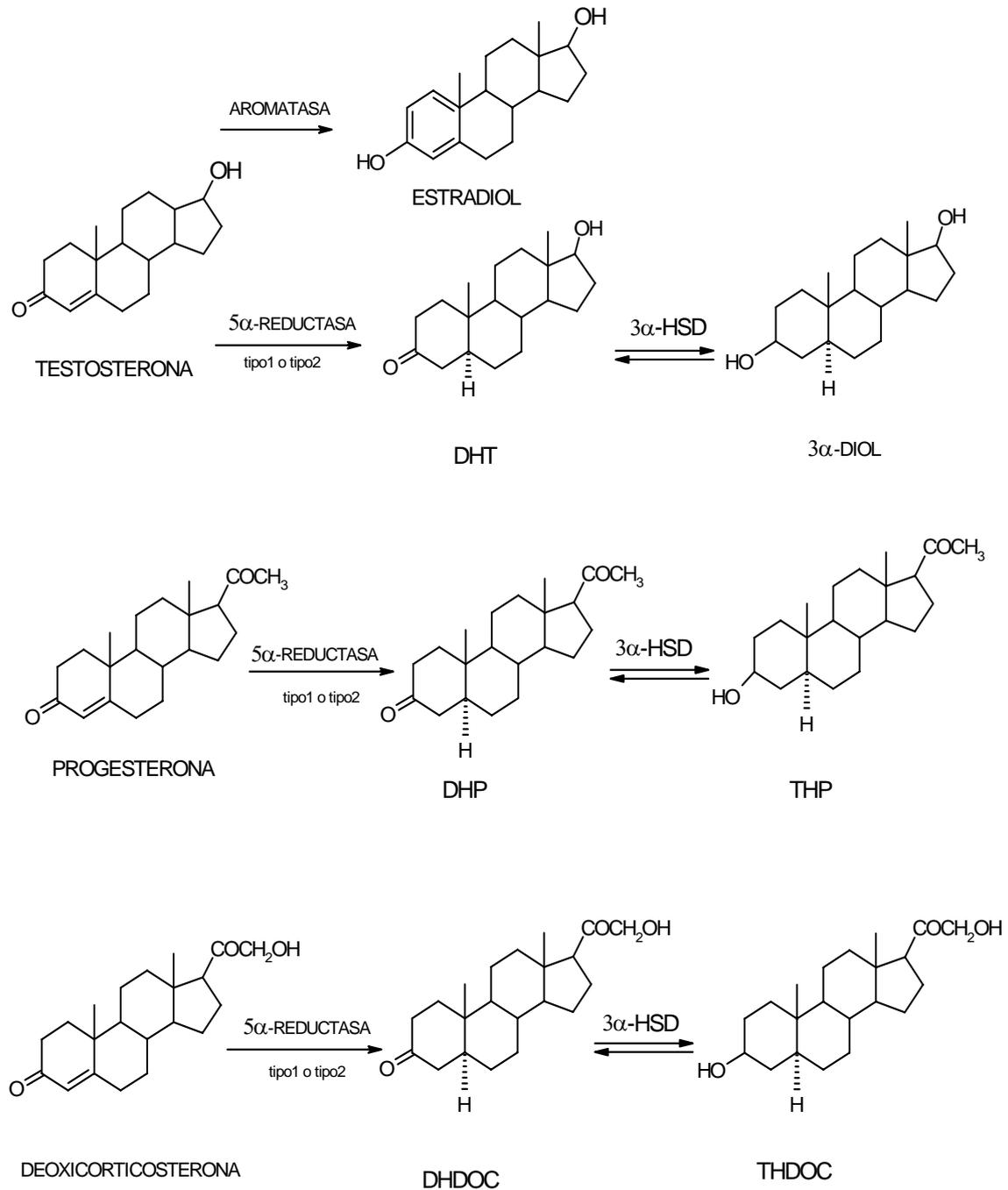


Fig. 1. Camino enzimático de la 5 α -reductasa y aromatsa. 3 α -diol=5 α -androstano-3 α ,17 β -diol. DHT=dihidrotestosterona. 3 α -HSD=3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa. DHP=dihidroprogesterona. THP=tetrahidroprogesterona. DHDOC=dihidrodeoxicorticosterona. THDOC=tetrahidrodeoxicorticosterona.

1. 5 alfa-Reductasa

La enzima 5 alfa-reductasa (5α -R) (EC 1.3.99.5) es una enzima inusual. Desde su descubrimiento estuvo asociada a procesos de masculinización, no obstante y gracias a nuestros estudios, actualmente creemos que también está asociada a procesos de feminización en el SNC (Torres y Ortega, 2003a, 2006).

La virilización en los mamíferos está mediada por dos hormonas esteroideas, la testosterona (T) y dihidrotestosterona (DHT). Ambas hormonas se unen a un receptor típico de hormonas esteroideas, el receptor de andrógenos, y activan genes dependientes de andrógenos. Los primeros estudios consideraban a la testosterona como la hormona androgénica por excelencia, mientras que la DHT sería un metabolito inactivo de la T. Sin embargo, en la actualidad DHT puede considerarse como una auténtica hormona, con un papel importante en la fisiología del mamífero (Torres y Ortega, 2003a, 2006).

Desde que se descubrió, en los años 50, la actividad 5α -R en un homogenado de hígado de conejo, se ha descrito la presencia de esta enzima en diferentes órganos y tejidos de las especies animales (Schneider y Horstmann., 1951; Schneider, 1952). La 5α -R transforma selectivamente un 4-ene-3-oxosteroide (por ejemplo, testosterona) irreversiblemente a 5-alfa-3-oxosteroide (por ejemplo, 5-alfa-dihidrotestosterona), en presencia de NADPH como cofactor a un pH óptimo (Bondy, 1981). No obstante, en estos primeros estudios, no estaba claro si la 5α -reducción de esteroides se llevaba a cabo por un sólo enzima o por un complejo multienzimático.

La 5α -reducción de sustratos esteroideos, hacen que sus grupos 3-oxo sean susceptibles a la reducción por 3α y 3β -hidroxisteroide deshidrogenasa, y a la sulfatación y glucuronización. Estas últimas modificaciones tienen la función de reducir la afinidad de los esteroides por receptores específicos, haciéndolos más hidrofílicos y facilitando su excreción (Bondy, 1981). Por esta razón, se pensó que la 5α -R participaría en el catabolismo de los esteroides. Sin embargo, trabajos llevados a cabo en los años 60, pusieron de manifiesto que la 5α -R no cataliza la reacción inversa (deshidrogenación de esteroides reducidos) (Wilson, 1975), dando a entender que la 5α -reducción debe ser una etapa reguladora importante. Además, se observó que la DHT se une preferentemente a receptores nucleares de andrógenos (Mainwaring, 1969; Fang y col., 1969). Todo ello, indica que la 5α -reducción de la T es una etapa crucial en la acción androgénica, y por ello centramos nuestra atención en la enzima 5α -Reductasa.

En los años 60 se demostró que DHT es un andrógeno esencial en la virilización del mamífero. Estudios sobre el desarrollo, demostraron que la actividad de la 5α -R en embriones de mamífero, era mayor en próstata y genitales externos antes de su virilización (Siiteri y Wilson, 1974), sugiriendo que esta reacción es crucial para la formación del fenotipo masculino normal durante la embriogénesis. Posteriormente, se demostró que un desorden atípico en la diferenciación sexual masculina, originariamente denominada *hipospadias pseudovaginal perineoescrotal* (Nowakoski y Lenz, 1961), estaba causada por mutaciones en la 5α -R (Imperato-McGinley y col., 1974), por eso hoy se conoce como deficiencia en 5α -R.

Los primeros intentos de purificación de la 5 α -R fueron infructuosos debido a la alta insolubilidad de la proteína. Entre 1971 y 1991, se llevaron a cabo múltiples intentos de purificación de la 5 α -R a partir de muestras humanas y de rata (Frederiksen y Wilson, 1971; Moore y Wilson, 1972, 1974; Liang y col., 1983; Houston y col., 1985; Ichiara y Tanaka, 1987; Enderle-Schmitt y col., 1989; Levy y col., 1990; Sargent y Habib, 1991). En estos estudios se utilizaron con éxito varios detergentes para solubilizar la enzima a partir de membranas celulares, sin embargo, la actividad enzimática se perdía rápidamente. Este “callejón sin salida” en la purificación de la 5 α -R, se resolvió en 1989, cuando se utilizó con éxito la técnica de *expresión clonning* en oocitos de *Xenopus laevis* (Noma y col., 1986), para aislar el cDNA de hígado de rata que codificaba para 5 α -R. Este cDNA se utilizó para aislar un homólogo humano del cDNA de rata, mediante *screening* en una librería de cDNA de próstata (Anderson y Russell, 1990). Cuando se compararon las actividades enzimáticas de la 5 α -R hepática y prostática, se observaron algunas discrepancias (Jenkism y col., 1992). Primero, el enzima codificado por el cDNA de hígado de rata era inhibido de forma muy débil por *Finasteride*, un potente inhibidor de la 5 α -R en próstata. Segundo, la actividad 5 α -R en hígado presenta un pH óptimo alcalino a diferencia del pH óptimo ácido en próstata. Tercero, cuando se aisló y analizó el gen que codifica para cDNA de hígado en individuos con deficiencia en 5 α -R, no se observaron mutaciones en la región codificante. Todo ello sugirió la existencia de un segundo gen de la 5 α -R y por lo tanto, la existencia de isoenzimas.

Hasta ahora se han encontrado dos isoenzimas, 5 α -Reductasa tipo 1 (5 α -R1) y 5 α -Reductasa tipo 2 (5 α -R2), se han clonado y secuenciado sus correspondientes cDNAs (Andersson y Russell, 1990; Normington y Russell, 1992). La 5 α -R1 es la enzima predominante de tejidos extraprostáticos como la piel y el hígado (Thigpen y col., 1993; Steers, 2001), aunque también se encuentra en la próstata. Mientras que la 5 α -R2 es la isoenzima predominante en la próstata (Russell y Wilson, 1994).

2. Genética

Las dos isoenzimas de la 5 α -R, han sido clonadas en humano, rata, ratón y mono (Andersson y col., 1989; Andersson y col., 1991; Labrie y col., 1992; Normington y Russell 1992; Russell y Wilson 1994; Levy y col., 1995; Mahendroo y col., 1996). En humano, el gen que codifica la 5 α -R1 es SRD5A1, está localizado en el brazo corto distal del cromosoma 5, en la banda p15, está compuesto por cinco exones y cuatro intrones, y produce una proteína de 259 aminoácidos. El gen de la 5 α -R2 es SRD5A2, está en el cromosoma 2, en la banda p23, y tiene una estructura similar a la codificada por la 5 α -R1, pero la proteína resultante está compuesta por 254 aminoácidos. La estructura intrón-exón de los dos genes funcionales es idéntica, indicando una antigua duplicación del gen. Además, hay un pseudogén en el cromosoma X. La estructura proteica determinada de sus respectivos cDNA, presenta un limitado grado de homología (sobre el 47%), y un peso molecular de aproximadamente 28,000-29,000 dalton. La similitud de la secuencia entre humano y rata es del 60% para la 5 α -R1 y del

77% para la 5 α -R2. En términos de secuencia primaria, ambas isoformas están compuestas de un elevado número de aminoácidos hidrófobos, distribuidos a lo largo de la molécula, presentando una localización intrínseca en la membrana.

3. Propiedades bioquímicas

Ambas isoenzimas presentan una baja especificidad por el sustrato, y por eso son capaces de llevar a cabo una 5 α -reducción de todos los Δ 4-3 keto esteroides, pero con diferentes cinéticas y especificidad. Tanto en rata como en humano, ambas isoenzimas tienen como sustrato preferente a la progesterona, seguido por la testosterona y con una considerable distancia, la corticosterona (Negri-Cesi y col., 1996). Particularmente en rata, la afinidad de la isoforma tipo1 para todos los sustratos está en un rango de micromolar ($K_{m_{ap}}=1-5 \mu M$), menor por tanto, que la de la isoforma tipo 2 que está en un rango de nanomolar ($K_{m_{ap}}=4-50 nM$) (Russell y Wilson, 1994). La diferencia en la afinidad es menos marcada en el caso de las enzimas humanas, aunque también está presente.

Las dos isoformas tiene un pH óptimo diferente, la 5 α -R1 es activa en un rango de pH óptimo amplio entre 5 y 8, mientras que la 5 α -R2 presenta un estrecho intervalo de pH óptimo alrededor de 5, con muy poca actividad a pH 7.5. Dado el diferente perfil bioquímico de las dos isoenzimas, debe esperarse que tengan diferente papel fisiológico aunque catalizen la misma reacción. Todo ello conlleva a que las dos isoenzimas

muestran una sensibilidad diferente a inhibidores sintéticos (Russell y Wilson, 1994; Taylor y col., 1995; Schwartz y col., 1997).

4. Localización tisular extracerebral

Se disponen de pocos datos de la distribución tisular de las isoenzimas 5α -R. En humano, el gen de la tipo 1 se expresa a muy bajos niveles en tejidos andrógenicos (tales como la próstata), y a muy elevados niveles en la piel e hígado (Steers, 2001; Thiele y col., 2005). En rata, esta isoforma está ampliamente distribuida por todos los genitales y tejido no genital, con elevados niveles en el hígado. En rata y en humano, la isoforma tipo 2 está muy concentrada en estructuras andrógeno-dependiente, tales como la próstata, el epidídimo (especialmente en las células basales), y las vesículas seminales; solamente pequeñas cantidades, han sido encontradas en otros tejidos (Russell y Wilson, 1994).

5. Localización subcelular

Estudios de inmunofluorescencia indirecta indican que en humano, ambos isoenzimas 5α -R se localizan en el retículo endoplasmático (Thigpen y col., 1993). La secuencia proteica presenta un elevado número de aminoácidos con residuos hidrofóbicos, que permite su localización intrínseca de membrana. La 5α -R, parece estar fuertemente asociada con las membranas celulares (citoplasmática o nuclear).

La localización subcelular de las dos isoenzimas varía en los diferentes tipos de células y tejidos (Celotti y col., 1997). Así, la actividad enzimática está en la fracción nuclear en células de próstata, tanto en rata como en humano (Frederiksen y col., 1971; Moore y col., 1972). Mientras que en células de hígado, la actividad de la 5α -R está en la fracción del retículo endoplasmático, ya que este orgánulo se extiende de forma continua desde la membrana nuclear hacia el exterior. Esta diferencia podría además tener un papel regulador, las células de la próstata son andrógeno-dependientes mientras que las del hígado no lo son. Una localización perinuclear del enzima, podría facilitar posteriores uniones del producto con los receptores andrógenos nucleares.

6. Efectos de la 5α -Reductasa tipo 2

La testosterona es el andrógeno mayoritario secretado por los testículos y el más abundante en la circulación. En el interior de la célula la T puede ser transformada a DHT por la 5α -R, o aromatizada a estradiol por la aromatasa. La T y DHT pueden unirse al mismo receptor proteico, el receptor de andrógenos y son transportadas al núcleo celular (McPhaul y col., 1993). Aunque DHT y T se unan al mismo receptor pueden desempeñar funciones diferentes. El complejo T-receptor ejerce un importante papel en la estimulación de los conductos de Wolf durante la diferenciación sexual, y es el responsable de la formación de las estructuras reproductoras internas masculinas como son el epidídimo, la vesícula seminal, y los vasos deferentes, y en la espermiogénesis (Griffin y Wilson, 1989). En el tracto urogenital del embrión, la testosterona es transformada a DHT. El complejo DHT-receptor es el responsable del

desarrollo de los genitales externos masculinos (pene y escroto), próstata, uretra y durante la pubertad del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios masculinos.

Hay tres clases de genes que responden a andrógenos: aquellos que ejercen su acción a través del receptor de andrógenos acoplado a T, aquellos que lo hacen a través del receptor de andrógenos acoplado a DHT, y aquellos que responden independientemente del andrógeno acoplado al receptor (Russell y Wilson, 1994). Los mecanismos por los cuales las dos hormonas se unen al mismo receptor, pero llevan a cabo funciones diferentes es todavía desconocido. Se sabe que la DHT posee una afinidad por el receptor de cuatro veces mayor que la testosterona (Kovacs y col., 1984; Trapman y col., 1988; Lubahn y col., 1988; Grino y col., 1990; Steers, 2001). El ratio de disociación de la hormona sobre el dominio de unión del receptor, es de cuatro veces menor en DHT que en T (Negri-Cesi y col., 1996). La unión de DHT al receptor, induce un cambio conformacional en la estructura del receptor mas rápido, que la unión de T al receptor; pasando de su estado inactivo a activo y permitiendo su unión a la cromatina (Martini, 1982). El complejo DHT-receptor activa a los genes más eficientemente (Goldstein y Sengelaub, 1994). Como consecuencia, el complejo DHT-receptor debe regular genes que no respondan a la testosterona (Takani y Kawashima, 1993).

Para el desarrollo sexual masculino se requiere un proceso secuencial de tres pasos. El primer paso, es el establecimiento del sexo genético por la presencia del cromosoma sexual 46XY, un proceso completado en el momento de la fertilización del óvulo. El segundo paso, es la diferenciación de las gónadas indiferenciadas a testículos, para el que se requiere la presencia del gen SRY presente en el cromosoma Y, además

de múltiples genes localizados en cromosomas autosomales. El tercer paso, es el desarrollo del fenotipo sexual masculino, en el que testosterona y dihidrotestosterona juegan un papel crucial en este proceso.

La importancia de ambos andrógenos en la diferenciación sexual masculina y en la determinación de la identidad del género masculino, ha sido determinada por el estudio de individuos con síndrome de deficiencia 5 α -Reductasa tipo 2.

El síndrome clínico de deficiencia 5 α -R2 fue descrito por primera vez, bioquímica y clínicamente, en 24 individuos de la República Dominicana (Imperato-McGinley y col., 1974) y en dos familias de Dalas (Walsh y col., 1974). Posteriormente, también se diagnosticaron individuos en Nueva Guinea (Imperato-McGinley y col., 1991) y en Turquía (Akgun y col., 1986; Can y col., 1998; Imperato-McGinley y col., 1987), así como en otros lugares del mundo (Zhu y Imperato-McGinley y col., 2002). Se manifiesta en individuos genéticamente macho 46XY, que en el momento del nacimiento presentan un fenotipo con ambigüedad genital. Los individuos muestran un falo del tamaño similar al clítoris, un escroto severamente bífido, una hipospadia pseudovaginal perineoescrotal y una rudimentaria próstata (Imperato-McGinley y col., 1974, 1979, Imperato-McGinley 1992, Imperato-McGinley y col., 1992; Imperato-McGinley, 1996; Peterson y col., 1977). La diferenciación de los conductos de Wolf es normal con vesículas seminales, vasos deferentes, epidídimo, y conductos eyaculadores. Los testículos ocasionalmente están localizados en el abdomen, pero usualmente se encuentran en el canal inguinal o en el escroto.

Esta alteración fenotípica en la diferenciación sexual masculina, se debe a una deficiencia en la producción de dihidrotestosterona, causada por mutaciones en el gen de la 5 α -R2.

La clonación del cDNA de la 5 α -R2 y una serie de experimentos de Sourthen blotting, han permitido identificar las mutaciones responsables de la deficiencia de la 5 α -R2. Se han identificado 33 mutaciones en el gen 5 α -R2 (Wilson y col., 1993; Nordenskjold y col., 1998; Vilchis y col., 2000; Zhu y col., 1998), en niños de Nueva Guinea, República Dominicana, y en Turquía donde la incidencia de pseudohermafroditismo es elevada. Los niños de Nueva Guinea presentan una delección de 20kb en el gen de la 5 α -R2 (Anderson y col., 1991). Los niños Dominicanos tienen una mutación en el exón 5, por sustitución de una timina por una citosina, que conlleva a una menor capacidad de unión al cofactor NADPH, un pH óptimo alterado y una menor actividad enzimática (Trigpen y col., 1992; Cai y col., 1996). Los niños de Turquía presentan una delección de una sola base en el exón 5, provocando un cambio en la estructura proteica que origina una pérdida completa de la actividad enzimática (Can y col., 1998). Recientemente se ha detectado en dos familias de Turquía (Behceci y col., 2005) una mutación sin sentido en el exón 2, debido al cambio de una glicina por una arginina (G123R) produciendo un severo pseudohermafroditismo.

Cuando llegan a la pubertad en estos individuos se produce una virilización con un aumento de la masa muscular, la voz se hace más grave (Imperato-McGinley y col., 1974), los genitales se agrandan con el crecimiento del falo, así como una hiperpigmentación del escroto, y los testículos inguinales descienden hacia el escroto.

La libido está intacta y son capaces de llevar a cabo erecciones (Imperato-McGinley y col., 1974; Imperato-McGinley y Peterson, 1979). La mayoría de los individuos son infértiles, presentando una oli- o azoospermia debido a que los testículos no han descendido (Cai y col., 1996; Peterson y col., 1977). Raramente, se ha observado individuos que llegan a ser fértiles (Zhu y col., 1998). La próstata es rudimentaria como la del tamaño de un niño prepuberal, y presentan poco vello facial y corporal (Akgun y col., 1986; Imperato-McGinley y col., 1974, 1991).

Aparte de la incapacidad de virilización en el nacimiento hay otras características clínicas de gran interés. Primero, en la pubertad los niveles plasmáticos de DHT llegan a estar dentro del rango normal (Walsh y col., 1974). Esto es debido a que la DHT circulante en esta enfermedad tiene dos orígenes; es sintetizada por la actividad residual de la enzima mutada, y fundamentalmente es sintetizada por la isoenzima 5α -R1 (Imperato-McGinley y col., 1991; Price y col., 1984). Segundo, el grado de virilización en el momento de la pubertad puede ser llamativo, y en algunos individuos los hábitos llegan a ser masculinos. Una posible explicación a esta masculinización en la pubertad, sería la elevada cantidad de testosterona que secretan los testículos durante esta fase del desarrollo. Esta T podría transformarse en el hígado y en la piel donde la expresión de la 5α -R1 es elevada, en DHT, que a su vez aumenta la expresión de 5α -R1 incrementando aún más la cantidad de DHT, dado que DHT regula de forma positiva la expresión génica del isoenzima 5α -R1, presentando una regulación feed-forward a nivel hepático (Torres y Ortega, 2003b). Este gran aumento de DHT circulante llegaría a diferentes órganos diana, entre ellos los genitales externos, que de esta manera podrían virilizarse.

La deficiencia de 5 α -R2 es una enfermedad que se hereda de forma autosómica recesiva como se ha evidenciado por; análisis pedigree (Imperato-McGinley y col., 1974, 1987), análisis bioquímicos (Imperato-McGinley y col., 1974, 1985), y análisis de genética molecular (Cai y col., 1996; Can y col., 1998; Trigpen y col., 1992).

Machos heterocigotos con una mutación en el gen 5 α -R2 tienen un fenotipo masculino normal. Hembras homocigotas con mutación en el gen 5 α -R2 tienen poco vello corporal y una elevada fertilidad (Katz y col., 1995; Milewich y col., 1995). La 5 α -R2 se expresa en el ovario (Eicheler y col., 1994), y una deficiencia en esta isoenzima decrece la producción de DHT, resultando en un aumento en el ratio de estrógeno/DHT, facilitando la ovulación y fertilidad (Katz y col., 1995).

7. Efectos de la 5 alfa-Reductasa tipo 1

Los ratones macho que carecen de 5 α -R1, no modifican a su virilidad y parece no tener consecuencias adversas la pérdida de este gen. La expresión de la isoenzima tipo 2 es normal en el macho mutado y se piensa que compensa la actividad perdida de la isoenzima tipo 1.

La 5 α -R1 tiene un importante papel en la reproducción y fertilidad, como se ha podido demostrar en ratones hembra que carecen de esta isoenzima (Mahendroo y Russell, 1999). En más del 70% de los ratones hembra preñadas que carecen de la isoenzima tipo 1, mueren los fetos a la mitad de la gestación, y un 30% presentan un

menor número de crías (Mahendroo y col., 1997). Estos defectos reproductivos ocurren en hembras homocigotas pero no en heterocigotas.

Las hembras que carecen del isoenzima tipo 1 presentan un ciclo estral, embarazo, incluyendo la fertilidad y el desarrollo fetal completamente normal (Mahendroo y col., 1997). Sin embargo, aproximadamente la mitad de los embriones mueren. El tiempo de muerte fetal, coincide con la inducción en la expresión del isoenzima tipo 1 en la decidua de hembras normales, entre los días 6 y 14 de gestación, y se correlaciona con una oleada en la síntesis de andrógenos originados en la placenta en el décimo día de gestación. Estas observaciones indican que un incremento de andrógenos (androstendiona y testosterona) a la mitad de la gestación, acoplado con la pérdida del isoenzima tipo 1, origina un exceso en la síntesis de estrógenos a partir de la aromatasas. Este exceso de estrógenos produce la muerte fetal (Mahendroo y col., 1997). Estos estudios revelan la función catabólica esencial que tiene la 5α -R1.

Durante el parto se produce un aumento de andrógenos 5α -reducidos. En hembras deficientes de 5α -R1, cuando se les administra andrógenos 5α -reducidos se les favorece el parto, por lo que indica que esta isoenzima tiene un papel anabólico en la fase tardía de la gestación (Mahendroo y Russell, 1999). La expresión de la 5α -R1 es inducida durante la fase tardía de la gestación. La 5α -R1 cataboliza la progesterona presente en el cuello del útero y cuando la isoenzima está ausente, el incremento de progesterona ocasiona un bloqueo en la maduración del cuello del útero, e impide el parto.

8. Patologías asociadas con la 5 alfa-reductasa

La excesiva actividad de la 5 α -R ha sido sugerida como un factor etiológico en una variedad de enfermedades incluyendo hipertrofia prostática benigna, carcinoma prostático, acné, hirsutismo, y calvicie.

8.1 Enfermedades prostáticas

La hipertrofia prostática benigna es un alargamiento progresivo de la glándula prostática produciendo una obstrucción del flujo urinario. La padecen más del 50% de los hombres a partir de los 50 años (Berry y col., 1984). El carcinoma de próstata (CP) ocupa el segundo lugar en frecuencia y mortalidad después del cáncer de pulmón.

El desarrollo, maduración y función de la glándula prostática, así como su progresión a HPB depende de andrógenos, fundamentalmente de DHT (Steers, 2001; McCrohan y col., 2006). La 5 α -R1 y 5 α -R2 están presentes en la próstata siendo la 5 α -R2 la isoenzima predominante (Torres y col., 2003). En HPB la actividad de la 5 α -R es de 2 a 3 veces superior a la que presenta un individuo normal (Bruchovsky y col., 1988). El finasteride, un inhibidor de la 5 α -R2 reduce rápidamente los niveles plasmáticos de DHT (Span y col., 1999), reduciendo el volumen prostático y aumentando el flujo urinario.

En el cáncer de próstata se plantea la cuestión si DHT es requerido para iniciar y mantener el adenocarcinoma prostático. Los individuos que presentan alta actividad 5 α -

R tienen mayor riesgo para desarrollar cáncer de próstata (Kantoff y Febbo 1997; Febbo y col., 1999). Sin embargo, pacientes que padecen cáncer de próstata sometidos a un tratamiento con finasteride no ha sido probado su efectividad (Luo y col., 2003). Interesantemente, la actividad de 5α -R1 es de 3 a 4 veces mayor en tejido prostático maligno que en benigno (Iele y col., 1999), pero la actividad de la 5α -R2 decrece en el cáncer de próstata (Thomas y col., 2005). Probablemente la DHT sintetizada por la 5α -R1 sea suficiente para mantener el crecimiento de las células cancerígenas (Thomas y col., 2005). Recientemente, se ha comprobado que un tratamiento con dutasteride un inhibidor de la 5α -R tipo 1 y tipo 2, conjuntamente con antagonistas del receptor androgénico, inhiben el crecimiento de líneas celulares de cáncer de próstata (Foster y Cunha, 1999, McCrohan y col., 2006).

8.2 Acné

Los andrógenos son los principales estimuladores de las glándulas sebáceas, y probablemente son los responsables del desarrollo, y crecimiento que sufren estas glándulas durante la pubertad (Lucky y col., 1994).

Las glándulas sebáceas presentan actividad 5α -R (Takayasu y col., 1980), y la actividad 5α -R es mayor en muestras de piel con acné que en piel normal (Sansone-Bazzano y Reisner, 1971). La 5α -R1 es la isoenzima que predomina en las glándulas sebáceas, DHT es el andrógeno esencial en la maduración de las glándulas sebáceas, por lo tanto, la inhibición de esta isoenzima debe ser beneficioso para tratar el acné

(Thiboutot y col., 2000). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el tratamiento del acné con inhibidor de la 5α -R1 es inefectivo (Leyden y col., 2004).

Se pensaba que la 5α -R2 jugaba un importante papel en el acné, dado que individuos con deficiencia en 5α -R2 no presentan acné (Imperato-MacGinley y col., 1974). No obstante, se ha observado que individuos con deficiencia en 5α -R2 presentan la misma producción de sebo que individuos normales (Imperato-MacGinley y col., 1991). Además, los individuos que presentan HPB y son tratados con finasteride no se ve alterada la producción de sebo (Imperato-MacGinley y col., 1993). Esas observaciones sugieren que la actividad de la 5α -R2, no es necesaria para el desarrollo del acné.

8.3 Calvicie

Hipócrates se dio cuenta que los eunucos de la armada persa nunca se quedaban calvos. O sea, que la castración poco antes o poco después de la pubertad prevenía la calvicie. La isoenzima 5α -R2 es la predominante en el folículo piloso (McPaul y Young M, 2001), actualmente no hay evidencias que individuos con deficiencia en 5α -R2 presenten calvicie. La DHT se une a los receptores androgénicos del folículo piloso e induce la miniaturización del pelo. Dos diferentes inhibidores de 5α -R, 4-AM (Rittmaster y col., 1987) y finasteride (Diani y col., 1992) han demostrado ser eficaces como tratamiento para la calvicie.

8.4 Hirsutismo idiopático

El hirsutismo es la excesiva producción de pelo en áreas asociadas a madurez sexual masculina. El hirsutismo idiopático es fundamentalmente ocasionado por una sobreproducción de andrógenos (Serafíni y Lobo, 1985). La 5α -R tipo 1 y tipo 2 están presentes en el folículo piloso, presentando una mayor actividad la 5α -R1 (Skalba y col., 2006). Durante mucho tiempo se ha pensado que el hirsutismo idiopático femenino se debe a una alta cantidad de DHT, debido a una alta actividad de 5α -R2 (Kutten y col., 1977). Ya que los individuos que carecen de 5α -R2 no presentan un patrón de vello con características masculinas, y tratamientos con antiandrógenos reducen eficazmente el vello en mujeres que padecen hirsutismo (Randall, 1994). Sin embargo, estudios recientes han observado que no hay una correlación entre el grado de hirsutismo y la expresión de las isoenzimas 5α -R, por lo que la actividad de la 5α -R no es el principal responsable del hirsutismo idiopático (Skalba y col., 2006). Actualmente no se conocen los factores que determinan el desarrollo y la intensidad del hirsutismo (Rodríguez-Dorantes y col., 2002; VanGils y col., 2003; Cicek y col., 2004).

9. 5 alfa-Reductasa en el cerebro

9.1 Distribución en el cerebro

El cerebro contiene la enzima 5α -R ampliamente distribuida en varias áreas del mismo (Celotti y col., 1992; Negri-Cesi y col., 1996). La isoenzima tipo 1 es la

predominante en el cerebro de humanos y roedores. Se conoce muy poco sobre la distribución de la isoenzima tipo 2 en el cerebro, ya que se encuentra en muy baja concentración. Mediante estudios histoquímicos se ha encontrado la 5α -R2 en algunas áreas del SNC de humano (cerebelo, pons, bulbo raquídeo, hipotálamo (Thigpen y col., 1993).

Usando la técnica RT-PCR, se ha visto que todo el cerebro de rata contiene altos niveles de 5α -R1, mientras que la expresión de la isoforma tipo 2 es baja y varía con la edad del animal, siendo máxima en el periodo perinatal y ausente o extremadamente baja en adulto (Poletti y col., 1996). Mediante el método RT-PCR se ha detectado la expresión de la isoenzima tipo 2 en la corteza prefrontal de rata adulta (Torres y Ortega, 2003a; Torres y Ortega, 2006). A pesar de la alta sensibilidad de este método la expresión de 5α -R2 ha sido detectada en muy pocas regiones, probablemente se deba a que se expresa en muy pocas áreas localizadas del cerebro (Celotti y col., 1997).

Varios datos obtenidos en roedores (ratón y rata) (Hauser y col., 1987; MacLusky y Clark, 1987), en anfibios (Jurman y col., 1982), y en humanos (Thigpen y col., 1993) indican que el cordón espinal (CS) y el bulbo raquídeo contiene una elevada actividad 5α -R. La actividad enzimática 5α -R en el CS, incrementa progresivamente en dirección craneocaudal. Mediante la técnica RT-PCR se ha demostrado que ambas isoenzimas están presentes en el cordón espinal (CS) de rata (Pozzi y col., 2003; Patten-Mensah y col., 2004). La actividad enzimática medida en el CS a pH ácido es típica de la isoenzima tipo 2, detectándose bajos niveles a pH neutro (Pozzi y col., 2003), por tanto, la isoenzima tipo 2 es la predominante en el CS.

Usando una técnica de hibridación “*in situ*” se ha observado que 5α -R2 está presente en las células motoneuronas del asta anterior del cordón espinal, donde se expresan altos niveles de receptores androgénicos (Pozzi y col., 2003). La expresión selectiva de la isoforma tipo 2 está asociada a los conocidos efectos que ejercen los andrógenos sobre el crecimiento motoneuronal, desarrollo y regeneración (Matsumoto, 1988; Yu, 1989). Por ejemplo, la DHT es necesaria en el periodo peri y post-natal para inducir la completa masculinización de los núcleos sexo dimórfico del bulbocavernoso (SNB), en el cordón espinal lumbar de rata (Goldstain y Sengelaub, 1994).

La isoenzima tipo 1 en el cordón espinal está asociada a las estructuras de mielina presentes en esta región. Laubert y Lichtensteiger, (1996) han mostrado en el cerebro de rata adulta, por hibridación “*in situ*” utilizando una sonda específica para la isoenzima tipo 1, que la mayor expresión de la enzima está presente en las estructuras de sustancia blanca. La presencia de alta actividad de la 5α -R tipo 1 en esos componentes del SNC, debe explicarse por el hecho de que la enzima se encuentra asociada a las membranas de mielina. Al purificar la mielina aparece una actividad de ocho veces mayor que en el cerebro homogenizado (Melcangi y col., 1988). Las propiedades de las isoenzimas 5α -R presentes en la mielina, han sido estudiadas en una serie de análisis cinéticos, llevados a cabo a pH neutro, que han confirmado que la actividad enzimática medida es en gran parte debido a la isoenzima tipo 1 (Poletti y col., 1997). La actividad del enzima es muy alta en el período postnatal cuando los procesos de mielinización son muy activos (Melcangi y col., 1988). Todos estos datos nos indican que la enzima responsable de la formación de Dihidrotestosterona y Dihidroprogesterona en la mielina es la 5α -R1.

La distribución celular de la actividad 5α -R en los diferentes tipos celulares que constituyen el SNC, ha sido estudiada en células aisladas de preparaciones frescas y en cultivos celulares de cerebro de rata (Celotti y col., 1991; Melcangi y col., 1990). Los resultados obtenidos indican que las neuronas convierten la T a DHT, en cantidades mayores que los oligodendrocitos y astrocitos (Celotti y col., 1991; Melcangi y col., 1990). En conclusión, parece que todo el cerebro posee actividad 5α -R, pero las neuronas presentan mayor actividad para esta enzima que las células gliales (Celotti y col., 1997).

9.2 Las isoenzimas 5α -R durante la ontogénesis y diferenciación sexual del cerebro

Una de las claves fisiológicas que ocurre durante el desarrollo y diferenciación del cerebro fetal, es la inducción de estructuras permanentes sexo-específico en el hipotálamo y en algunas otras áreas específicas del cerebro. Este mecanismo “imprinting”, en rata ocurre durante el periodo crítico de vida prenatal y postnatal temprana, dirigiendo la organización género-específica del circuito neuronal, que controla un amplio espectro de funciones cognitivas, neuroendocrinas y conductuales (McEwen, 1999; Negri-Cesi y col., 1999).

La diferenciación sexual del cerebro en rata depende de los niveles de testosterona circulantes durante la vida prenatal y postnatal temprana. En los machos la activación del gen SRY, presente en el cromosoma Y, dirige la diferenciación de los genitales hacia testículos e inicia la producción de andrógenos. Por lo tanto, en machos la circulación de los niveles de testosterona incrementa progresivamente y muestra un

patrón característico con dos picos. En rata, los picos de testosterona ocurren en los días de gestación (GD) 17-19 (Weisz y Ward, 1980) y al cabo de unas pocas horas del nacimiento (Corbier y col., 1978). Esos picos son considerados como el “factor de organización”, que permite el desarrollo de la red neuronal, y cuando es “activado” por andrógenos en el individuo adulto son la respuesta de un patrón típico de macho (Colciago y col., 2005).

La hipótesis de que la testosterona endógena influye sobre la organización estructural del SNC durante el periodo prenatal, está apoyado por la observación que al suministrarle testosterona exógena a rata hembra neonatal, su cerebro se masculiniza anatómicamente y funcionalmente (Gorski y col., 1980; Guillamon y Segovia, 1997). Por el contrario, cuando la rata macho neonatal es castrada, se produce una feminización del núcleo sexo dimórfico del área preóptica (SDN-POA) y un comportamiento sexual femenino (Gorski y col., 1980). La testosterona probablemente no masculiniza el cerebro en su estado nativo, sino que requiere ser metabolizada a otra forma activa. Los dos caminos enzimáticos implicados en la activación de la testosterona son; la aromatasa que transforma la testosterona a estradiol y la 5 α -reductasa que transforma la testosterona a DHT. El estradiol ejerce efectos en la masculinización del cerebro (MacLusky, 1981), mediados por el receptor estrogénico. La DHT puede ejercer efectos masculinizantes o desmasculinizantes dependiendo del núcleo estudiado. Cuando se les inyecta DHT a ratas machos durante el período perinatal, induce una reducción drástica en el volumen del bulbo olfatorio accesorio, cuyos núcleos adquieren dimensiones similares a los que presentan las hembras (Valencia y col., 1992). Sin embargo, DHT es necesaria en el periodo peri- y postnatal, para inducir una completa masculinización en

los núcleos espinales sexo dimórficos del bulbocavernoso del cordón espinal lumbar de rata (Goldstain y Sengelaub, 1992).

El hecho que la formación de DHT ocurra con alto rendimiento en algunas estructuras particulares del cerebro, tales como la amígdala, el hipotálamo y el cordón espinal (las cuales son además particularmente ricas en receptores androgénicos) (Martini, 1982), sugiere que al menos, en esas estructuras fetales y neonatales los andrógenos deben de actuar vía receptor de andrógenos activado por DHT.

Actualmente, no se conoce mucho sobre el papel de los andrógenos 5α -reducidos en el control de la diferenciación sexual, y los posibles mecanismos de control en la expresión de las isoenzimas 5α -R en las diferentes fases de vida.

En el cerebro la 5α -R1 es ampliamente distribuida y está presente tanto en las neuronas como en las células gliales (Poletti y col., 1997). Además, hay elevados niveles de mRNA de la 5α -R1 en todo el cerebro de rata, que permanecen estables desde la mitad de la gestación hasta adulto, con la excepción de un suave incremento justo antes del nacimiento y en la primera semana de vida (Poletti y col., 1998). Los niveles de expresión de la 5α -R1 no se ven afectados por la presencia de testosterona circulante. En ambos sexos los niveles de mRNA de la 5α -R1 son mayores en el nacimiento que prenatalmente (Colciago y col., 2005), y no hay diferencias significativas en la expresión de dicho isoenzima entre macho y hembra (Karolczak y col, 1998).

Por el contrario, la expresión de la 5 α -R2 en rata es baja durante la gestación y va incrementando progresivamente por todo el cerebro al final de la gestación. Presenta altos niveles durante la vida postnatal temprana, que decrecen gradualmente, llegando a ser bajos en el estado adulto (Poletti y col., 1998). Esta tendencia es similar en ambos sexos, pero la expresión de los niveles es más pronunciada en machos que en hembras (Negri-Cesi y col., 2004; Colciago y col., 2005). Este patrón de expresión parece estar correlacionado con los niveles de secreción de testosterona del testículo fetal, indicando que la 5 α -R2 debe de ser modulado por andrógenos. La expresión transitoria de la 5 α -R2 coincide con el periodo crítico en el desarrollo del cerebro hacia macho, cuando la concentración de andrógenos circulantes y receptores androgénicos en el SNC (Meaney y col., 1985) son muy elevados. Por ello, se piensa que esta isoforma es muy importante durante el periodo de diferenciación sexual del cerebro. Esta hipótesis fue reforzada por la observación de que flutamida, un antagonista de los receptores androgénicos, es capaz de abolir el pico de expresión de la 5 α -R2 presente en el cerebro de macho durante el periodo embrionario hasta el nacimiento. Es interesante observar como el mismo antiandrógeno fue mucho menos efectivo en hembras. Por lo tanto, el mecanismo de control de la isoenzima tipo 2 es diferente en el cerebro de macho y hembra (Poletti y col., 1998).

Los andrógenos parecen desencadenar en macho la expresión de la 5 α -R2, mientras que en hembra debe estar además implicado otro mecanismo de control. Interesantemente, en el cultivo de neuronas de hipotálamo la expresión de la 5 α -R2 está altamente inducida por testosterona, mientras que la expresión de la 5 α -R1 permanece invariable durante el tratamiento (Poletti y col., 1998). La inducción de la 5 α -R2 por

testosterona parece ser debida a la activación de receptores androgénicos, porque DHT es capaz de inducir este efecto, mientras que el estradiol es incapaz de inducir la expresión del gen 5α -R2.

La 5α -R1 está constantemente presente en todos los estadios del desarrollo y está ampliamente distribuida en el cerebro, metabolizando andrógenos, progesterona y otros esteroides, solamente cuando los sustratos llegan a altas concentraciones en el interior de la célula. Dada la baja afinidad por el sustrato (Normington y Russell, 1992), ha llevado a hipotetizar que 5α -R1 debe presentar una función catabólica importante, protegiendo a las neuronas del exceso de hormonas esteroideas (Behl y col., 1997).

La implicación de la 5α -R2 en macho sobre el mecanismo de diferenciación sexual del cerebro es desconocido, los ratones con deficiencia en este isoenzima (Mahendroo y col., 2001) presentan una adecuada identidad y comportamiento sexual. Esto sugiere que la 5α -reducción de andrógenos no es tan importante como su aromatización en el mecanismo de diferenciación sexual del cerebro. El papel de la 5α -R2 en hembra es desconocido, la carencia de esta isoenzima no afecta ni al desarrollo ni a otras funciones del sistema reproductivo (Mahendroo y Russell, 1999).

10. Regulación en la expresión de la 5 alfa-Reductasa

La regulación en la expresión de la 5α -reductasa ha sido estudiada en diferentes tejidos, y se ha demostrado que está regulada por andrógenos en un gran número de tejidos y especies.

Los primeros estudios se realizaron en próstata de rata, un tejido dependiente de andrógenos. La castración de rata macho causa una regresión en el tamaño de la próstata (Moore y col., 1930). La regresión está causada por apoptosis de células epiteliales del lumen (Raff, 1992), siendo este efecto rápidamente revertido o prevenido mediante la administración de extractos de testículo (Moore y col., 1930). Estudios llevados a cabo en los años 70, mostraron que la castración y la readministración de T conducían a una marcada inducción de la actividad enzimática (Moore y col., 1973), sugiriendo que la DHT era el andrógeno responsable en este proceso. Además, se demostró que el tratamiento de ratas intactas con inhibidores de la 5α -R también conducía a la regresión de la próstata, y este efecto podría revertirse mediante la administración de DHT (Brooks y col., 1981). Estudios recientes, han demostrado que la expresión de ambas isoenzimas 5α -R están regulados de forma positiva por andrógenos, ya que los niveles de mRNA de ambas isoenzimas disminuyeron de forma significativa tras la castración (aunque el efecto fue mayor para 5α -R2), y aumentaron significativamente tras la administración de T y DHT (Torres y col., 2003). En animales castrados, la DHT ejerce un efecto positivo en la expresión génica de ambas isoenzimas, aunque este efecto fue menor que el conseguido con el tratamiento con T. El hecho de que DHT incremente los niveles de mRNA de 5α -R representa una situación inusual, en la cual el producto del enzima es responsable de la regulación de la expresión de los genes que codifican el enzima. Este mecanismo de regulación *feed-forward* juega un papel fundamental en varios sistemas del desarrollo, especialmente en situaciones en las que la concentración local de una molécula debe ser drásticamente incrementada para dar un patrón de diferenciación definido (Meinhadt, 1978). La próstata podría ser un ejemplo de esto,

explicando la necesidad de regular la concentración intraprostática de DHT (Torres y col., 2003).

Ahora bien si nos fijamos en el hígado, un órgano multifuncional encargado, entre otras funciones, del metabolismo de las hormonas esteroideas. Por este motivo, el hígado dispone de todas las enzimas necesarias para dicho metabolismo incluido la enzima 5 α -R. La 5 α -R había sido considerada como una enzima exclusivamente catabólica, cuya única misión sería actuar sobre las hormonas esteroideas con doble enlace en posición $\Delta^{4,5}$ para producir metabolitos 5 α -reducidos más hidrosolubles, y por tanto más fáciles de eliminar. Al igual que en próstata la expresión de 5 α -R1 (isoenzima predominante del hígado) están regulados de forma positiva por andrógenos (T y DHT) (Torres y Ortega, 2003b), confirmando la regulación *feed-forward* ejercida por DHT sobre su propia biosíntesis. La expresión de 5 α -R1 hepática es mayor en hígado de rata hembra que en machos, y su regulación por T es diferente en ambos sexos (Torres y Ortega 2003b; Torres y Ortega 2004a). Por lo que se piensa que la función de 5 α -R hepática en la hembra no sólo sea la catabólica, sino que podría intervenir en otras funciones fisiológicas, tales como la síntesis de metabolitos 3 α 5 α -reducidos que son potentes moduladores del receptor GABA_A (Torres y Ortega, 2004a).

Mediante una técnica de RT-PCR competitiva desarrollada por nosotros, hemos demostrado que en la corteza prefrontal de cerebro de rata adulta se expresan ambos isoenzimas de la 5 α -R, aunque mayoritariamente 5 α -R1. La expresión de ambos isoenzimas, así como su regulación por testosterona y DHT es diferente en ratas macho y hembra adultas (Torres y Ortega, 2003a, 2006). Todo ello, nos hace suponer que la

isoenzimas 5α -R juegan un papel decisivo en el dimorfismo sexual en el cerebro de rata, y nos sugiere el presente trabajo.

1. Estudiar la transcripción de los genes 5α -R1 y 5α -R2, y su regulación por T y DHT en corteza prefrontal de rata macho y hembra en el periodo de diferenciación sexual del Sistema Nervioso Central.
2. Estudiar en la corteza prefrontal de rata macho y hembra adulta, la transcripción de los genes 5α -R1 y 5α -R2 y su regulación por los niveles neonatales de T y DHT, así como por los valores de estas dos hormonas en la edad adulta.
3. Estudiar la transcripción de los genes 5α -R1 y 5α -R2 en corteza prefrontal de ratas adultas sometidas a estrés físico y estrés medioambiental.

1. Material fungible e inventariable

Puntas de pipeta automática con filtro de 200-1000 μ l

Puntas de pipeta automática con filtro de 20-200 μ l

Puntas de pipeta automática con filtro de 0.1-10 μ l

Tubos eppendorf de 2ml. Daslab.

Tubos eppendorf de 1.5 ml. Aslab.

Tubos eppendorf de 0.5 ml. Daslab.

Tubos de PCR 0.2 ml. MicroAmp® PCR tubes Perkin-Elmer.

Todos los reactivos utilizados de alto grado de pureza, fueron suministrados por Sigma-Aldrich, Panreac, Merck y Scharlau, salvo que se indique lo contrario.

Pipeta automática 200-1000 μ l Boeco.

Pipeta automática 50-200 μ l Boeco.

Pipeta automática 5-50 μ l Boeco.

Pipeta automática 0.5-10 μ l Boeco.

Pipeta automática 0.1-2.5 μ l Eppendorf.

Guillotina

Homogenizador Polytron

Agitador de tubos IKA minishaker 2.

Centrífuga Beckman TJ-6.

Microcentrífuga de mesa Eppendorf 5410.

Microondas Samsung M1713.

Autoclave P-Selecta.

Balanza de precisión AND ER-60^a.

Sistema Elecsys 2010.

Contador gamma Berthold GC-360.

Lector de placas de ELISA, Bio-Rad.

Tanques de N₂ líquido.

Frigorífico 4 °C.

Congelador -20 °C.

Congelador -80 °C.

Máquina de hielo Difri.

Termobloque P-Selecta®.

Sistema de electroforesis horizontal, Bio-Rad MiniSu Cell GT.

Transiluminador UV Bio-Rad Mini-transiluminator.

Fuente alimentación Bio-Rad 3000

Cámara Polaroid Bio-Rad.

Espectrofotómetro Shimadzu UV-VIS 1600.

Termociclador PE-Applied Biosystem 2400.

Analizador genético ABIPRISM310 Genetic Analyzer y software asociado.

Aparato de estrés medio ambiental de ratas

Jaula tipo III alta 265 x 180 x 420 Pilisfon (RATAS)

2. Animales de experimentación

Ratas neonatales macho y hembra de la raza Wistar. Las ratas neonatales estaban en las jaulas junto a sus madres para ser amamantadas. Hubo que comprobar si se alimentaban bien. Para ello, se mira la piel y dado que la tienen muy fina y se transparenta la leche, se puede ver si el estómago está lleno. Si el estómago está vacío hay que cambiarlas a otra madre inmediatamente y comprobar que la alimentación se lleva a cabo correctamente. Con esto se evita que los efectos de malnutrición actúen como una variable. Cuando alcanzaron los 22 días de vida las ratas se destetaron, alojándose en jaulas separadas.

Ratas macho adultas de peso 260-280 g. y ratas hembra adultas de peso 180-200 g. en ambos casos de la raza Wistar. Las ratas eran alimentadas con dieta estándar de mantenimiento A04 (Panlab) y agua *ad lib*. Las ratas eran mantenidas en animalario con aire acondicionado e iluminación desde las 7:00 horas hasta 19:00 horas.

Los experimentos se realizaron acorde a la guía NIH para el “Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.”

2.1 Ratas neonatales

Las ratas neonatales macho y hembra se dividieron al azar en los siguientes grupos:

- Ratas macho sin tratamiento, que servían como controles (M).

- Ratas macho tratados con vehículo (M+V).
- Ratas macho tratadas con Testosterona (M+T).
- Ratas macho tratadas con Dihidrotestosterona (M+DHT).
- Ratas hembra sin tratamiento, que servían como controles (H).
- Ratas hembra tratadas con vehículo (H+V).
- Ratas hembra tratadas con Testosterona (H+T).
- Ratas hembra tratadas con Dihidrotestosterona (H+DHT).

2.2 Ratas adultas

2.2.1 Ratas adultas no tratadas neonatalmente (Grupo control)

- Ratas macho intactas (I).
- Ratas macho orquidectomizadas (C).
- Ratas macho orquidectomizadas tratadas cuando adultas con Testosterona (C+T).
- Ratas macho orquidectomizadas tratadas cuando adultas con Dihidrotestosterona (C+DHT).
- Ratas hembra intactas (I).
- Ratas hembra ovariectomizadas (O).
- Ratas hembra ovariectomizadas tratadas cuando adultas con Testosterona (O+T).

- Ratas hembra ovariectomizadas tratadas cuando adultas con Dihidrotestosterona (O+DHT).

2.2.2 Ratas adultas tratados neonatalmente con T

- Ratas macho intactas (I).
- Ratas macho orquidectomizadas (C).
- Ratas macho orquidectomizadas tratadas cuando adultas con Testosterona (C+T).
- Ratas macho orquidectomizadas tratadas cuando adultas con Dihidrotestosterona (C+DHT).
- Ratas hembra intactas (I).
- Ratas hembra ovariectomizadas (O).
- Ratas hembra ovariectomizadas tratadas cuando adultas con Testosterona (O+T).
- Ratas hembra ovariectomizadas tratadas cuando adultas con Dihidrotestosterona (O+DHT).

2.2.3 Ratas adultas tratadas neonatalmente con DHT

- Ratas macho intactas (I).
- Ratas macho orquidectomizadas (C).

- Ratas macho orquidectomizadas tratadas cuando adultas con Testosterona (C+T).
- Ratas macho orquidectomizadas tratadas cuando adultas con Dihidrotestosterona (C+DHT).
- Ratas hembra intactas (I).
- Ratas hembra ovariectomizadas (O).
- Ratas hembra ovariectomizadas tratadas cuando adultas con Testosterona (O+T).
- Ratas hembra ovariectomizadas tratadas cuando adultas con Dihidrotestosterona (O+DHT).

2.3 Tratamientos hormonales recibidos

2.3.1 Tratamiento en el periodo neonatal

El tratamiento consistió en una inyección diaria vía subcutánea (s.c.) con vehículo (aceite de sésamo) a los grupos M+V y H+V. Los grupos tratados con Testosterona M+T y H+T, recibieron una inyección diaria vía s.c. con vehículo (aceite de sésamo) que contenía T. Los grupos tratados con Dihidrotestosterona M+DHT y H+DHT, recibieron una inyección diaria vía s.c. con vehículo que contenía DHT. Los tratamientos se hicieron desde el día 5 hasta el día 12 de vida postnatal (P5-P12). Las dosis de T eran 12 mg/Kg de peso durante los días 5, 6, 7, y 8 y 15mg/Kg de peso en los días 9, 10, 11, y 12. Las dosis de DHT eran 12 mg/Kg de peso durante los días 5, 6, 7, y 8 y 15mg/Kg de peso en los días 9, 10, 11, y 12, siguiendo el protocolo de Valencia y

col., (1992). A los 12 días de vida los animales fueron decapitados dos horas después de la última inyección.

2.3.2 Tratamiento en la edad adulta

Un grupo de ratas que habían sido tratadas neonatalmente con T (M+T, H+T) y DHT (M+T, H+DHT), cuando alcanzaron su estado adulto se les sometió al siguiente tratamiento:

El tratamiento consistió en inyecciones subcutáneas (s.c.) con vehículo (aceite de sésamo) que contenía Propionato de Testosterona (T_p , 1 mg/Kg de peso y día) a los grupos C+T y O+T, el tratamiento se realizó con una frecuencia de tres días por un periodo de dos semanas. Los grupos C+DHT y O+DHT recibieron inyecciones vía s.c. con vehículo que contenía Propionato de Dihidrotestosterona (DHT, 1mg/Kg de peso y día) el tratamiento se realizó con una frecuencia de tres días por un periodo de dos semanas. Los grupos I, C, y O recibieron inyecciones de aceite de sésamo vía s.c. en los mismo días.

Gonadectomía

Un grupo de ratas cuando alcanzaron su estado adulto fueron gonadectomizadas. La gonadectomía se realizó bajo anestesia con equitensina (2ml/Kg de peso), mediante orquidectomía en la rata macho y ovariectomía bilateral en la rata hembra.

Los animales permanecieron orquidectomizados y ovariectomizados durante 7 días, a partir de los cuales recibieron el tratamiento hormonal sustitutivo en los grupos pertinentes.

2.4 Ratas adultas estresadas

2.4.1 Ratas sometidas a estrés físico por natación

Ratas macho adultas de la raza Wistar fueron sometidas a un estrés agudo (Hovoundjian y col., 1986; Schwartz y col., 1987) por natación forzada durante 5 minutos, en agua a temperatura ambiente (22 °C), dentro un contenedor cilíndrico lleno al 75% de su capacidad, siguiendo el protocolo de Purdy y col., 1991. Transcurridos los 5 minutos, las ratas fueron retiradas del contenedor, secándolas suavemente con toallas y metiéndolas en jaulas.

A los 15 minutos después del estrés las ratas fueron decapitadas.

2.4.2. Ratas sometidas a estrés medio ambientalmente

Ratas macho y hembra adultas de la raza Wistar fueron sometidas a un estrés medio ambiental. Dicho estrés consistía en introducir al animal en un aparato de estrés que presenta tres fuentes estresantes: luz 2500 luxes, calor 32 °C, e inmovilización. (Ward, 1972, Science). La duración de las sesiones de estrés fueron de 45 min., tres veces al día a las 9h, 13 h, 17h. durante 10 días.

El último día a los 15 minutos después de la sesión de las 9h las ratas fueron decapitadas.

3. Recogida de muestras

3.1 Recogida de sangre

La sangre se obtuvo por decapitación y se realizó sin anestesia para evitar posibles efectos adversos de la misma, ya que es conocido que la anestesia provoca una situación de estrés. Las muestras de sangre eran recogidas en tubos que contenían heparina y fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 15 min. El plasma era separado y guardado a -80 °C hasta que la medida hormonal se realizó.

3.2 Recogida de cerebro

Inmediatamente después de la decapitación, el cerebro fue extraído, congelado en nitrógeno líquido y guardado a -80 °C hasta el análisis. La disección del área de la corteza prefrontal (PFC) se realizó tomando como referencia el Atlas estereotáxico del cerebro de rata Paxino y Watson (1986).

Una vez extraído el cerebro se dividen los dos hemisferios con un corte sagital y a su vez, de cada hemisferio se hacen dos cortes coronales delimitados por los planos coronales entre 3.7 mm – 2.2 mm anteriores a bregma del Atlas. Posteriormente, de

cada lámina se separa un rectángulo que delimita las áreas; corteza singular anterior, prelímbica e infralímbica.

4. Análisis hormonal

Las concentraciones plasmáticas de testosterona (T) se realizaron por radioinmunoensayo (RIA) en un contador gamma, utilizando un kit comercial de DiaSorin (Vercelli, Italia). Los coeficientes de variación intra-e-inter-ensayo, fueron 2.1 y 4.3%, respectivamente, y la sensibilidad fue de 0.02 ng/ml.

Las concentraciones plasmáticas de Dihidrotestosterona (DHT) se midieron por ELISA directo (Diagnostic Biochem Canada, Ontario, Canada). Los coeficientes de variación intra- e inte-ensayo fueron 5.9% y 7.5%, respectivamente, y la sensibilidad fue de 6.0 pg/ml.

Las concentraciones plasmáticas de corticosterona se realizaron por radioinmunoensayo (RIA) en un contador gamma, utilizando un kit de ICN (BiomedicalInc Costa Mesa California). Los coeficientes de variación intra-ensayo fueron 4.4% y 3.4%, respectivamente.

Las concentraciones plasmáticas de ACTH se realizaron por radioinmunoensayo (RIA) en un contador gamma, utilizando un kit inmunoradiométrico (CIS

Biointernational, Gif-Ur Yvette Cedex, France). Los coeficientes de variación intra-ensayo fueron 4.4% y 3.4%, respectivamente.

5. Extracción de RNA y cuantificación

La extracción de RNA total del cerebro de rata se realizó mediante Tiocionato de Guanidina-Fenol-Cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987). Brevemente, el método consistió en homogenizar 25 mg de tejido en una solución desnaturizante (Tiocionato de guanidina 4M, N-guanidina 4M, N-lauril-sarcosina 0.5%, β -mercaptoetanol 0.1M en tampón de citrato sódico 25 mM, pH 7.0) usando un homogenizador Polytron Kinetica PT 1200. Se centrifuga a 13000 rpm. durante 2 min. Al sobrenadante se le añade Acetato sódico (3M, pH 5.0), Fenol equilibrado en tampón citrato (0.1M, pH 4.2) y Cloroformo-Isoamílico (24:1), siempre en una proporción 50% fase acuosa 50% fase orgánica y se mezcla. Separamos las fases por centrifugación a 13000 rpm. durante 5 min. Repetir la extracción orgánica. Recogemos la fase acuosa y se añade cloroformo-isoamílico (24:1). Separamos las fases por centrifugación a 13000 rpm. durante 5 min. El RNA es precipitado con isopropanol al 60% durante toda la noche a -20°C . Centrifugamos 30 minutos a 13000 rpm. a 4°C y decantamos el isopropanol. Lavamos el pellet de RNA con 1 ml de etanol 75% frío. Centrifugamos 5 minutos a 13000 rpm. Repetimos el lavado. El RNA se resuspende en agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC). Evaporamos los restos de etanol a 70°C en termobloque.

Se trata con Dnasa para degradar el DNA genómico contaminante en la extracción del RNA. Para degradar el DNA contaminante se tomaron 9 µl de la muestra de RNA previamente resuspendida, 0.8 µl de 1.0 U/µl DNasa I, y 0.2 µl de 40 U/µl RNasaOUT y se incubó a 37°C durante 15 min. Para inactivar la DNasa se incubó a 72°C durante 15 min. Congelar a -80°C.

Una vez extraído el RNA se comprobó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

6. Cuantificación del RNA

El RNA obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría, según:

$$C (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \epsilon \times F, \quad \text{siendo}$$

C = concentración, expresada en µg/ml

ε = coeficiente de extinción molar; para el RNA ε = 44,19

F = Factor de dilución. La dilución se realiza en agua y habitualmente es de 1:200 a 1:500.

La medida de absorbancia se realizó en cubetas de cuarzo y por triplicado, tomando el valor medio de A_{260} . No se consideran válidos valores de absorbancia < 0.1 o > 1 .

Para estimar la pureza de la muestra (exceso de sales, contaminación con proteínas o solventes orgánicos) la forma más fiable es medir la absorbancia entre 240nm y 340nm. Una muestra pura de ácidos nucleicos (AN) da una curva característica con máximos a 220 nm y 260 nm. A 320 nm la absorbancia es nula. Las pendientes de la curva son características del tipo de AN (RNA o DNA) y de la contaminación de otras moléculas.

Un método razonable de estimar la pureza consiste en relacionar la A_{260} (máximo de absorbancia de AN) con la A_{280} (máximo de absorbancia de las proteínas en este rango). Una muestra de RNA pura tiene una relación A_{260}/A_{280} de 2 ± 0.05 . Una muestra de DNA pura tiene una relación A_{260}/A_{280} de 1.8 ± 0.05 .

7. Diseño de oligonucleótidos usados para la amplificación

En el desarrollo experimental de esta tesis se ha utilizado una “one step” RT-PCR competitiva. Para ello vamos a utilizar como patrones internos competitivos dos moléculas sintéticas (estándar internos, IS) construidas, respectivamente a partir de la secuencia del plásmido pEGFP-C1.

Las secuencias de nucleótidos correspondientes a las isoenzimas 5 α -R tipo 1 y tipo 2 de rata se obtuvieron del GeneBank® (J05035, M95058), y la secuencia plasmídica pEGFP-C1 se obtuvo de la página web Clontech. Esas secuencias eran usadas para diseñar los pares de primers. Para el diseño de los oligos se utilizó el programa Prophet®. La secuencia de los oligos seleccionados se sometieron a una búsqueda de homología de secuencia mediante el algoritmo BLAST, para evitar amplificaciones inespecíficas.

Los primers de las isoenzimas 5 α -R son de 20 pb de longitud, mientras que los primers utilizados para sintetizar ambas moléculas competidoras fueron de 40 pb de longitud. Todos los primers forward estaban marcados con 6-carboxi-fluoresceína (6-FAM), en posición 5'. Los oligonucleótidos eran sintetizados por PE-Applied Biosystems, UK. La secuencia de los primers (5'-3') y el tamaño de los productos de PCR se muestran en la siguiente tabla:

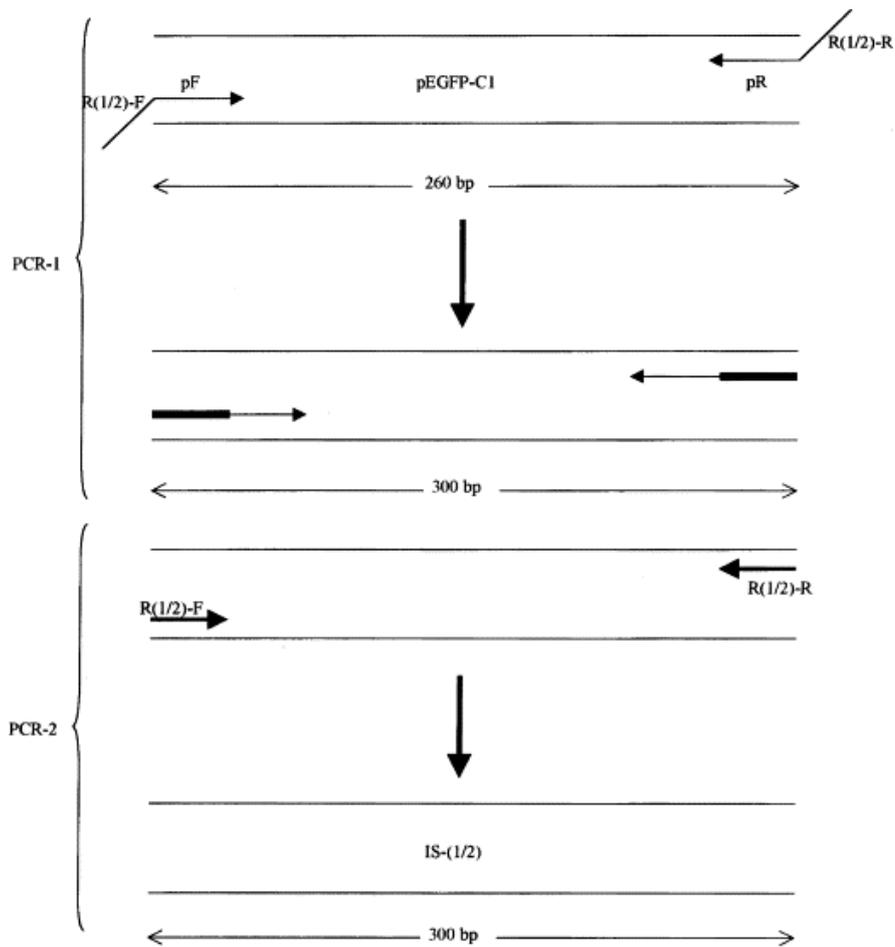
<i>Nombre</i>	<i>Secuencia de los primers (5'-3')</i>	<i>Tamaño (pb)</i>
R1-F	GAGATATTCAGCTGAGACCC	185
R1-R	TTAGTATGTGGGCAGCTTGG	
R2-F	ATTTGTGTGGCAGAGAGAGG	192
R2-R	TTGATTGACTGCCTGGATGG	
IS1-F	GAGATATTCAGCTGAGACCCACGTAAACGCCCAAGTTC	300

IS1-R	TTAGTATGTGGGCAGCTTGGTCTTGTAGTTGCCGTCGTCC	
IS2-F	ATTTGTGTGGCAGAGAGAGGACGTAAACGGCCACAAGTTC	300
IS2-R	TTGATTGACTGCCTGGATGGTCTTGTAGTTGCCGTCGTCC	

8. Construcción del Estándar Interno

Los dos estándares internos sintéticos (IS) DNAs de 300pb eran sintetizados a partir de la secuencia del plásmido pEGFP-C1 (Clontech, Palo Alto, CA), como previamente describieron (Torres y Ortega, 2004). Ambas moléculas competitivas, IS-1 (DNA competidor de 5 α -R-1), e IS-2 (DNA competidor de 5 α -R2), eran obtenidas después de dos amplificaciones consecutivas de pEGFP-C1, con los extremos 5' y 3' modificados para obtener la misma secuencia de nucleótidos que SRD5A1 o SRD5A2 (Torres y Ortega, 2004).

Para ello se diseñaron unos oligos de 40 nucleótidos de longitud, de manera que los 20 primeros nucleótidos del extremo 5' coinciden con la secuencia de los cebadores diseñados para amplificar respectivamente, cada isoenzima de la 5 α -Reductasa. Los 20 nucleótidos restantes en 3' anillan con la secuencia de nucleótidos del plásmido pEGFP-C1. Como se puede ver en el siguiente esquema:



Estos cebadores se diseñan para amplificar un fragmento de 260 p.b. del plásmido pEGFP-C1. Después de una primera PCR con estos cebadores, se consigue integrar la secuencia complementaria a los 20 primeros nucleótidos en 5' en un secuencia sintética de 300 p.b., cuyos extremos en 5' coinciden con la secuencia de nucleótidos donde anillan los cebadores que amplifican cada uno de las isoenzimas de la 5 α -Reductasa, es decir, tanto el estándar interno como el cDNA correspondiente a cada isoenzima de la 5 α -Reductasa van a compartir idénticas regiones de unión de los cebadores.

A continuación se realizó una segunda PCR de estos fragmentos sintéticos de 300 p.b., en esta ocasión con los oligos específicos para cada isoenzima de la 5 α -R (R1-F/R1-R para el IS-1 y R2-F/R2-R para IS-2).

La primera PCR era llevada a cabo en un volumen final de reacción de 50 μ l, conteniendo cada reacción contiene 1X PCR buffer (Perkin-Elmer, CA), 2mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 0.1 μ M de cada oligo (IS1-F/IS1-R o IS2-F/IS2-R), 100ng del plásmido pEGFP-C1 y 1.25 U AmpliTaq Gold DNA polimerasa (Perkin-Elmer). La segunda PCR era llevada a cabo en un volumen final de 50 μ l, contiendo 1X PCR buffer (Perkin-Elmer), 2 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 0.1 μ M de cada oligo (R1-F/R1R o R2-F/R2-R), 1.25 U AmpliTaq Gold DNA polimerasa (Perkin-Elmer) y 4 μ l de muestra del primer producto de PCR.

Las condiciones óptimas (temperatura y número de ciclos) para ambas amplificaciones se determinaron en experimentos preliminares. El programa para la primera PCR fue: desnaturalización a 94 °C durante 60 s; anillamiento a 56 °C durante 30s; y extensión a 72 °C durante 30 s; y el perfil de la segunda PCR fue: desnaturalización a 94 °C durante 30 s; anillamiento a 55 °C durante 30 s; y extensión a 72 °C durante 30 s. En cada PCR el número de ciclos fue de 35. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer 2400.

El producto de PCR correspondiente a cada estándar interno se precipitó con etanol, se purificó y se cuantificó por espectrofotometría a A_{260}/A_{280} nm. Por último, ya que conocíamos la secuencia de nucleótidos de cada fragmento sintético de DNA, se estimó el peso molecular medio de cada fragmento, y teniendo en cuenta el número de Avogadro ($1 \text{ mol} = 6.023 \times 10^{23}$ moléculas) se calculó el número de moléculas de cada estándar interno.

Ya que se conoce el número de copias de estándar interno que se añaden al comienzo de la amplificación, se puede calcular el número de copias de mRNA problema. El número de copias de cDNA problema se calculó obteniendo el ratio de fluorescencia entre el estándar interno y el cDNA problema. El ratio de fluorescencia varía de forma proporcional a la cantidad de estándar interno añadido al comienzo de cada amplificación, de manera que los resultados representan niveles de expresión real.

9. Eficiencia de amplificación de dos moléculas competidoras

El requisito más importante de la técnica de PCR competitiva es que la eficiencia de ambas moléculas, debe ser la misma durante todas las fases de amplificación. Matemáticamente puede comprobarse que dos moléculas competidoras se amplifican con la misma eficiencia según la ecuación:

$$N_{f\text{-prob}} = N_{0\text{-prob}} \times (1 + E_{\text{prob}})^n$$

$$N_{f-st} = N_{0-st} \times (1 + E_{st})^n \quad \text{Ec.1}$$

Donde:

N_{0-prob} : cantidad inicial del cDNA problema

N_{0-st} : cantidad inicial del DNA patrón

N_{f-prob} : cantidad final del cDNA problema, tras la amplificación

N_{f-st} : cantidad final del DNA patrón, tras la amplificación

E_{prob} : eficiencia de amplificación del cDNA problema

E_{st} : eficiencia de amplificación del DNA patrón

n : número de ciclos de PCR

Si la evolución de las eficiencias de ambas moléculas es exactamente la misma, hasta el ciclo n :

$$E_{prob} = E_{st} \quad \Rightarrow \quad N_{f-prob} / N_{f-st} = N_{0-prob} / N_{0-st} \quad \text{Ec.2}$$

De la ecuación 2 puede concluirse que, si las moléculas competidoras se amplifican con la misma eficiencia, la relación entre las cantidades de problema y patrón es la misma en todos los ciclos de la PCR, e incluso en la fase *plateau*.

Si la ecuación 2 representamos en forma logarítmica:

$$\log (N_{f-prob} / N_{f-st}) = \log (N_{0-prob}) / \log (N_{0-st}) \quad \text{Ec. 3}$$

Y en analogía a la ecuación de una recta:

$$Y = b-x$$

Donde:

$$Y : \log (N_{f-pro} / N_{f-st})$$

$$b : \log (N_{0-pro})$$

$$x : \log (N_{0-st})$$

Con al menos dos RT-PCR paralelas, en los que se mantiene fija la cantidad de problema y se varía la cantidad de patrón añadido, para un número fijo de ciclos, se obtiene (a partir de la ecuación 3) una recta cuya pendiente ideal a de ser exactamente igual a -1. Si esto se verifica, puede concluirse que la evolución de las dos moléculas competidoras es la misma, hasta el ciclo n (Zhang, 1997).

Para analizar los datos debemos de mantener constante el número de ciclos y la cantidad de RNA inicial y variar la cantidad de patrón, aparece una recta de pendiente -1 sobre la que se interpola el punto $(x_0, 0)$ en el que $y = 0$. (Raeymakers 1993; Bolton y col., 1996).

Según la ecuación 3.

$$Y = 0 \implies \log (N_{f-pro} / N_{f-st}) = 0 \quad N_{f-pro} = N_{f-st} \quad N_{0-pro} = N_{0-st} \quad (\text{según la ec. 2})$$

$$\text{Si } x_0 = \log (N_{f-st}) \implies N_{0-pro} = N_{0-st} = 10^{x_0}$$

Y combinando con la ecuación 4:

$$N_{0\text{-mRNA}} = k \times 10^{X_0} \quad \text{Ec. 5}$$

Se admite que el número de moléculas iniciales de cDNA problema ($N_{0\text{-prob}}$) es equivalente al número de moléculas iniciales de mRNA problema ($N_{0\text{-prob}}$), multiplicado por un factor de corrección (k).

El parámetro k es un factor de corrección que depende de las características de la RT-PCR competitiva, y es el producto de tres componentes que representa la corrección:

$$k = k_1 \times k_2 \times k_3$$

El factor k_1 representa la corrección debida al diferente tamaño de la secuencia nucleotídica del DNA estándar y del DNA problema.

$$k_1 = L_{\text{prob}} / L_{\text{st}}$$

Donde:

K_{prob} : Longitud, en pares de bases, de la molécula final de problema.

L_{st} : Longitud, en pares de bases, de la molécula final de patrón.

El factor k_2 se introduce cuando el patrón se añade en forma de ADN.

Puesto que el producto de la retrotranscripción es una molécula mixta DNA/RNA, durante el primer ciclo se crea el cDNA problema como doble hélice de DNA, que empezará a amplificarse a partir del segundo ciclo. En consecuencia, el patrón tiene un ciclo más de amplificación que el problema:

$$k_2 = 1 / (1 + E_1)$$

Donde E_1 es la eficiencia de amplificación durante el primer ciclo de PCR, que es aproximadamente 1. Por lo tanto $k_2 \cong 0.5$

El factor k_3 representa la eficiencia (en tanto por uno) de la retrotranscripción y elimina la subestima provocada por la baja efectividad de la RT. La enzima utilizada es la Tth DNA polimerasa, la eficiencia de retrotranscripción es cercana a 1 (Bolton y col., 1996; Myers y col., 1991), y $k_3 \cong 1$.

10. Reverso transcripción y reacción en cadena de la polimerasa

En el desarrollo experimental de esta tesis se ha utilizado una “one step” RT-PCR competitiva. La RT-PCR competitiva permite la co-amplificación de la molécula problema (de concentración desconocida), y de una molécula patrón (de concentración conocida), con el mismo par de cebadores. La relación entre sus concentraciones iniciales se mantiene durante todos los ciclos de la amplificación.

Esta técnica permite cuantificar de forma precisa, rápida y fiable los niveles de mRNA de los isoenzimas 1 y 2 de la 5 α -R en las distintas situaciones experimentales. Tanto la RT, como la PCR son llevadas a cabo en el mismo tubo. La primera-hebra cDNA era sintetizada en triplicado a partir de 100 ng del RNA total usando el oligo antisentido y Tth DNA polimerasa. Se añaden los siguientes reactivos en un volumen final de 20 μ l: 1X RT buffer, 1 mM MnCl₂, 200 μ M de cada dNTP, RNA, 0.5 μ M de oligo antisentido (R1-R o R2-R), 2U/ μ l Tth DNA polimerasa (GeneCraft, Alemania). Las reacciones se incubaron a 55 °C durante 10 min. y consecutivamente a 70 °C durante 20 min. El porcentaje de eficiencia para las reacciones de retrotranscripción es del 93 \pm 1.9 (media \pm S.E. para n = 7) y es calculado usando la fórmula: RT (%) = ng cDNA sintetizado/ng RNA, realizando la reacción de RT en presencia de 10 μ Ci [α -³²P] dCTP (3000 Ci/mmol; 10 mCi/ml).

Después de ser generado el cDNA a partir del RNA total mediante la reacción de retroranscripción RT, se co-amplifica en presencia de cantidades decrecientes del DNA competidor (64×10^{64} a 0.5×10^6 moléculas). Co-amplificamos el cDNA correspondiente a 5 α -R1 y el DNA competidor IS-1 utilizando el mismo par de cebadores. Con cantidades decrecientes del estándar interno (300 p.b.), aumenta la intensidad relativa del producto amplificado de 185 p.b. (DNA problema).

De igual modo, co-amplificamos el cDNA correspondiente a 5 α -R2 y el DNA competidor IS-2 utilizando el mismo par de cebadores. Con cantidades decrecientes del

estándar interno (300 p.b.), aumenta la intensidad relativa del producto amplificado de 192 p.b. (DNA problema).

El perfil de la PCR es: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos; anillamiento a 55°C durante 30 segundos; y extensión a 72°C durante 30 segundos. En cada caso el número de ciclos es 35. La PCR se realiza en un Perkin-Elmer 2400 Thermal Cycler.

11. Análisis de los productos de PCR

11.1 Electroforesis preparativa en gel de agarosa

Antes de proceder a la cuantificación mediante análisis fluorescente de los distintos productos de PCR, se comprueba el tamaño molecular de éstos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Los distintos fragmentos migraran a diferente velocidad según su peso molecular al ser sometidos a una corriente eléctrica.

Se utilizó el sistema de electroforesis horizontal *Mini-Sub Cell GT* (Bio-Rad, CA, USA).

El gel de agarosa se prepara en tampón TAE 1X (0.4 Tris-acetato, 0.01 M EDTA pH 8.0) conteniendo 0.5 µg/ml de Bromuro de Etidio. Mezclamos 10µl de muestra con 2µl de tampón de carga 6X (0.25% azul de bromofenol, 0.25% Xileno Cyanol, 15% Ficoll 400). La electroforesis ocurre durante 45 minutos a un voltaje de 90 Volts.

Comparando la movilidad de nuestros fragmentos con los del marcador de peso molecular (Sigma, DNA Ladder Markers D7808) podremos conocer el tamaño de nuestros fragmentos. Las bandas se visualizan en un transiluminador UV (Bio-Rad, CA, USA) y los geles se fotografian con una cámara Kodak (Bio-Rad, CA, USA).

11.2 Electroforesis capilar

Un sistema de electroforesis capilar de fluorescencia inducida por láser (LIF-CE) fue utilizado para caracterizar los productos de RT-PCR. Después de la amplificación, una alícuota de muestra (1 μ l) fue diluido a 1/20 con 18.5 μ l de formamida y 0.5 μ l de GeneScan™-500 TAMRA™ Size Standard (Applied Biosystem, Warrington, UK) y desnaturalizado a 95°C durante 3 minutos. LIF-CE fue llevado a cabo en un Analizador Genético ABIPRISM 310 (Applied Biosystem, USA), de acuerdo a Torres y Ortega (2004).

La electroforesis capilar tiene lugar en un capilar de sílice de 47 cm. de longitud, y 50 μ m de diámetro que contiene como fase estacionaria el polímero POP-4 (PE-Applied Biosystem, UK), a una temperatura de 60°C. Cada muestra corre durante 24 minutos a un voltaje de 60 KJul. El tiempo de inyección de cada muestra se determina empíricamente, variando éste entre 3 y 7 segundos.

Una vez concluida la electroforesis capilar, el análisis de fluorescencia de las muestras se realiza usando el software GeneScan 5.0 (PE-Applied Biosystem, UK).

1. Ratas neonatales

1.1. Ratas neonatales tratadas con T

En este experimento quisimos conocer como la Testosterona en la época de diferenciación sexual regula los niveles de mRNA de la isoenzima 5α -R1 en la corteza prefrontal de rata neonatal, y si los efectos son iguales o diferentes en la rata macho y hembra. Para ello, se establecieron los siguientes grupos experimentales: Ratas macho control (M), ratas macho tratadas con vehículo (aceite de sésamo) (M+V), ratas macho tratadas con testosterona (M+T), ratas hembra control (H), ratas hembra tratadas con vehículo (H+V), y ratas hembra tratadas con testosterona (H+T). Los resultados se muestran en la fig. 2.

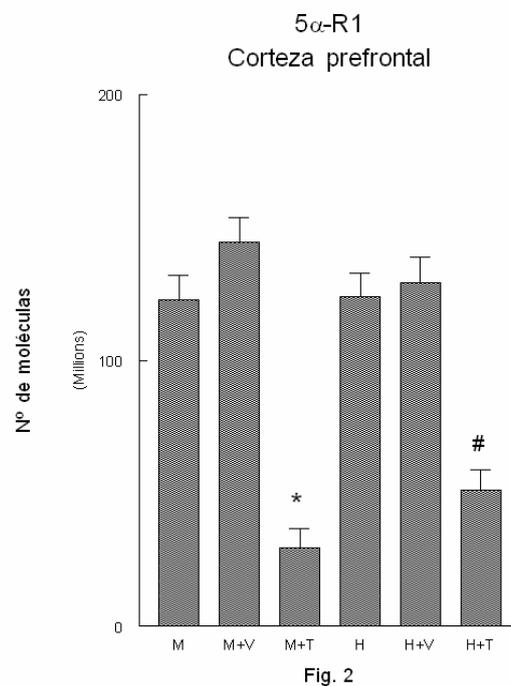


Figura 2. Efectos del vehículo aceite de sésamo (V) y testosterona (T) en los niveles del mRNA de la 5α -Reductasa tipo 1 (5α -R1) en corteza prefrontal de ratas (M) y (H) de 12 días de vida postnatal. * $p < 0.001$ vs. animales M. # $p < 0.001$ vs. animales H.

Como se puede observar en la fig. 2, los niveles de mRNA de la 5 α -R1 en ratas macho y hembra controles fueron similares. No hubo cambios significativos en la expresión de mRNA de la 5 α -R1 como resultado del tratamiento con aceite de sésamo (vehículo) en ratas macho y hembra, en comparación con sus respectivos controles. Después del tratamiento con T, hubo un descenso significativo en la expresión de mRNA de la 5 α -R1 en ratas macho y hembra, en comparación con sus respectivos controles.

De igual modo para conocer como la Testosterona en la época de diferenciación sexual regula los niveles de mRNA de la isoenzima 5 α -R2 en la corteza prefrontal de rata neonatal, y si los efectos son iguales o diferentes en la rata macho y hembra, se establecieron los siguientes grupos experimentales: ratas macho control (M), ratas macho tratadas con vehículo (aceite de sésamo) (M+V), ratas macho tratadas con testosterona (M+T), ratas hembra control (H), ratas hembra tratadas con vehículo (H+V), ratas hembra tratadas con testosterona (H+T). Los resultados se muestran en la fig.3.

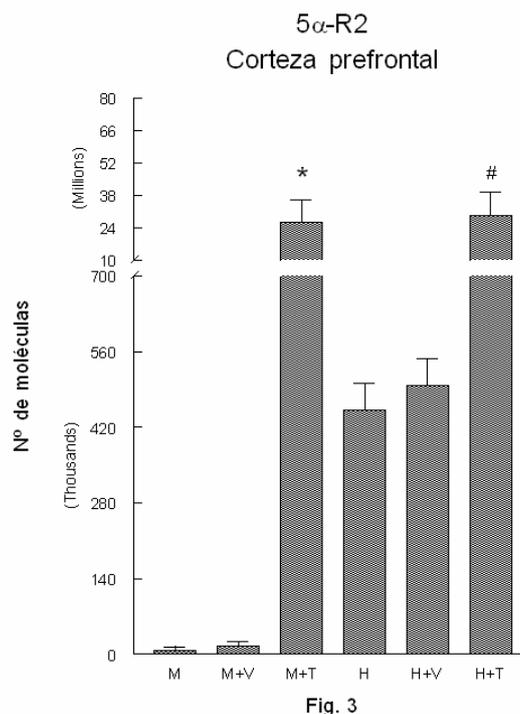


Figura 3. Efectos del vehículo aceite de sésamo vehículo (V) y testosterona (T) en los niveles del mRNA de la 5 α -R2 en corteza prefrontal de ratas macho (M) y hembra (H) de 12 días de vida postnatal. * $p < 0.001$ vs. animales M. # $p < 0.001$ vs. animales H.

Como se puede observar en la fig. 3, los niveles de mRNA de la 5 α -R2 fueron significativamente mayores en ratas hembra control que ratas macho control. No hubo cambios significativos en la expresión de mRNA de la 5 α -R2 como resultado del tratamiento con aceite de sésamo (vehículo) en ratas macho y hembra, en comparación con sus respectivos controles. Después del tratamiento con T, hubo un gran aumento significativo en la expresión de mRNA de la 5 α -R2 tanto en ratas macho como en hembra, en comparación con sus respectivos controles.

Para comprobar que el tratamiento con T había sido efectivo se midieron los niveles plasmáticos de T. Como puede observarse en la figura 4, las ratas neonatales hembra presentaron unos niveles plasmáticos de T significativamente menores que las

ratas neonatales macho. Como cabría esperar después del tratamiento con T, hubo un aumento significativo en los niveles plasmáticos de T en ratas neonatales macho y hembra respecto a los grupos intactos y tratados con aceite de sésamo.

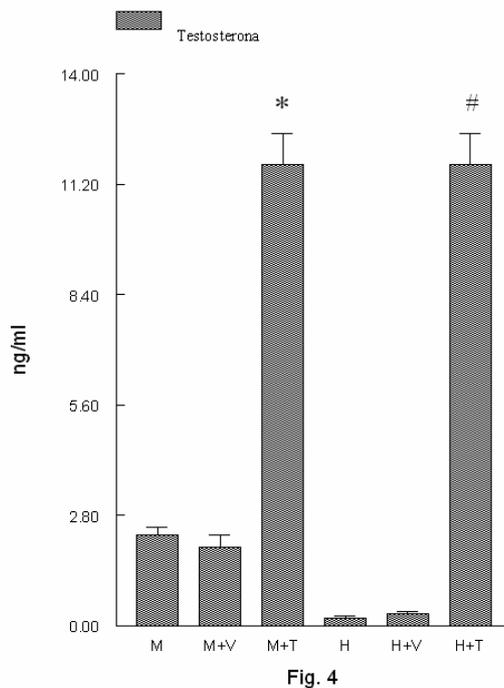


Fig. 4. Niveles plasmáticos de Testosterona en las ratas macho y hembra de 12 días de vida postnatal * $p < 0.001$ vs. animales M. * $p < 0.001$ vs. animales H..

1.2. Ratas neonatales tratadas con DHT

Una vez conocido el efecto que ejerce la T sobre los niveles de mRNA de la isoenzimas 5α -R1 en la corteza prefrontal de ratas neonatales, quisimos conocer el efecto que ejerce la Dihidrotestosterona y si los efectos son iguales o diferentes en la rata macho y hembra. Para ello, se establecieron los siguientes grupos experimentales: ratas macho control (M), ratas macho tratadas con vehículo (aceite de sésamo) (M+V), ratas macho tratadas con Dihidrotestosterona (M+DHT), ratas hembra control (H), ratas hembra

tratadas con vehículo (H+V), ratas hembra tratadas con Dihidrotestosterona (H+DHT). Los resultados obtenidos se muestran en la fig. 5.

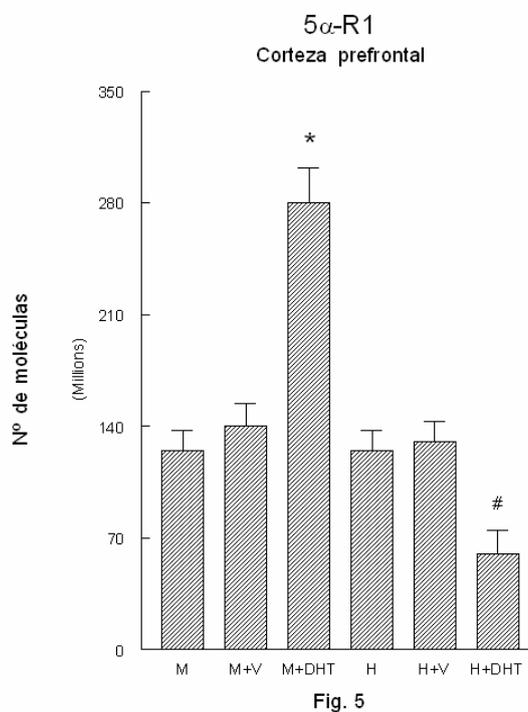


Figura 5. Efectos del vehículo aceite de sésamo (V), y dihidrotestosterona (DHT) en los niveles de mRNA de la 5α-Reductasa tipo 1 (5α-R1) en corteza prefrontal de ratas (M) y (H) de 12 días de vida postnatal. * $p < 0.001$ vs. animales M. # $p < 0.01$ vs. animales H.

Como se muestra en la fig. 5, los niveles de mRNA de la 5α-R1 fueron similares en ratas macho y hembra controles. Además, no hubo cambios significativos en la expresión de mRNA de la 5α-R1 como resultado del tratamiento con aceite de sésamo (vehículo) en ratas macho y hembra, en comparación con sus respectivos controles. Después del tratamiento con DHT, se produjo un aumento significativo en la expresión de mRNA 5α-R1 en ratas macho y una disminución significativa en ratas hembra, en comparación con sus respectivos controles.

Posteriormente, para conocer el efecto que ejerce la Dihidrotestosterona sobre los niveles de mRNA de la isoenzima 5α -R2 en la corteza prefrontal de ratas neonatales y si los efectos son iguales o diferentes en la rata macho y hembra, se establecieron los siguientes grupos experimentales: ratas macho control (M), ratas macho tratadas con vehículo (aceite de sésamo) (M+V), ratas macho tratadas con Dihidrotestosterona (M+DHT), ratas hembra control (H), ratas hembra tratadas con vehículo (H+V), ratas hembra tratadas con Dihidrotestosterona (H+DHT). Los resultados se muestran en la fig. 6

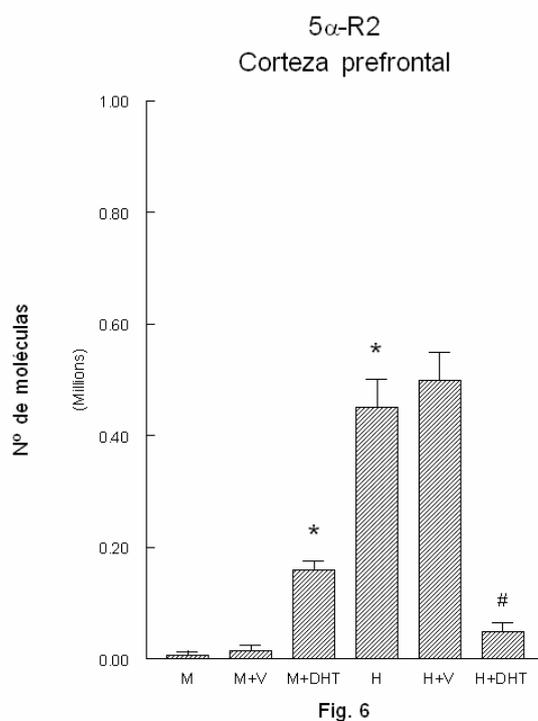


Figura 6. Efectos del vehículo aceite de sésamo (V) y dihidrotestosterona (DHT) en los niveles de mRNA de la 5α -R2 en corteza prefrontal de ratas macho (M) y hembra (H) de 12 días de vida postnatal. * $p < 0.01$ vs. animales M. # $p < 0.001$ vs. animales H.

Como puede observarse en la fig. 6, la expresión de mRNA de la 5α -R2 fue significativamente mayor en ratas hembra control que en ratas macho control. No hubo cambios significativos en la expresión del mRNA de la 5α -R2 como resultado del

tratamiento con aceite de sésamo (vehículo) en ratas macho y hembra, en comparación con sus respectivos controles. Después del tratamiento con DHT, hubo un aumento significativo en la expresión de mRNA de la 5 α -R2 en ratas macho y una disminución significativa en ratas hembras, en comparación con sus respectivos controles.

Para comprobar que el tratamiento con DHT había sido efectivo se midieron los niveles plasmáticos de DHT. Como puede observarse en la figura 7, después del tratamiento con DHHT, hubo un aumento significativo en los niveles plasmáticos de DHT en ratas neonatales macho y hembra respecto a los grupos intactos y tratados con aceite de sésamo.

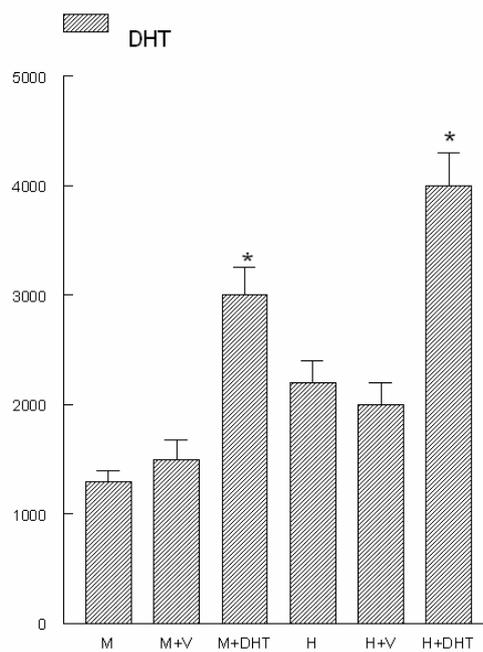


Fig. 7

Fig. 7. Niveles plasmáticos de Dihidrotestosterona en las ratas macho y hembra de 12 días de vida postnatal * $p < 0.001$ vs. animales M.

* $p < 0.001$ vs. animales H..

2. Ratas adultas

2.1. Ratas adultas no tratadas neonatalmente (Grupo control)

2.1.A Ratas macho adultas no tratadas neonatalmente (Grupo control)

En este experimento se midieron los niveles de mRNA de la 5 α -R1 en corteza prefrontal de los siguientes grupos experimentales: ratas macho intactas (I), ratas macho orquidectomizadas (C), ratas macho orquidectomizadas tratadas cuando adultas con Testosterona (C+T), ratas macho orquidectomizadas tratadas cuando adultas con Dihidrotestosterona (C+DHT). Los resultados se muestran en la fig. 8.

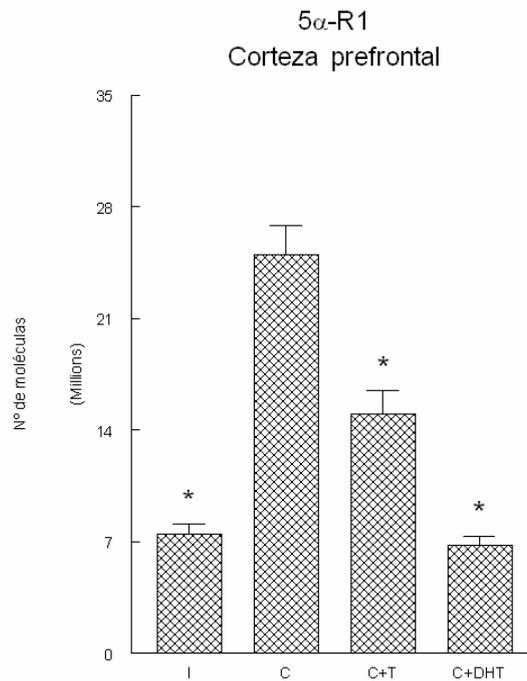


Fig. 8

Figura 8. Niveles de mRNA de la 5 α -R1 en corteza prefrontal de rata macho adulta no tratada neonatalmente. * $P < 0.01$ vs. animales C.

Como se puede observar en la fig. 8, los niveles de mRNA de la 5α -R1 aumentaron de forma significativa en animales orquidectomizados con respecto a animales intactos. Sin embargo, después del tratamiento con T y DHT, hubo un descenso significativo de los niveles de mRNA de la 5α -R1 en comparación con los animales orquidectomizados.

De igual modo, se midieron los niveles de mRNA de la 5α -R2 en corteza prefrontal de los diferentes grupos experimentales: ratas macho intactas (I), ratas macho orquidectomizadas (C), ratas macho orquidectomizadas tratadas cuando adultas con Testosterona (C+T), ratas macho orquidectomizadas tratadas cuando adultas con Dihidrotestosterona (C+DHT). Los resultados se muestran en la fig. 9.

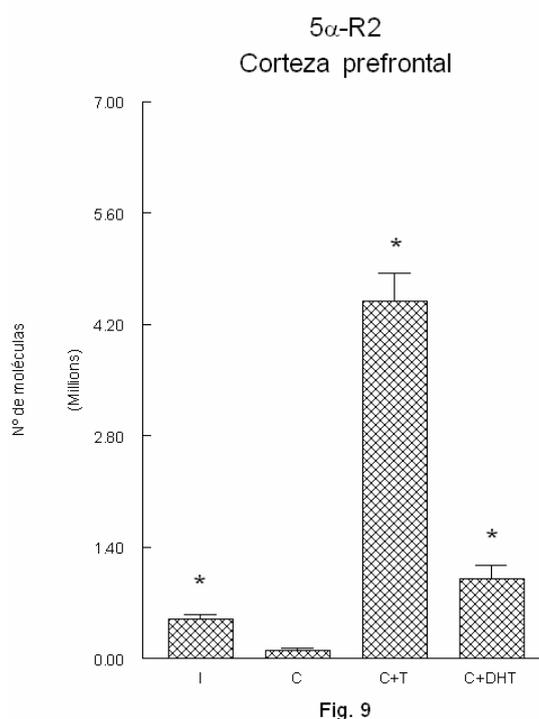


Figura 9. Niveles de mRNA de la 5α -R2 en corteza prefrontal de rata macho adulta no tratada neonatalmente* $P < 0.01$ vs. animal C.

Como se muestra en la fig. 9, los niveles de mRNA de la 5α -R2 disminuyeron significativamente en animales orquitectomizados con respecto a animales intactos. De forma contraria, después del tratamiento con T y DHT, hubo un aumento significativo en los niveles de mRNA de la 5α -R2 con respecto a los animales orquitectomizados.

2.2.B Ratas hembra adultas no tratadas neonatalmente (Grupo control)

En este experimento se midieron los niveles de mRNA de la 5α -R1 en corteza prefrontal de los siguientes grupos experimentales: ratas hembra intactas (I), ratas hembra ovariectomizadas (O), ratas hembra ovariectomizadas tratadas cuando adultas con Testosterona (O+T), ratas hembra ovariectomizadas tratadas cuando adultas con Dihidrotestosterona (O+DHT). Los resultados se muestran en la fig. 10.

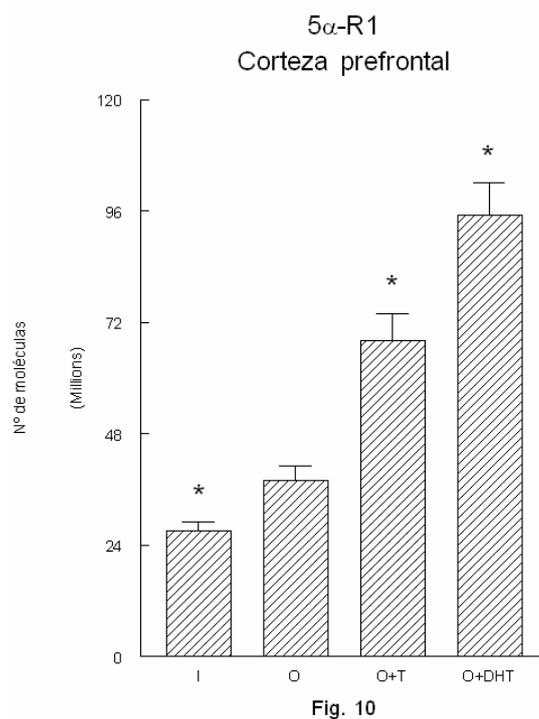


Figura 10. Niveles de mRNA de la 5α -R1 en corteza prefrontal de rata hembra adulta no tratada neonatalmente. * $P < 0.01$ vs. an.O.

Como se puede observar en la figura 10, los niveles de mRNA de la 5α -R1 aumentaron de forma significativa en animales ovariectomizados con respecto a animales intactos. Después del tratamiento con T y DHT, se produjo un aumento significativo de los niveles de mRNA de la 5α -R1 en comparación con los animales ovariectomizados.

A continuación, se midieron los niveles de mRNA de la 5α -R2 en corteza prefrontal de los siguientes grupos experimentales: ratas hembra intactas (I), ratas hembra ovariectomizadas (O), ratas hembra ovariectomizadas tratadas cuando adultas con Testosterona (O+T), ratas hembra ovariectomizadas tratadas cuando adultas con Dihidrotestosterona (O+DHT). Los resultados se muestran en la fig. 11.

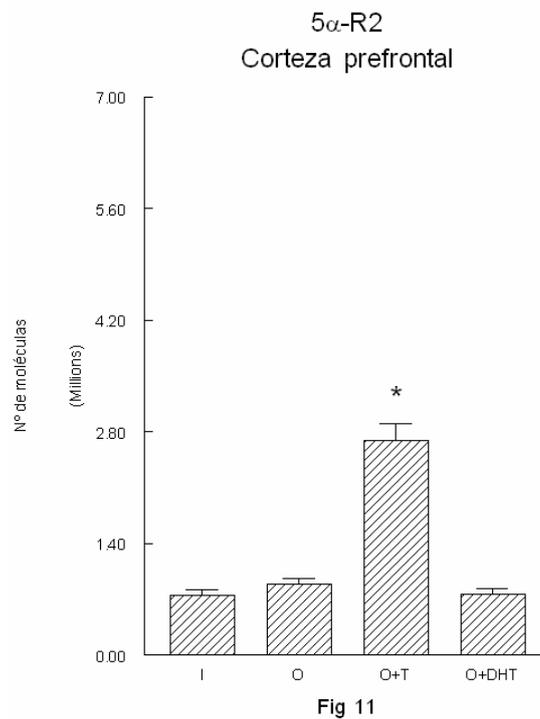


Figura 11. Niveles de mRNA de la 5α -R2 en corteza prefrontal de rata hembra adulta no tratada neonatalmente. * $P < 0.01$ vs. an O.

Como se puede observar en la fig. 11, no hubo diferencias significativas en los niveles de mRNA de la 5 α -R2 entre los animales intactos y ovariectomizados. Después del tratamiento con T, hubo un aumento significativo en los niveles de mRNA de la 5 α -R2 con respecto a los animales ovariectomizados. Después del tratamiento con DHT, no hubo diferencias significativas en los niveles de mRNA de la 5 α -R2 en comparación con los animales castrados.

2.2. Ratas adultas tratadas neonatalmente con T

Para conocer si los patrones de regulación del mRNA de los isoenzimas 5 α -R1 y 5 α -R2 en corteza prefrontal del animal adulto dependen de los niveles neonatales de T o de los niveles de andrógenos cuando el animal es adulto, se administró T a ratas neonatales durante el periodo de diferenciación sexual y cuando alcanzaron su estado adulto se establecieron los siguientes grupos experimentales.

2.2.A Ratas macho adultas tratadas neonatalmente con T

En este experimento se midieron los niveles de mRNA de la 5 α -R1 en corteza prefrontal de ratas macho adultas tratadas neonatalmente con T, se establecieron los siguientes grupos experimentales: ratas macho intactos (I), ratas macho orquidectomizadas (C), ratas macho orquidectomizadas tratadas cuando adultas con Testosterona (C+T), ratas macho orquidectomizadas tratadas cuando adultas con Dihidrotestosterona (C+DHT). Los resultados se muestran en la fig. 12.

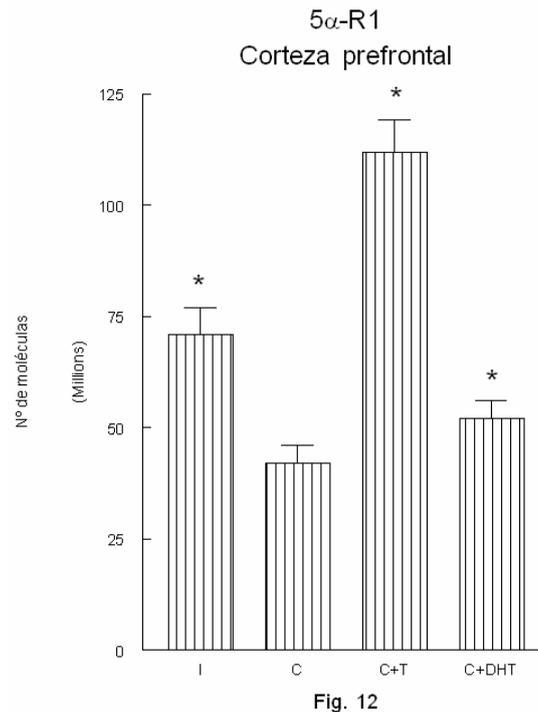


Figura 12. Niveles de mRNA de la 5 α -R1 en corteza prefrontal de rata macho adulta tratada neonatalmente con T. * $P < 0.01$ vs. animales C.

Como puede observarse en la fig. 12, los niveles de mRNA de la 5 α -R1 en animales orquidectomizados fueron significativamente menores que en los animales intactos. Después del tratamiento con T y DHT, hubo un incremento significativo en los niveles de mRNA de la 5 α -R1 en comparación con los animales orquidectomizados.

De la misma manera, se midieron los niveles de mRNA de la 5-R2 en corteza prefrontal de ratas macho adultas tratadas neonatalmente con T, se establecieron los siguientes grupos experimentales: ratas macho intactos (I), ratas macho orquidectomizadas (C), ratas macho orquidectomizadas tratadas cuando adultas con Testosterona (C+T), ratas macho orquidectomizadas tratadas cuando adultas con Dihidrotestosterona (C+DHT). Los resultados se muestran en la fig. 13.

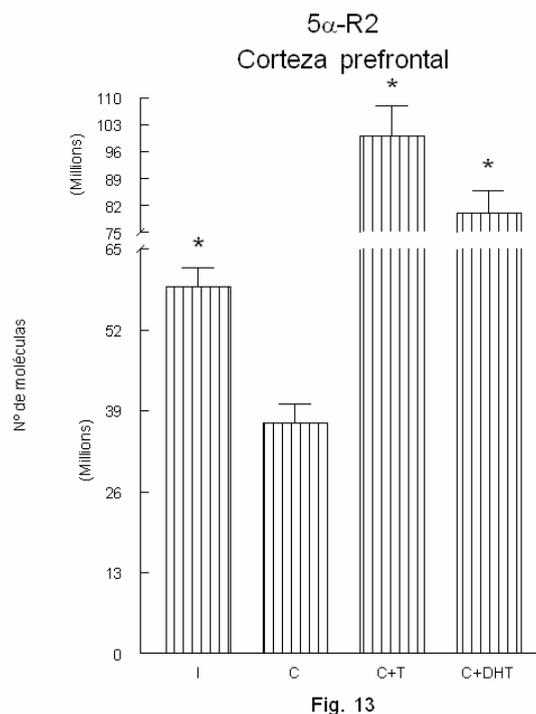


Figura 13. Niveles de mRNA de la 5 α -R2 en corteza prefrontal de rata macho adulta tratada neonatalmente con T.

* $P < 0.01$ vs. animales C.

Como se muestra en la fig. 13, los niveles de mRNA de la 5 α -R2 en los animales orquidectomizados fueron significativamente menores que en los animales intactos. Después del tratamiento con T y DHT, hubo un aumento significativo en los niveles de mRNA de la 5 α -R1 en comparación con los animales orquidectomizados.

2.2.B Ratas hembra adultas tratadas neonatalmente con T

En este experimento se midieron los niveles de mRNA de la 5 α -R1 en corteza prefrontal de ratas hembra adultas tratadas neonatalmente con T, se establecieron los siguientes grupos experimentales: ratas hembra intactas (I), ratas hembra ovariectomizadas (O), ratas hembra ovariectomizadas tratadas cuando adultas con

Testosterona (O+T), ratas hembra ovariectomizadas tratadas cuando adultas con Dihidrotestosterona (O+DHT). Los resultados se muestran en la fig. 14.

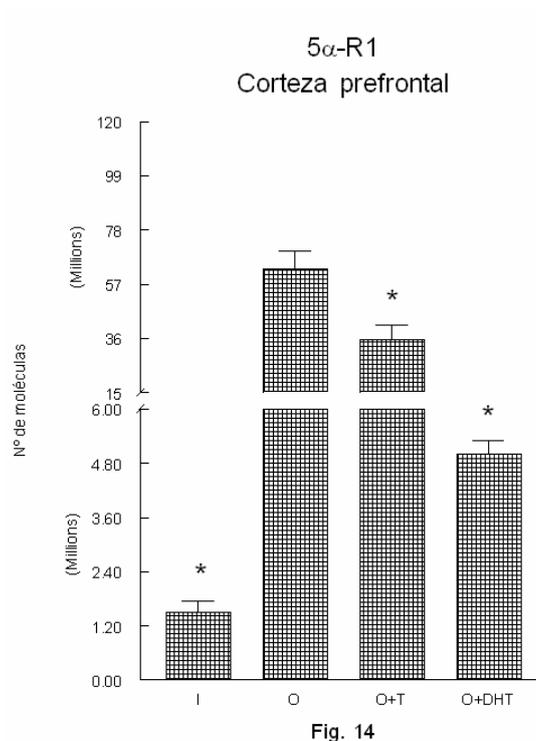


Figura 14. Niveles de mRNA de la 5α-R1 en corteza prefrontal de rata hembra adulta tratada neonatalmente con T. *P<0.01 vs. animales O.

Como puede observarse en la fig. 14, los niveles de mRNA de la 5α-R1 en animales intactos fueron significativamente menores que en animales ovariectomizados. Después del tratamiento con T y DHT, disminuyeron significativamente los niveles de mRNA de la 5α-R1 en comparación con los animales ovariectomizados.

Del mismo modo, se midieron los niveles de mRNA de la 5α-R2 en corteza prefrontal de ratas hembra adultas tratadas neonatalmente con T, se establecieron los siguientes grupos experimentales: ratas hembra intactas (I), ratas hembra

ovariectomizadas (O), ratas hembra ovariectomizadas tratadas cuando adultas con Testosterona (O+T), ratas hembra ovariectomizadas tratadas cuando adultas con Dihidrotestosterona (O+DHT). Los resultados se muestran en la fig. 15.

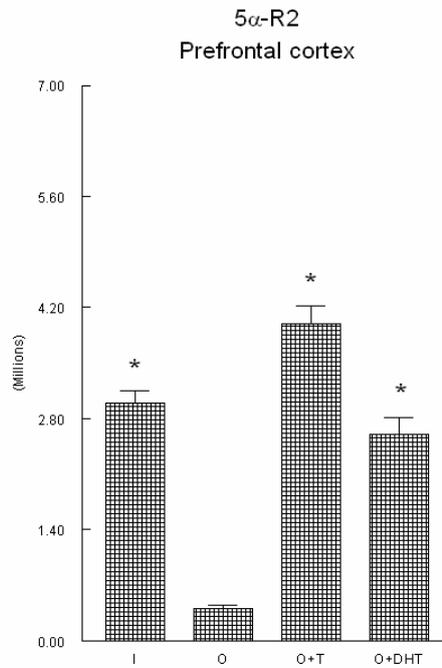


Fig. 15

Figura 15. Niveles de mRNA de la 5 α -R2 en corteza prefrontal de rata hembra adulta tratada neonatalmente con T.

* $P < 0.01$ vs. Animales O.

Como se muestra en la fig. 15, los niveles de mRNA de la 5 α -R1 en animales intactos fueron significativamente mayores que en animales ovarioctemizados. Después del tratamiento con T y DHT, aumentaron significativamente los niveles de mRNA de la 5 α -R1 en comparación con los animales ovarioctemizados.

2.3. Ratas adultas tratadas neonatalmente con DHT

Una vez conocidos los efectos que ejerce la T durante el periodo neonatal de diferenciación sexual del SNC, sobre los patrones de regulación del mRNA de las isoenzimas 5α -R1 y 5α -R2 en corteza prefrontal de rata adulta, quisimos conocer los efectos que origina la DHT. Para ello, se les administró Dihidrotestosterona a ratas neonatales durante el periodo de diferenciación sexual y cuando alcanzaron su estado adulto se establecieron los siguientes grupos experimentales.

2.3.A. Ratas macho adultas tratadas neonatalmente con DHT

En este experimentos se midieron los niveles de mRNA de la 5α -R1 en corteza de ratas macho adultas tratadas neonatalmente con DHT, se establecieron los siguientes grupos experimentales: ratas macho intactas (I), ratas macho orquidectomizados (C), ratas macho orquidectomizados tratadas cuando adultas con Testosterona (C+T), ratas macho orquidectomizados tratadas cuando adultas con Dihidrotestosterona (C+DHT). Los resultados se muestran en la fig. 16.

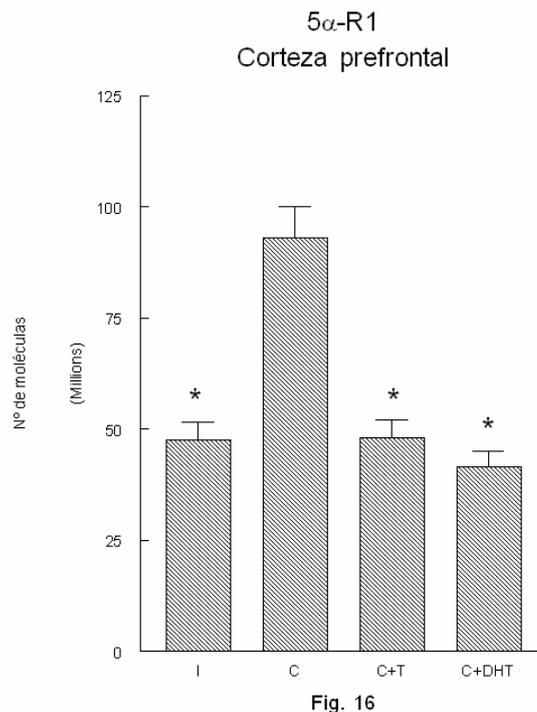


Figura 16. Niveles de mRNA de la 5α -R1 en corteza prefrontal de rata macho adulta tratada neonatalmente con DHT. * $P < 0.01$ vs. animales C.

Como se puede observar en la fig. 16, los niveles de mRNA de la 5α -R1 en animales orquidectomizados fueron significativamente mayores que en animales intactos. Después del tratamiento con T y DHT, se produjo un descenso significativo en los niveles de mRNA de la 5α -R1 en comparación con los animales orquidectomizados.

De igual modo, se midieron los niveles de mRNA de la 5α -R2 en corteza prefrontal de ratas macho adultas tratadas neonatalmente con DHT, se establecieron los siguientes grupos experimentales: ratas macho intactas (I), ratas macho orquidectomizados (C), ratas macho orquidectomizados tratadas cuando adultas con Testosterona (C+T), ratas macho orquidectomizados tratadas cuando adultas con Dihidrotestosterona (C+DHT). Los resultados se muestran en la fig. 17.

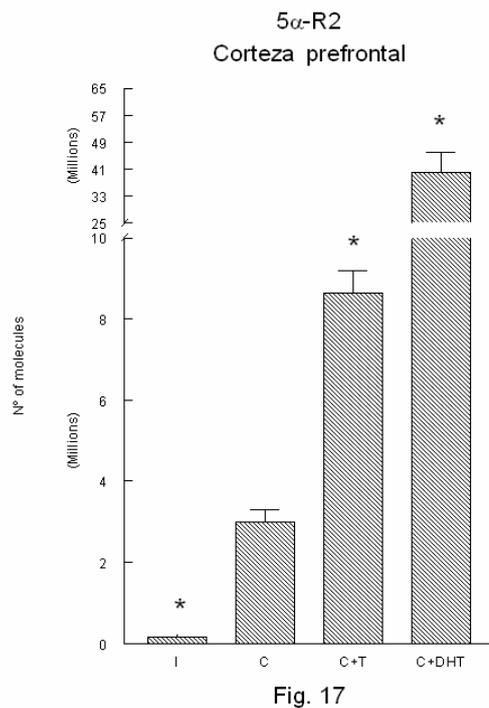


Figura 17. Niveles de mRNA de la 5 α -R2 en corteza prefrontal de rata macho adulta tratada neonatalmente con DHT. * $P < 0.01$ vs. animales C.

Como se puede observar en la fig. 17, los niveles de mRNA de la 5 α -R2 en animales orquidectomizados fueron significativamente mayores que en animales intactos. Después del tratamiento con T y DHT, hubo un aumento significativo en los niveles de mRNA de la 5 α -R2 en comparación con los animales orquidectomizados.

2.3.B Ratas hembra adultas tratadas neonatalmente con DHT

En este experimento, se midieron los niveles de mRNA de la 5 α -R1 en corteza prefrontal de ratas hembra adultas tratadas neonatalmente con DHT, se establecieron los siguientes grupos experimentales: ratas hembra intactas (I), ratas hembra

ovariectomizadas (O), ratas hembra ovariectomizadas tratadas cuando adultas con Testosterona (O+T), ratas hembra ovariectomizadas tratadas cuando adultas con Dihidrotestosterona (O+DHT). Los resultados se muestran en la fig. 18.

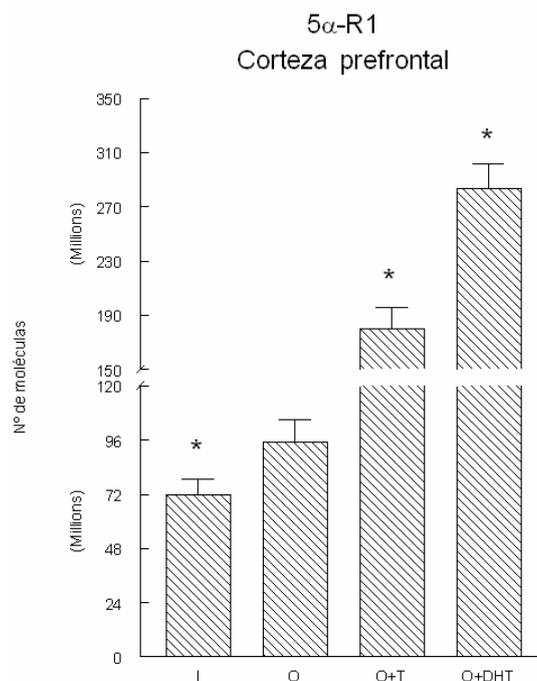


Fig. 18

Figura 18. Niveles de mRNA de la 5 α -R1 en corteza prefrontal de rata hembra adulta tratada neonatalmente con DHT.

* $P < 0.01$ vs. animales O.

Comos se puede observar en la fig. 18, los niveles de mRNA de la 5 α -R1 en animales intactos fueron significativamente menores que en animales ovarioctemizados. Después del tratamiento con T y DHT, se produjo un aumento significativo en los niveles de mRNA de la 5 α -R1 en comparación con los animales ovarioctemizados.

A continuación, se midieron los niveles de mRNA de la 5 α -R2 en corteza prefrontal de ratas hembra adultas tratadas neonatalmente con DHT, se establecieron los

siguientes grupos experimentales: ratas hembra intactas (I), ratas hembra ovariectomizadas (O), ratas hembra ovariectomizadas tratadas cuando adultas con Testosterona (O+T), ratas hembra ovariectomizadas tratadas cuando adultas con Dihidrotestosterona (O+DHT). Los resultados se muestran en la fig. 19.

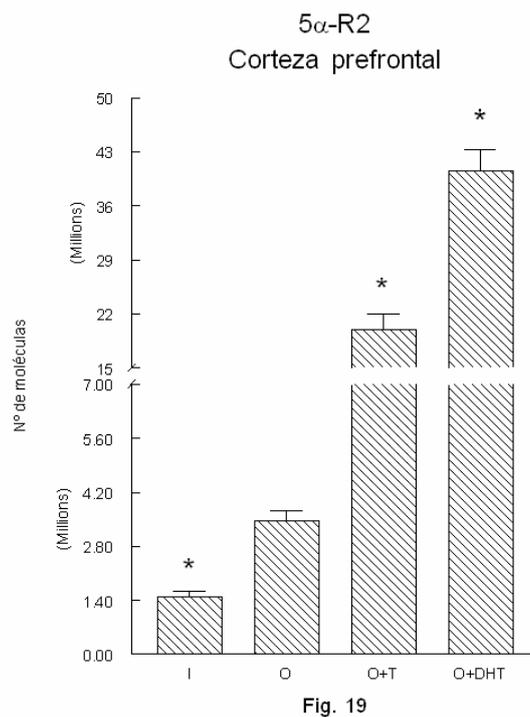


Figura 19. Niveles de mRNA de la 5α -R2 en corteza prefrontal de rata hembra adulta tratada neonatalmente con DHT. * $P < 0.01$ vs. Animales O.

Como se muestra en la fig. 19, los niveles de mRNA de la 5α -R2 en animales intactos fueron significativamente menores que en animales ovariectomizados. Después del tratamiento con T y DHT, se produjo un aumento significativo en los niveles de mRNA de la 5α -R2 en comparación con los animales ovariectomizados.

2.4. Ratas adultas estresadas

2.4.1. Ratas sometidas a estrés físico por natación

Para conocer si las situaciones de estrés físico modifican los niveles de mRNA de las isoenzimas 5α -R en corteza prefrontal de rata adulta, se sometieron a ratas macho adultas a estrés por natación forzada.

La figura 20 representa los niveles de mRNA de la 5α -R1 en corteza prefrontal de rata macho estresada por natación y rata macho control. Los niveles de mRNA de la 5α -R1 fueron significativamente mayores en ratas estresadas por natación en comparación con las ratas control.

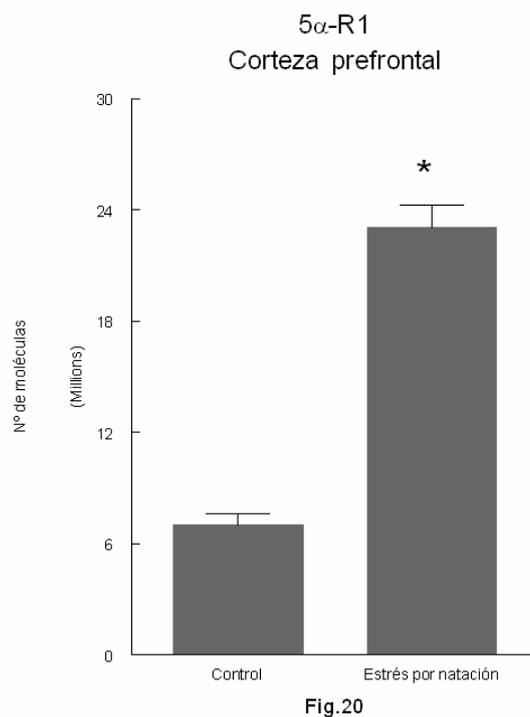


Fig. 20. Efectos del estrés por natación sobre los niveles de mRNA 5α -R1 en corteza prefrontal de rata macho control y rata macho después de ser estresada por natación. * $p < 0.001$ vs. animales control.

La figura 21 representa los niveles de mRNA de la 5 α -R2 en corteza prefrontal de rata macho estresada por natación y rata macho control. Los niveles de mRNA de la 5 α -R2 fueron significativamente mayores en ratas estresadas por natación en comparación con su respectivo grupo control.

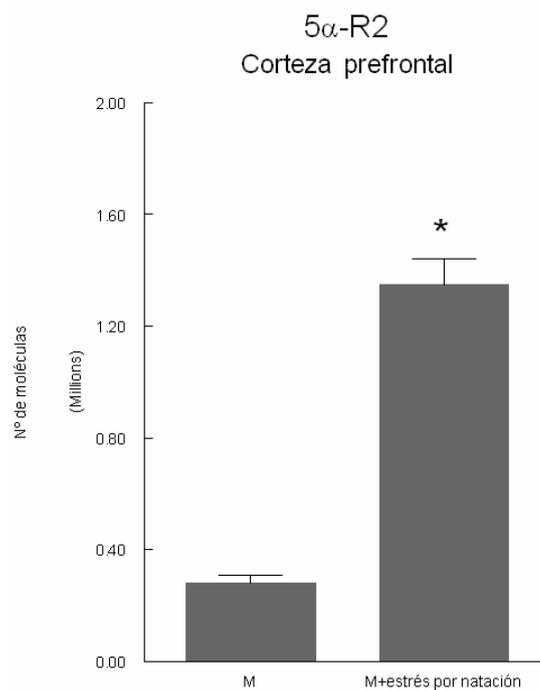


Fig. 21

Fig. 21. Efectos del estrés por natación sobre los niveles de mRNA 5 α -R2 en corteza prefrontal de rata macho control y rata macho después de ser estresada por natación. * $p < 0.001$ vs. animales control.

Para comprobar que las ratas habían sido estresadas se midieron los niveles de corticosterona y ACTH.

La fig.22 muestra los niveles plasmáticos de corticosterona en ratas macho estresada por natación y ratas macho control. Los niveles plasmáticos de corticosterona

fueron significativamente mayores en ratas estresadas por natación en comparación con su respectivo grupo control.

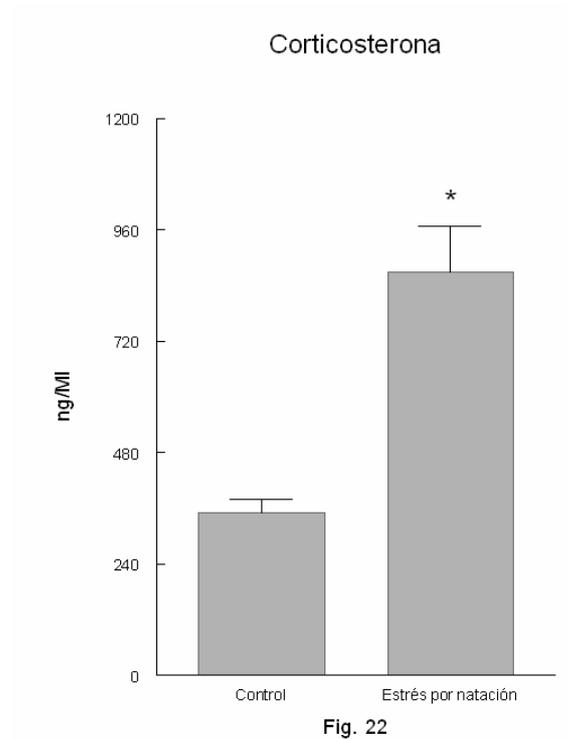


Fig. 22. Niveles plasmáticos de corticosterona medidos en ratas macho control y en ratas estresadas por natación. Cada barra representa la media \pm SEM para 5-7 animales. * $p < 0.01$ vs. animales control.

La fig.23 muestra los niveles plasmáticos de ACTH en ratas macho estresada por natación y en ratas macho control. Los niveles plasmáticos de ACTH fueron significativamente mayores en ratas estresadas por natación en comparación con su respectivo grupo control.

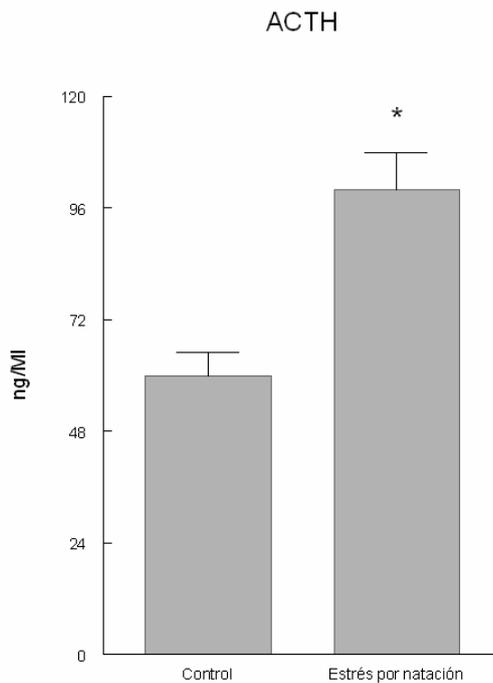


Fig. 23

*Fig23. Niveles plasmáticos de ACTH medidos en ratas macho control y en ratas después de ser estradas por natación. Cada barra representa la media \pm SEM para 5-7 animales * $p < 0.01$ vs. animales control*

2.4.2. Ratas sometidas a estrés medio ambientalmente

En base a los resultados obtenidos en el estrés por natación forzada, quisimos ver si el estrés medio ambiental también afecta sobre los niveles de mRNA de la 5α -R en corteza prefrontal de rata adulta.

En este ensayo experimento se midieron los niveles de mRNA de la 5α -R1 en corteza prefrontal de rata, se establecieron los siguientes grupos experimentales: macho control (M), hembra control (H), rata macho estresada medio ambientalmente (M+estrés) y rata hembra estresada medio ambientalmente (H+estrés). Los resultados se muestran en la fig. 24.

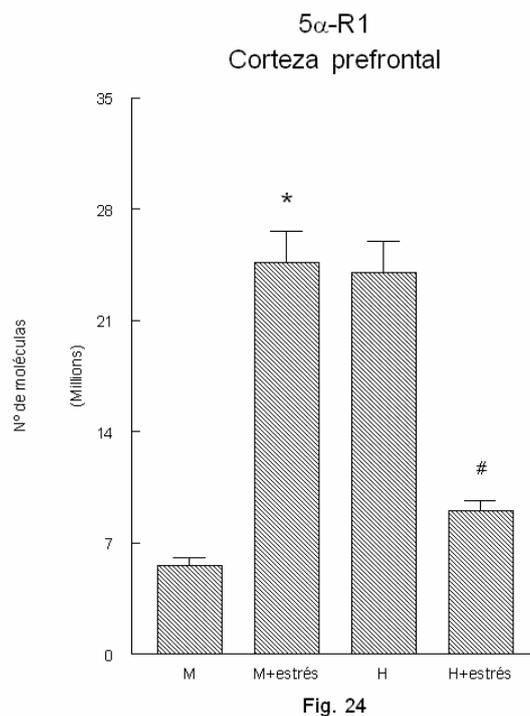


Figura 24. Efectos del estrés medio ambiental en los niveles de mRNA de la 5 α -Reductasa tipo 1 (5 α -R1) en corteza prefrontal de ratas (M) y (H). * $p < 0.001$ vs. animales M. # $p < 0.001$ vs. animales H.

Como puede observarse en la fig. 24, los niveles de mRNA de la 5 α -R1 fueron significativamente mayores en ratas macho estresadas medio ambientalmente en comparación con las ratas macho control. Sin embargo, los niveles de mRNA de la 5 α -R1 fueron significativamente menores en ratas hembra estresadas medio ambientalmente en comparación con las ratas hembra control.

De igual modo, se midieron los niveles de mRNA de la 5 α -R2 en corteza prefrontal de rata, se establecieron los siguientes grupos experimentales: rata macho control (M), rata hembra control (H), rata macho estresada medio ambientalmente

(M+estrés) y rata hembra estresada medio ambientalmente (H+estrés). Los resultados se muestran en la fig. 25.

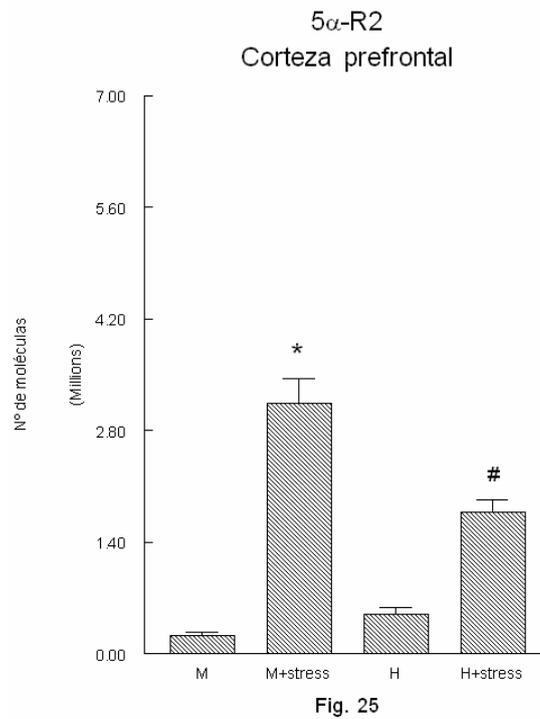


Figura 25. Efectos del estrés mediambiental en los niveles del mRNA de la 5 α -Reductasa tipo 2 (5 α -R2) en corteza prefrontal de ratas (M) y (H). * p <0.001 vs. animales M. # p <0.001 vs. animales H.

Como puede observarse, los niveles de mRNA de la 5 α -R2 fueron significativamente mayores en las ratas macho y hembra estresadas medio ambientalmente en comparación con sus respectivos controles.

En el sistema nervioso central (SNC) de machos y hembras se encuentran diferencias estructurales y funcionales. Estas diferencias, involucran el número de neuronas, morfología e interconexiones, que han sido asociadas con cambios en la fisiología cerebral, desarrollo cognitivo y conducta. Las diferencias morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y de comportamiento de machos y hembras se denominan, en su conjunto, dimorfismo sexual.

Los neurotransmisores son cruciales en la citoarquitectura cerebral, concretamente el neurotransmisor ácido γ amino butírico (GABA) vía de su receptor tipo A (GABA_A-R). Dicho receptor es un complejo multiproteico ligado al canal de Cl⁻, que actúa como un importante nexos entre el sistema endocrino y el sistema nervioso, de manera que tanto su identidad molecular como su función de receptor están reguladas por los esteroides. El GABA_A-R permite el flujo selectivo de iones de Cl⁻, regulando así su excitabilidad neuronal. Estos receptores son proteínas pentaméricas transmembrana que están compuestas por varias subunidades, codificadas a su vez, por varias familias de genes (Schofield y col., 1987; Olsen y Tobin, 1991; Vicini, 1991). Esta compleja diversidad molecular, hace que este receptor permita la plasticidad necesaria a este importante sistema de neurotransmisión inhibitoria, basada en las siguientes características: regulación dinámica de la expresión de las subunidades por acción de esteroides; propiedades biofísicas del receptor, y sensibilidad farmacológica a un número de moduladores alostéricos entre los que se incluyen: zinc, etanol, benzodiazepinas (BZD), barbitúricos, y neuroesteroides (Majewska, 1992).

Miembros de nuestro grupo de investigación, habían demostrado que el R-GABA_A participa en la diferenciación sexual del cerebro y en la conducta maternal de rata. Para ello, se administró postnatalmente diazepam (DZ), un agonista del GABA_A-R a ratas macho y picrotoxina (PTX), un antagonista del GABA_A-R a ratas hembra,. Cuando los animales alcanzaron su estado adulto, se estudió la diferenciación sexual del bulbo olfatorio accesorio (BOA) (una región sexodimórfica del cerebro), y la conducta maternal inducida. Además, se midieron los niveles plasmáticos de los esteroides gonadales; testosterona (T), estradiol (E₂), y progesterona. Los resultados obtenidos (Segovia y col., 1996) demostraron que: en la rata macho la administración de DZ indujo feminización de las células mitrales del BOA y de la conducta maternal, facilitando que el macho llegara a ser “maternal” al alcanzar el estado adulto; en cambio la administración de PTX a la rata hembra causó una masculinización de células mitrales del BOA, e inhibió la conducta maternal cuando fueron adultas. También, se demostró que PTX y DZ no alteraron el patrón hormonal sexodimórfico, es decir, los sexos neuronales y conductuales resultaron invertidos por los tratamientos, pero ese efecto no era debido a una alteración de la función gonadal, dado que el patrón hormonal gonadal sexodimórfico era normal. Además, se observó que los machos tuvieron su descenso testicular y las hembras presentaron ciclos estrales iguales a las ratas hembras controles.

Estos resultados ponen de manifiesto la participación del GABA_A-R en la diferenciación sexual del SNC, y en la conducta reproductora. Por tanto, es lógico pensar que los neuroesteroides, moduladores alostéricos endógenos del GABA_A-R, intervengan en la diferenciación sexual de SNC y en la conducta maternal de la rata.

El término neuroesteroide sirve para designar a los esteroides que se sintetizan “de novo” en el SNC, bien directamente desde el colesterol o bien desde otras hormonas esteroideas que actúan de precursoras (Baulieu, 1998). Dentro del término neuroesteroide se incluyen esteroides cuya acumulación en el SNC, y sistema nervioso periférico ocurre independientemente de las fuentes esteroideogénicas exógenas al SNC (Baulieu, 1991).

Los neuroesteroides $3\alpha,5\alpha$ -reducidos, actúan como potentes moduladores alostéricos del $GABA_A$ -R (Majewska, 1992), y funcionan de forma similar al DZ, por lo tanto, pueden intervenir en la diferenciación sexual del cerebro (Torres y Ortega, 2003a; Torres y Ortega, 2006). Allopregnanolona y tetrahydrodeoxicorticosterona (THDOC) son neuroesteroides $3\alpha,5\alpha$ -reducidos, sintetizados a partir de la Progesterona y Deoxicorticosterona respectivamente, por acción de las enzimas 5α -Reductasa y 3α -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa (3α -HSD) (Fig.1). La enzima 5α -R cataliza una reacción irreversible (Wilson, 1975), siendo por tanto la enzima limitante en la síntesis de neuroesteroides $3\alpha,5\alpha$ -reducidos. Además, 5α -R está implicada en el metabolismo de T, que es la hormona responsable de la masculinización del cerebro. Aunque curiosamente la T producida en el testículo se aromatiza “in situ” a estradiol, que es la verdadera hormona masculinizante del cerebro de rata (Lephart, 1996; Amateau y col., 2004). Sin embargo, hay algunas estructuras del cerebro de rata macho que necesitan DHT, junto con estradiol, para llevar a cabo el completo desarrollo masculino (Goldstein y Sengelaub, 1994).

En el proceso de diferenciación sexual del SNC, 5α -R juega un importante papel interviniendo en la síntesis de neuroesteroides $3\alpha,5\alpha$ -reducidos, así como en la síntesis

de DHT. Por ello, nos planteamos estudiar la transcripción de los genes 5α -R1 y 5α -R2, y su regulación por T y DHT en corteza prefrontal de rata macho y hembra en el periodo de diferenciación sexual del SNC.

En primer lugar, se administró T a ratas neonatales desde el día 5 hasta el día 12 de vida postnatal (P5-P12), y se midieron los niveles de mRNA de las isoenzimas 5α -R a los 12 días de edad. Los resultados obtenidos (fig. 3) demostraron que la expresión de la 5α -R2 era mayor en rata hembra control de 12 días de vida, que en rata macho control de la misma edad. Investigaciones previas (Russell y Wilson, 1994, Torres y col., 2003) habían demostrado que 5α -R2 debe promover funciones específicas masculinas, ya que 5α -R2 muestra una alta expresión en tejidos androgénicos, tales como la glándula prostática. Curiosamente, nuestros resultados indicaron una mayor expresión en rata hembra neonatal que en rata macho neonatal, lo que sugiere que 5α -R2 puede no tener efectos clásicamente masculinizantes en cerebro de rata hembra de 12 días de vida. Una posibilidad es que, en rata hembra, la 5α -R2 evite la transformación de testosterona a estradiol, la cual participa en la masculinización del SNC de roedores (Lephart, 1996).

Otra función de la 5α -R2 en rata hembra neonatal podría ser la síntesis de derivados 5α -reducidos de progesterona (hormona clásica femenina), que posteriormente serían transformados en neuroesteroides 3α - 5α -reducidos. Estos neuroesteroides tienen efectos hipnóticos, sedativos, y ansiolíticos (Celotti y col., 1992; Paul y Purdy 1992; Torres y Ortega, 2003a). Además, como hemos indicado los neuroesteroides 3α - 5α -reducidos parecen estar implicados en la diferenciación sexual del cerebro y en el comportamiento, favoreciendo la formación y mantenimiento de

estructuras femeninas del cerebro (Segovia y col., 1996), ya que los neuroesteroides 3α - 5α -reducidos regulan el receptor $GABA_A$ de forma similar a las benzodiazepinas (Paul y Purdy 1992; Majewska 1992). En apoyo a esta hipótesis, se ha visto que hay una mayor cantidad de allopregnanolona en el cerebro de rata hembra que en el cerebro de rata macho (Torres y col., 2001), la actividad 5α -R está presente en órganos sexuales femeninos, y se han demostrado altos niveles sanguíneos de metabolitos 3α - 5α -reducidos de progesterona en mujeres sanas, al menos durante la segunda fase del ciclo menstrual (Rapkin y col., 1997).

En cuanto a la 5α -R1 los niveles de mRNA en corteza prefrontal de rata neonatal (fig.2) fueron similares en macho y hembra, datos que están de acuerdo con los obtenidos por Melcangi y col., (1998). Los niveles de mRNA de la 5α -R1 en corteza prefrontal fueron mucho mayores en rata neonatal que en rata adulta (Torres y Ortega, 2003a, 2006). La isoenzima 5α -R1 había sido considerada como una enzima constitutiva, con una función catabólica para proteger a las neuronas de la apoptosis inducida por un exceso de glucocorticoides, por ejemplo los producidos en situaciones de estrés (Mahendroo y col., 1997; Poletti y col., 1998). Posiblemente el SNC tiene mayor plasticidad durante la ontogénesis postnatal que en la edad adulta y debe necesitar, por tanto, protección durante este periodo. Por consiguiente, la alta expresión de la 5α -R1 durante la diferenciación del SNC en periodo postnatal debe tener un papel fisiológico protector.

La función catabólica de la 5α -R1 podría no ser la única función que tiene esta isoenzima, sino también funciones de desmasculinización/feminización del SNC, mediante la síntesis de neuroesteroides 3α , 5α -reducidos de progesterona

(allopregnanolona), especialmente en hembra, en la que los niveles de progesterona son altos (Torres y col., 2001; Corpechot y col., 1993).

En nuestros resultados observamos que la rata macho neonatal presenta altos niveles de mRNA de la 5α -R1. Además, 5α -R1 tiene gran afinidad por la progesterona (Negri-Cesi y col., 1996). Sin embargo, la progesterona se encuentra en baja concentración en rata macho en comparación con la T, por lo tanto, en condiciones fisiológicas no se producirán esteroides $3\alpha,5\alpha$ -reducidos en el macho.

Tras la administración de T, los niveles de mRNA de la isoenzima 5α -R2 en rata macho y hembra presentan un aumento significativo (fig. 3). Este perfil era similar al encontrado en la próstata (Torres y col., 2003) y en el cerebro de rata macho y hembra adulta (Torres y Ortega, 2003a, 2006), y corresponde a un gen que es regulado positivamente por T, por lo tanto, debe controlar funciones masculinas. La regulación del gen 5α -R2 por T era mayor en rata macho adulta que en rata hembra adulta (Torres y Ortega, 2003a, 2006), sugiriendo que esta regulación está condicionada genéticamente por el sexo. De acuerdo con nuestros resultados, el efecto positivo de T sobre los niveles de mRNA de la 5α -R2 era mucho mayor en rata neonatal que en rata adulta (Torres y Ortega, 2003a, 2006). Además, el grado de regulación del gen 5α -R2 por T es igual en rata neonatal macho y hembra. Por tanto, la alta regulación del gen 5α -R2 por T en rata adulta no depende exclusivamente del sexo, y probablemente se deba a los diferentes niveles fisiológicos de T que presenta el macho y la hembra durante la diferenciación sexual del SNC (Negri-Cesi y col., 2004).

Los niveles de mRNA de la 5 α -R1 durante la diferenciación sexual del SNC, disminuyeron después de la administración de T en rata macho y hembra neonatal (fig. 2). Este resultado, que puede parecer sorprendente, a nuestro entender es lógico, ya que la T es la principal hormona sexual masculina e induce eventos masculinizantes en el cerebro. Por lo tanto, nuestros datos confirman la hipótesis de que, además de tener función de protección neuronal (Poletti y Martini, 1999), la isoenzima 5 α -R1 debe participar en funciones desmasculinizantes/feminizantes en el cerebro, mediante la síntesis de esteroides 3 α -5 α -reducidos de progesterona.

Para asegurarnos que el tratamiento con T había sido efectivo, se midieron los niveles plasmáticos de T (fig. 4). Como era de esperar, las ratas tratadas con T tienen unos niveles plasmáticos de T significativamente superiores con respecto a las ratas controles .

A la vista de nuestros encuentros, decidimos estudiar cómo DHT regula la expresión de las isoenzimas 5 α -R en corteza prefrontal de rata durante el periodo de diferenciación sexual del SNC, ya que en el SNC los efectos de DHT podrían ser diferentes a los de T, al menos en la hembra (Torres y Ortega, 2006).

La administración de DHT a rata neonatal desde el día 5 hasta el día 12 de vida postnatal (P5-P12), demostró que las isoenzimas 5 α -R tuvieron un comportamiento sexualmente dimórfico, pero similar dentro de cada sexo (fig. 5 y fig. 6). En el macho, la administración de DHT produjo un elevado aumento en los niveles de mRNA de la 5 α -R1 y 5 α -R2, similar al previamente observado en próstata de rata macho adulta (Torres y col., 2003). Es posible que en el macho, las isoenzimas 5 α -R estén reguladas

por DHT durante la ontogénesis del SNC por un mecanismo *feed-forward*, idéntico al que presenta la próstata. El mecanismo *feed-forward* es específico de morfogenes que actúan durante la ontogénesis. Quizá una de las razones por las cuales la masculinización de muchas estructuras del SNC de roedores es producida por la testosterona después de ser transformada a estradiol, sea para evitar un exceso de DHT en el cerebro. Este exceso podría inducir a las isoenzimas 5 α -R, y por lo tanto, incrementaría el nivel de neuroesteroides 3 α -5 α -reducidos en el cerebro. Nuestros resultados podrían explicar el inexplicable efecto desmasculinizantes que produce la administración DHT en algunas estructuras sexodimórficas del SNC, como es el bulbo olfatorio accesorio, tal y como mostraron los trabajos realizados por Valencia y col., (1992).

Sorprendentemente, el efecto que originó la administración de DHT en la hembra era opuesto al producido en el macho, con una reducción en la expresión de 5 α -R1 y 5 α -R2 en la hembra y un incremento en el macho. Es decir, DHT produce un mecanismo *feed-forward* en las isoenzimas 5 α -R en el macho, y un mecanismo *feed-back* en las isoenzimas 5 α -R en la hembra. Esta claro que la regulación de las isoenzimas 5 α -R por DHT en cerebro de rata neonatal es sexualmente dimórfico. Aunque la causa de este dimorfismo no se conoce, hay una mayor cantidad de 5 α -R2 en la hembra que en el macho, y quizá la administración de DHT debe inducir un mecanismo *feed-back* para evitar una sobreexpresión del gen 5 α -R2. Aunque la cantidad de T en la hembra era pequeña, y la afinidad de 5 α -R2 era mucho menor por T que por progesterona (Negri-Cesi y col., 1996), no hay duda que la sobreexpresión del gen 5 α -R2 en la hembra podría producir DHT, masculinizando algunas estructuras del SNC durante la ontogénesis del mismo (Poletti y col., 1998).

Durante el periodo de diferenciación sexual del SNC en rata, la regulación transcripcional de los genes 5α -R1 y 5α -R2 por T (Sánchez y col., 2006), era diferente de su regulación por DHT (Sánchez y col., 2005). Así, los niveles de mRNA de la 5α -R2 en rata hembra neonatal, incrementaron considerablemente después de la administración de T, y disminuyeron tras la administración de DHT. Así se demuestra que DHT, que había sido considerada como un metabolito de la T con idénticas funciones que ella, adquiere un valor propio e independiente de la T.

El tratamiento con DHT había sido efectivo (fig. 7), ya que las ratas tratadas con DHT tienen unos niveles plasmáticos de DHT significativamente superiores, con respecto a las ratas controles.

La administración exógena de T (Torres y Ortega 2003a) aumenta los niveles plasmáticos de T, así como la administración de DHT. Sin embargo, hay varias explicaciones para los diferentes efectos que se obtuvieron tras la administración de T y DHT. En primer lugar, es bien conocido que muchos de los efectos que ejerce la T en el dimorfismo sexual del SNC, son mediante la aromatización de la T a estradiol en el propio cerebro (MacLusky y Naftolin 1981; Lepart 1996; Negri-Cesi y col., 1996; Amateau y col., 2004). Por lo tanto, T y DHT podrían ejercer diferentes efectos fisiológicos ya que DHT actúa vía receptor de andrógenos (AR), mientras que T actuaría vía receptor de estrógenos (ER). En este sentido, la T induce la enzima aromatasas P_{450} en el cerebro (Harada y col., 1992; Abdelgardir y col., 1994), y que está presente en las neuronas de la corteza prefrontal de rata neonatal (Zwain 1999). En segundo lugar, parece ser que existen tres clases de genes de respuesta para andrógenos:

aquellos que ejercen su acción a través del receptor de andrógenos acoplado a T, aquellos que lo hacen a través del receptor de andrógenos acoplados a DHT, y aquellos que actúan independientemente del andrógeno acoplado al receptor (Russell y Wilson 1994).

En vista de estos encuentros, quisimos estudiar la regulación de 5α -R1 y 5α -R2 por T y DHT en ratas macho y hembra adultas, y ver si está condicionada por los niveles neonatales de T y DHT, o por otros factores como podrían ser los niveles de T y DHT en la época adulta. Para ello, a un grupo de ratas macho y hembra neonatales se les administró T, y a otro grupo de ratas macho y hembra neonatales se les administró DHT. Cuando alcanzaron su estado adulto, se midieron los niveles de mRNA de las isoenzimas 5α -R1 y 5α -R2, en estado basal, gonadectomizadas y tras las administración de T y DHT.

Nuestros resultados indican que en ratas macho adultas no tratadas neonatalmente (grupo control) (fig. 9), la expresión de la 5α -R2 disminuyó tras la castración y aumentó después de la administración de T y DHT, presentando un mecanismo de regulación feed-forward, similar al que presenta dichas isoenzimas en próstata (Torres y col., 2003). Por ello, la isoenzima 5α -R2 en el cerebro puede tener al igual que en la próstata una función androgénica, produciendo en el cerebro DHT que masculinizaría algunas estructuras del SNC (Goldstein y Sengelaub, 1994). La 5α -R2 es muy importante durante el periodo de diferenciación sexual del cerebro (Poletti y col., 1998). No obstante, 5α -R2 es expresada y regulada por andrógenos en rata macho adulta, por lo tanto, parece que participa no sólo en la formación, sino también en el

mantenimiento de estructuras sexodimórficas del SNC durante toda la vida del macho (Torres y Ortega, 2003a).

Los niveles de mRNA de la 5 α -R1 en rata macho adulta control (fig. 8) aumentaron tras la castración y disminuyeron tras la administración de T y DHT. Estos resultados, parecen apuntar a que 5 α -R1 debe estar además implicada en procesos de dimorfismo sexual, ejerciendo efectos opuestos a los que presenta la isoenzima 5 α -R2, dado que las dos isoenzimas están reguladas de forma opuesta por T y DHT (Torres y Ortega, 2003a).

En el cerebro de rata hembra adulta no tratada neonatalmente (grupo control) (fig. 11), el gen 5 α -R2 se expresó más que en la rata macho, aunque en la hembra estaba muy poco regulado por T y DHT (Torres y Ortega, 2006). Estos resultados están de acuerdo con previas investigaciones en las cuales un tratamiento con flutamine, un antagonista de los receptores androgénicos, es capaz de producir una disminución significativa en los niveles de mRNA de la 5 α -R2 en el cerebro de rata macho. Dicho tratamiento es menos efectivo en la modulación de la expresión de esta isoforma en el cerebro de rata hembra (Poletti y col., 1998). La ligera regulación de la 5 α -R2 por andrógenos en corteza prefrontal de rata hembra adulta, sugiere que la producción de una gran cantidad de DHT no debe ser la principal función de esta isoenzima en hembra.

En cuanto a los niveles de mRNA de la 5 α -R1 en cerebro de rata hembra adulta control (fig. 10), aumentaron tras la ovariectomización y tras la administración con T y DHT, presentando un mecanismo de regulación diferente al que tiene la 5 α -R1 en el

hígado de rata hembra (Torres y Ortega, 200a). Por tanto, parece que la 5α -R1 no sólo tiene función catabólica, sino que también interviene en la síntesis de neuroesteroides 3α - 5α -reducidos, ejerciendo efectos desmasculinizante/feminizantes en el cerebro (Torres y Ortega, 2006).

Nuestros resultados demuestran (fig.13) que la administración neonatal de T a rata macho durante la diferenciación sexual del SNC, produjo cuando fue adulta un perfil de regulación de los niveles de mRNA de la 5α -R2 por T y DHT, similar al encontrado en próstata (Torres y col., 2003), o en cerebro de rata macho adulta no tratada neonatalmente (fig. 8). Aunque los niveles de mRNA de la 5α -R2 fueron 200-veces mayores en rata macho adulta tratada neonatalmente con T, que en rata macho adulta sin tratar.

En la próstata y en el cordón espinal de rata existen altos niveles de mRNA de la 5α -R2 (Pozzi y col., 2003; Torres y col., 2003; Patte-Mensah y col., 2004), donde podrían ejercer procesos de masculinización tanto en próstata, como en cerebro (Poletti y col., 1998; Torres y Ortega, 2003a). Por lo tanto, es razonable pensar que la administración neonatal de T, la hormona androgénica y masculinizante del SNC por excelencia, no sólo incrementa los niveles de mRNA de la 5α -R2 en el animal neonato (Sánchez y col., 2006), sino que también programa la expresión de la 5α -R2 durante toda la vida del individuo, como ocurre con algunas enzimas hepáticas (Gustafsson y Stenberg 1974a; 1974b).

Respecto a la isoenzima 5α -R1 (fig. 12), la administración neonatal de T produjo un aumento en los niveles de mRNA de la 5α -R1 en el macho adulto, y una

regulación positiva por T y DHT en la expresión del gen 5α -R1, opuesta a la regulación que presentaba la rata no tratada neonatalmente (fig. 8). Nosotros habíamos hipotetizado que 5α -R1 es una enzima desmasculinizante/feminizante en el cerebro (Torres y Ortega, 2003a). Sin embargo, nuestros resultados actuales demuestran que la T administrada neonatalmente impide el patrón de regulación normal de mRNA de la 5α -R1 por T y DHT en la rata macho adulta, y produce un patrón de regulación similar al que presenta la enzima masculinizante 5α -R2 en la próstata, un órgano exclusivamente masculino (Torres y col., 2003).

La administración neonatal de T en rata hembra (Fig.15), produjo cuando fue adulta un aumento en los niveles de mRNA de la 5α -R2 5 veces superior a los niveles que presentaba la rata hembra adulta no tratada neonatalmente (Fig.11). El patrón de regulación del mRNA de la 5α -R2 por T y DHT fue similar en ratas macho y hembra tratadas neonatalmente por T. Puesto que el aumento en los niveles de mRNA de la 5α -R2 fue diferente en rata macho y rata hembra adultas, tratadas neonatalmente con igual cantidad de T, la participación de otros parámetros sexo específicos podrían influir en el perfil de regulación del mRNA de la 5α -R2.

Respecto a la 5α -R1 (Fig. 14), la administración neonatal de T a la rata hembra, produjo cuando adulta un descenso en los niveles de mRNA de la 5α -R1 15 veces inferior, a los niveles que presentaba la rata hembra adulta no tratada neonatalmente (fig. 10). Interesantemente, la administración neonatal de T en rata hembra produjo cuando fue adulta un patrón en la regulación del mRNA de la 5α -R1 por T y DHT (fig. 14) opuesto al que presentaba la rata hembra, no tratada neonatalmente (fig. 10). Los

resultados presentes parecen confirmar la hipótesis de que 5α -R1 debía tener en el cerebro de rata hembra una acción feminizante/desmasculinizante.

La administración neonatal de DHT a rata macho, produjo cuando fue adulta un patrón de regulación del mRNA de la 5α -R2 por T y DHT (Fig. 17), similar al que presentaba el mRNA de la 5α -R1 de hembra no tratada neonatalmente (Fig. 10). Curiosamente, la administración neonatal de DHT en rata macho, produjo cuando fue adulta una disminución en los niveles de mRNA de la 5α -R2 2 veces inferior, a los niveles que presentaba la rata macho adulta no tratada neonatalmente (Fig. 9). Respecto a la 5α -R1 (fig. 16), la administración neonatal de DHT en rata macho, produjo cuando fue adulta un patrón de regulación del mRNA de la 5α -R1 por T y DHT, similar al que presentaba la rata macho adulta no tratada neonatalmente (Fig. 8). Los niveles de mRNA de la 5α -R1 fueron 7 veces superiores a los que presentaba la rata macho no tratada neonatalmente. La hipótesis de nuestro grupo de investigación de que DHT podía ser una hormona que tuviera efectos diferentes a los de la T en el cerebro, a veces incluso opuestos (desmasculinizantes/feminizante), se ve reflejado en estos resultados.

La administración neonatal de DHT a la rata hembra, produjo cuando fue adulta un patrón de regulación de mRNA de la 5α -R1 (Fig. 18) y 5α -R2 (Fig. 19) por T y DHT, similar al que presentaba la 5α -R1 de hembra no tratada neonatalmente (Fig. 10). Nuestros datos demuestran que la misma dosis de DHT administrada neonatalmente a rata hembra y macho, produjo un patrón de regulación del mRNA de la 5α -R por T y DHT que fue diferente en la rata adulta macho y hembra. Esto sugiere que, además de los niveles neonatales de DHT, otros parámetros sexo específicos deben influir y determinar la regulación del mRNA de la 5α -R1.

Los resultados obtenidos indican que, aunque los factores genéticos y sexo dependientes (por ejemplo, el entorno esteroideo del animal), deben influir en los niveles basales de las isoenzimas 5α -R y en su regulación en el animal adulto, los niveles de T y DHT en el periodo postnatal de diferenciación sexual del SNC juegan un papel decisivo en estos eventos.

Es un hecho conocido que las situaciones de estrés modifican los niveles de T (). Las situaciones de estrés también modifican los niveles de neuroesteroides en la sangre y en el cerebro de roedores (Biggio y col., 1996; 2000), diferenciando los efectos de estrés crónico y agudo (Barbaccia y col., 1996; 2001). Por ello, las situaciones de estrés físico fueron objeto de nuestro estudio.

La transmisión GABA_{érgica} a nivel central juega un importante papel controlando el estado emocional, y regulando el estado de ansiedad originado por cambios rápidos en las condiciones medio ambientales (Barbaccia y col., 2001). Así, situaciones de estrés modifican el GABA_A-R en la corteza cerebral de rata (Biggio y col., 1980; 1981; 1983; 1987; Concas y col., 1985; 1887). La hipótesis de que los receptores GABA_A son modificados por el estrés, era apoyada por las observaciones de una rápida y reversible regulación negativa del GABA_A-R en varias situaciones de estrés agudo, incluyendo inhalación forzada de dióxido de carbono, natación forzada y exposición a un nuevo medio ambiente (Biggio y col., 1981; Medina y col., 1983; Concas y col., 1987; Drugan y col., 1989; Serra y col., 1991; Andrews y col., 1992; File y col., 1993). Incluso situaciones de estrés agudo, por ejemplo, intoxicación alcohólica aguda, incrementan

los niveles plasmáticos de allopregnanolona en varones adolescentes implicando al receptor GABA_A en este acontecimiento (Torres y Ortega, 2003c; 2004b).

Las benzodiazepinas y sus derivados que actúan como moduladores alostéricos positivos del complejo GABA_A-R, alivian la ansiedad en humanos, y por ello pueden participar en la respuesta al estrés (Haefely, 1994). Los neuroesteroides 3 α -5 α -reducidos regulan el GABA_A-R de forma similar a los barbitúricos (Paul y Purdy, 1992; Majewska 1992) y pueden, por lo tanto, participar en la respuesta al estrés. Allopregnanolona es producida en los ovarios, testículos y glándulas adrenales. En la glándula adrenal, la biosíntesis de allopregnanolona es estimulada por ACTH que induce la estimulación de la esteroidogénesis vía AMPc (Besman y col., 1989). En el cerebro se expresa la proteína proteína inhibidora de la unión al diazepam (DBI), una proteína que regula la esteroidogénesis adrenal (Mukhin y col., 1989; Krueger y Papadopoulos 1990), por ello, en situaciones de estrés pueden aumentar los niveles de allopregnanolona en el cerebro y en la glándula adrenal (Purdy y col., 1991).

Los estudios realizados por Purdy y col. (1991), demostraron que en situaciones de estrés agudo por natación forzada, se produce un aumento en la cantidad de progesterona y allopregnanolona, tanto en el cerebro como en el plasma. Dado que allopregnanolona es sintetizada a partir de progesterona por las isoenzimas 5 α -R y 3 α -HSD, siendo 5 α -R la enzima limitante de la reacción, y puesto que los niveles de allopregnanolona son modificados en situaciones de estrés (Purdy y col., 1991; Torres y Ortega, 2003c), es lógico pensar que una, otra, o ambas isoenzimas 5 α -R podrían ser modificadas en situaciones de estrés. Por ello, decidimos estudiar los niveles de mRNA

de las isoenzimas 5α -R1 y 5α -R2, en la corteza prefrontal de rata macho adulta después de una situación de estrés físico agudo, en este caso por natación forzada.

Nuestros resultados demuestran (fig. 20 y fig. 21), que en situaciones de estrés físico por natación forzada, se produjo un aumento en los niveles de mRNA de la 5α -R en la corteza prefrontal de rata macho, probando que los genes 5α -R1 y 5α -R2 están controlados positivamente por un factor o factores inducidos por el estrés físico de natación forzada.

El aumento de allopregnanolona en el cerebro de rata previamente observado por Purdy y col., (1991) ocasionado por una natación forzada, podría ser producido por la alta concentración plasmática de progesterona (Purdy y col., 1991), que podría cruzar la barrera hematoencefálica y ser sustrato de la 5α -R en la corteza cerebral, y también debido al aumento en los niveles de mRNA de las isoenzimas 5α -R1 y 5α -R2.

El individuo humano se ve sometido continuamente a situaciones de estrés medio ambiental, algunas de ellas ocasionadas por el exceso de calor, el exceso de luz artificial, o el producido por la habitabilidad en un espacio reducido (situaciones frecuentes en la vida laboral de algunos individuos). Estas situaciones pueden producir desórdenes psicológicos e incluso mortalidad (Tanaka 2007, Rainham 2003) por lo cual, nos pareció de sumo interés, ver como un estrés medio ambiental modifica los niveles de mRNA de la 5α -R en rata, en un intento de conocer a nivel molecular los efectos de las situaciones de estrés medio ambiental en el mamífero.

Nuestros resultados demuestran que en situaciones de estrés medio ambiental, (inmovilización, exceso de luz artificial, y exceso de calor) se produjo un aumento en los niveles de mRNA de las isoenzimas 5α -R1 y 5α -R2 en la corteza prefrontal de rata macho (fig. 24 y fig. 25). Esto podría conllevar a un aumento en el cerebro de neuroesteroides $3\alpha,5\alpha$ -reducidos, tal y como se ha demostrado para otros tipo de estrés (Barbaccia y col., 2001). Nuestros resultados, estarán apoyados por los de Ordyan y Pivina (2003), que habían demostrado que ratas macho adultas que fueron sometidas a estrés durante el periodo prenatal, presentan un significativo descenso en los niveles de ansiedad.

En la rata hembra, el estrés medio ambiental produjo efectos diferentes en los niveles de mRNA de las isoenzimas 5α -R1 y 5α -R2 (fig. 24 y fig. 25). La transcripción del gen 5α -R2 aumentó tras ser sometida la rata a estrés medio ambiental, presentando un comportamiento similar al encontrado en la rata macho. Mientras que, el estrés medio ambiental produjo un descenso en los niveles de mRNA de la 5α -R1, presentando así un comportamiento opuesto al macho, y por lo tanto, sexualmente dimórfico. La rata hembra en condiciones fisiológicas, presenta altos niveles de mRNA de la 5α -R1, así como de progesterona. Ello podría ser la explicación de que niveles de allopregnanolona en el cerebro de rata sean superiores en la hembra que en el macho (Torres y col., 2001). Estos datos están de acuerdo con estudios realizados por Ordyan y Pivina (2003), que demuestran que los niveles de ansiedad de ratas macho adulta son significativamente superiores a los de rata hembra adulta de edad reproductiva.

Una posible explicación al descenso en los niveles de mRNA de la 5α -R1 encontrado en rata hembra, tras ser estresada medio ambientalmente, podría ser un

mecanismo de defensa para evitar la sobreexpresión del gen 5α -R1, ya que dicho gen se encuentra muy expresado en rata hembra en condiciones fisiológicas. Diversos autores Mensah-Nyagem y col., (1999); Do-Rego y col., (2000), demostraron en este sentido que la activación de los receptores $GABA_A$ inhiben la actividad de las enzimas 5α -R y 3α -HSD. Los neuroesteroides THP y THDOC, que son potentes moduladores alostéricos del $GABA_A$ -R, regulan su biosíntesis por un mecanismo de feed-back (Dubrovsky, 2005). De acuerdo con nuestros resultados, los neuroesteroides 3α - 5α -reducidos ejercen también un mecanismo de control sobre su propia biosíntesis, regulando la expresión de la 5α -R1, al igual que se ha sugerido para el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Barbaccia, 2001).

1. La T administrada en el periodo de diferenciación sexual del SNC, modifica los niveles de mRNA de las isoenzimas 5 α -Reductasa tipo1 y tipo2 en la corteza prefrontal de la rata neonatal macho y hembra.
2. La DHT administrada en el periodo de diferenciación sexual del SNC, modifica los niveles de mRNA de las isoenzimas 5 α -Reductasa tipo1 y tipo2 en la corteza prefrontal de la rata neonatal macho y hembra.
3. La T administrada neonatalmente modifica en la rata adulta macho y hembra los niveles de mRNA de las isoenzimas 5 α -Reductasa tipo1 y tipo2 en la corteza prefrontal, así como el patrón de regulación de ambas isoenzimas por T y DHT.
4. La DHT administrada neonatalmente modifica en la rata adulta macho y hembra los niveles de mRNA de las isoenzimas 5 α -Reductasa tipo1 y tipo2 en la corteza prefrontal, así como el patrón de regulación de ambas isoenzimas por T y DHT.
5. Los efectos ejercidos por la T y DHT administrada neonatalmente sobre los isoenzimas 5 α -Reductasa tipo1 y tipo2 en el animal neonato y adulto fueron a veces diferentes, lo que confiere a DHT un papel hormonal independiente de T.

6. El estrés físico agudo producido por natación forzada aumenta los niveles de mRNA de ambas isoenzimas de la 5 α -Reductasa en rata macho adulta
7. El estrés medio ambiental modifica los niveles de mRNA de las isoenzimas 5 α -Reductasa tipo 1 y tipo 2 en rata macho y hembra adulta.
8. El estrés medio ambiental modifica de forma opuesta los niveles de mRNA de las isoenzimas 5 α -Reductasa tipo1 en macho y hembra, lo que indica un comportamiento sexo dimórfico de esta isoenzima ante esta situación de estrés
9. Por ultimo, queremos resaltar que las isoenzimas de la 5 α -Reductasa juegan un papel decisivo en la diferenciación sexual del SNC, así como en su mantenimiento durante la edad adulta. Las hormonas T y DHT, así como las situaciones de estrés físico y medio ambiental al regular dichos isoenzimas modifican de forma decisiva estos acontecimientos.

- Abdelgadir SE, Resko JA, Ojeda SR, Lephart ED, McPhaul MJ, Roselli CE. 1994. Androgens regulate aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in rat brain. *Endocrinology* 135(1): 395-401.
- Akgun S, Ertel N, Imperato-McGinley J, Sayli B, Shackleton CHL. 1986. Familial male pseudohermaphroditism in a Turkish village due to 5alpha-reductase deficiency. *Am. J. Med.* 81: 267-274.
- Amateau SK, Alt JJ, Stamps CL, McCarthy MM. 2004. Brain estradiol content in newborn rats: sex differences, regional heterogeneity, and possible de novo synthesis by the female telencephalon. *Endocrinology* 145(6): 2906-17.
- Andersson S, Bishop RW, Russell DW. 1989. Expression and regulation of steroid 5 alpha-reductase, an enzyme essential for male sexual differentiation. *J. Biol. Chem.* 25: 16249-55.
- Andersson S, Russell DW. 1990. Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5alpha-reductases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3640-3644.
- Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, Russell DW. 1991. Deletion of steroid 5alpha-reductase-2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* 354: 159-161.
- Andrews N, Zharkowsky A, File SE. 1992. Acute stress down regulates benzodiazepine receptors: Reversal by diazepam. *Eur. J. Pharmacol.* 210: 247-251.
- Avila DM, Fuqua SA, George FW, McPhaul MJ. 1998. Identification of genes expressed in the rat prostate that are modulated differently by castration and Finasteride treatment. *J. Endocrinol.* 159: 403-11.

- Bahceci M, Ersay AR, Tuzcu A, Hiort O, Richter-Unruh A, Gokalp D. 2005. A novel missense mutation of 5-alpha reductase type 2 gene (SRD5A2) leads to severe male pseudohermaphroditism in a Turkish family. *Urology* 66: 407-10.
- Barbaccia ML, Roscetti G, Trabucchi M, Purdy RH, Mostallino MC, Perra C, Concas A, Biggio G. 1996. Isoniazid-induced inhibition of GABAergic transmission enhances neurosteroid content in rat brain. *Neuropharmacology* 35: 1299-1305.
- Barbaccia ML, Serra M, Purdy RH, Biggio G. 2001. Stress and neuroactive steroids. *Int. Rev. Neurobiol.* 46: 243-72.
- Baulieu EE. 1991. Neurosteroids: a new function in the brain. *Biol. Cell.* 71(1-2): 3-10.
- Baulieu EE. 1998. Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* 23(8) :963-87.
- Behl C, Lezoualc'h F, Trapp T, Widmann M, Skutella T, Holsboer F. 1997. Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons in vitro. *Endocrinology* 138: 101-6.
- Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL. 1984. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J. Urology* 132: 474-479.
- Besman MJ, Yanagibashi K, Lee TD, Kawamura M, Hall PF, Shively JE. 1989. Identification of des-(Gly-Ile)-endozepine as an effector of corticotropin-dependent adrenal steroidogenesis: stimulation of cholesterol delivery is mediated by the peripheral benzodiazepine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86(13): 4897-901.
- Biggio G, Corda MG, Dermontis G, Rossetti Z, Gessa GL. 1980. Sudden decrease in cerebellar GABA binding induced by stress. *Pharmacol. Res. Commun.* 12: 489-493.

- Biggio G, Corda MG, Concas A, Dermontis G, Rossetti Z, Gessa GL. 1981. Rapid changes in GABA binding induced by stress in different areas of the rat brain. *Brain Res.* 229: 363-369.
- Biggio G. 1983. The action of stress, β -carbolines, diazepam and Ro 15-1788 on GABA receptors in the rat brain. In: *Benzodiazepine Recognition Site Ligands: Biochemistry and Pharmacology.* pp. 105-17, Biggio, G. and Costa, E. (eds.), Raven Press, New York.
- Biggio G, Concas A, Mele S, Corda MG. 1987. Changes in GABAergic transmission by zolpidem, an imidazopyridine with preferential affinity for type I benzodiazepine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 161: 173-180.
- Biggio G, Concas A, Mostallino MC, Purdy RH, Trabucchi M, Barbaccia ML. 1996. Inhibition of GABAergic transmission enhances neurosteroid concentrations in the rat brain. In: *The Brain: Source and Target for Sex Steroid Hormones.* pp. 43-62, Genazzi, A.R., Petraglia, F. and Purdy, R.H. (eds.), Parthenon Press, New York.
- Biggio G, Barbaccia ML, Follesa P, Serra M, Purdy RH, Concas A. 2000. Neurosteroids and GABAA receptor plasticity. In: *GABA in the Nervous System. The View at Fifty Years.* pp. 207-232, Olsen, R.W. and Martin, D.L. (eds.), Lippincott, New York.
- Bolton MC, Dudhia J, Bayliss MT. 1996. Quantification of aggrecan and link-protein mRNA in human articular cartilage of different ages by competitive reverse transcriptase-PCR. *Biochem. J.* 15;319 :489-98.
- Bondy PK. 1981. In *Williams Textbook of Endocrinology*, ed. JD Wilson, DW Foster, pp. 816-90. Philadelphia: Saunders
- Brooks JR, Baptista EM, Berman C, Ham EA, et al. 1981. Response of rat ventral prostate to a new and novel 5 alpha-reductase inhibitor. *Endocrinology* 109: 830-6.

- Bruchovsky N, Rennie PS, Batzold FH, Goldenberg SL, Fletcher T, McLoughlin MG. 1988. Kinetic parameters of 5 alpha-reductase activity in stroma and epithelium of normal, hyperplastic, and carcinomatous human prostates. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67: 806-16.
- Cai LQ, Zhu YS, Katz MD, Herrera C, Baez J, DeFillo-Ricart M, Shackleton CHL, Imperato-McGinley J. 1996. 5alpha- Reductase type 2 gene mutation in the Dominican Republic. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 1730-1735.
- Callard GV. 1984. Aromatization in brain and pituitary. In *Metabolism of Hormonal Steroids in the Neuroendocrine Structures* (Edited by F. Celotti, F. Naffolin and L. Martini). Raven Press, New York pp. 79-102.
- Can S, Zhu YS, Cai LQ, Ling Q, Katz MD, Akgun S, Shackleton CHL, Imperato-McGinley J. 1998. The identification of 5alpha-reductase-2 and 17b-hydroxysteroid dehydrogenase-3 gene defects in male pseudohermaphrodites from a Turkish kindred. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 560-569.
- Celotti F, Melcangi RC, Negri-Cesi P, Poletti A. 1991. Testosterone metabolism in brain cells and membranes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 40: 675-678.
- Celotti F, Melcangi RC, Martini L. 1992. The 5alpha-reductase in the brain: Molecular aspects and relation to brain function. *Front. Neuroendocrinol.* 13: 163-215.
- Celotti F, Negri-Cesi P, Poletti A. 1997. Steroid metabolism in the mammalian brain: 5alpha-reduction and aromatization. *Brain Res. Bull.* 44(4): 365-75.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *AnaL. Biochem.* 162(1): 156-9.

- Cicek MS, Conti DV, Curran A et al. 2004. Association of prostate cancer risk and aggressiveness to androgen pathways genes: SRD5A2, CYP17, and the AR. *Prostate* 59: 69-76.
- Colciago A, Celotti F, Pravettoni A, Mornati O, Martini L, Negri-Cesi P. 2005. Dimorphic expression of testosterone metabolizing enzymes in the hypothalamic area of developing rats. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 31: 107-16.
- Concas A, Corda MG, Biggio G. 1985 Involvement of benzodiazepine recognition sites in the foot shock-induced decrease of low affinity GABA receptors in the rat cerebral cortex. *Brain Res.* 341: 50-56.
- Concas A, Mele S, Biggio G. 1987. Foot shock stress decreases chloride efflux from rat brain neurosynaptosomes. *Eur. J. Pharmacol.* 135: 423-427.
- Corbier PB, Kerdelhue R, Picon Jroffi. 1978. Changes in testicular weight and serum gonadotropin and testosterone levels before, during, and after birth in the perinatal rat. *Endocrinology* 103: 1985- 1991.
- Corpechot C, Young J, Calvel M, et al. 1993. Neurosteroids: 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one and its precursors in the brain, plasma, and steroidogenic glands of male and female rats. *Endocrinology* 133(3): 1003-9.
- Diani AR, Mulholland MJ, Shull KL, Kubicek MF, Johnson GA, Schostarez HJ, Brunden MN, Buhl AE. 1992. Hair growth effects of oral administration of finasteride, a steroid 5 alpha-reductase inhibitor, alone and in combination with topical minoxidil in the balding stump-tail macaque. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74: 345-50.
- Do-Rego JL, Mensah-Nyagan GA, Beaujean D, Vaudry D, Sieghart W, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H. 2000. Gamma-Aminobutyric acid, acting through gamma -

- aminobutyric acid type A receptors, inhibits the biosynthesis of neurosteroids in the frog hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97(25): 13925-30.
- Drugan RC, Morrow AL, Weizman R, Weizman A, Deutsch SI, Crawley JN, Paul SM. 1989. Stress-induced behavioural depression in the rat is associated with a decrease in GABA receptor-mediated chloride ion flux and brain benzodiazepine receptor occupancy. *Brain Res.* 487: 45-51.
- Dubrovsky BO. 2005. Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 29(2): 169-92.
- Eicheler W, Tuohimaa P, Vilja P, Adermann K, Forssmann WG, Aumuller G. 1994. Immunocytochemical localization of human 5 alpha-reductase 2 with polyclonal antibodies in androgen target and non-target human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 42: 667-675.
- Enderle-Schmitt U, Neuhaus C, Aumoiler G. 1989. Solubilization of nuclear steroid 5 alpha-reductase from rat ventral prostate. *Biochim. Biophys. Acta* 987: 21-28.
- Fang S, Anderson KM, Liao S. 1969. Receptor proteins for androgens. On the role of specific proteins in selective retention of 17-beta-hydroxy-5-alpha-androstan-3-one by rat ventral prostate in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 244: 6584-95.
- Febbo PG, Kantoff PW, Platz EA, et al. 1999. The V89L polymorphism in the 5 alpha-reductase type 2 gene and risk of prostate cancer. *Cancer Res.* 59: 5878-5882.
- File SE, Zangrossi HJr, Andrews N. 1993. Novel environment and cat odor change GABA and 5HT release and uptake in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45: 931-934.

- Foster BA, Cunha GR. 1999. Efficacy of various natural and synthetic androgens to induce ductal branching morphogenesis in the developing anterior rat prostate. *Endocrinology* 140: 318-328.
- Frederiksen DW, Wilson JD. 1971. Partial characterization of the nuclear reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: delta 4-3-steroid 5 alpha-oxidoreductase of rat prostate. *J. Biol. Chem.* 246: 2584-93.
- Goldstain LA, Sengelaub DR. 1992. Timing and duration of dihydrotestosterone treatment affect the development of motoneuron number and morphology in a sexually dimorphic rat spinal nucleus. *J. Comp. Neurol.* 326: 147-157.
- Goldstein LA, Sengelaub DR. 1994. Differential effects of dihydrotestosterone and estrogens on the development of motoneuron morphology in a sexually dimorphic rat spinal cord. *J. Neurobiol.* 25: 878-892.
- Gorski RA, Harlan RE, Jacobson CD, Shryne JE, Southam AM. 1980. Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. *J. Comp. Neurol.* 15: 529-39.
- Griffin JE, Wilson JD. 1989. The androgen resistance syndromes: 5alpha-reductase deficiency, testicular feminization, and related syndromes. In: Striver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, ed 6. McGraw-Hill, New York, pp 1919-1944
- Grino PB, Griffin JE, Wilson JD. 1990. Testosterone at high concentration interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology* 126: 1165-1172.
- Guillamon A, Segovia S. 1997. Sex differences in the vomeronasal system. *Brain Res. Bull.* 44: 377-82.

- Gustafsson JA, Stenberg A. 1974a. Irreversible androgenic programming at birth of microsomal and soluble rat liver enzymes active on androstene-3,17-dione and 5-alpha-androstane-3alpha,17beta-diol. *J. Biol. Chem.* 249: 711-718.
- Gustafsson JA, Stenberg A. 1974b. Neonatal programming of androgen responsiveness of liver of adult rats. *J. Biol. Chem.* 249: 719-723.
- Haefely WE. 1994. Allosteric modulation of the GABAA receptor channel: A mechanism for interaction with a multitude of central nervous system functions. In: *The Challenge of Neuropharmacology*. pp. 15-39, Mohler, H.C. and Da Prada, M. (eds.), Editions Roche, Basel.
- Harada N, Yamada K, Foidart A, Balthazart J. 1992. Regulation of aromatase cytochrome P-450 (estrogen synthetase) transcripts in the quail brain by testosterone. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 15: 19-26.
- Hauser KF, McLusky NJ, Toran-Allerand CD. 1987. Androgen action in fetal spinal cultures: Metabolic and morphologic aspects. *Brain Res.* 406: 62-72.
- Houston B, Chisholm GD, Habib FK. 1985. Solubilization of human prostatic 5 alpha-reductase. *J. Steroid Biochem.* 22: 461-67
- Ichihara K, Tanaka C. 1987. Specific stimulation of steroid 5 alpha-reductase solubilized from rat liver microsomes by endogenous phosphatidylserine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16: 482-7.
- Iehle C, Radvanyi F, Gil Diez de Medina S, Ouafik LH, Gerard H, Chopin D, Raynaud JP, Martin PM. 1999. Differences in steroid 5alpha-reductase iso enzymes expression between normal and pathological human prostate tissue. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 68: 189-95.

- Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, Peterson RE. 1974. Steroid 5alpha-reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science* 186: 1213-1216.
- Imperato-McGinley J, Peterson RE, Gautier T, Sturla E. 1979. Male pseudohermaphroditism secondary to 5alpha-reductase deficiency: a model for the role of androgens in both the development of the male phenotype and the evolution of a male gender identity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 11: 637-645.
- Imperato-McGinley J, Peterson RE, Gautier T, Shackleton CHL, Arthur A. 1985. Decreased urinary C19 and C21 steroid 5alpha-metabolites in parents of male pseudohermaphrodites with 5alpha-reductase deficiency: detection of carriers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 60: 553-558.
- Imperato-McGinley J, Akgun S, Ertel NH, Sayli B, Shackleton CHL. 1987. The coexistence of male pseudohermaphrodites with 17-ketosteroid reductase deficiency and 5alpha-reductase deficiency within a Turkish kindred. *Clin. Endocrinol.* 27: 135-143.
- Imperato-McGinley J, Miller M, Wilson JD, Peterson RE, Shackleton, CHL, Gajdusek DC. 1991. A cluster of male pseudohermaphrodites with 5 alpha-reductase deficiency in Papua New Guinea. *Clin. Endocrinol.* 34: 293-298.
- Imperato-McGinley J. 1992. Disorders of sexual differentiation. In: Wyngaarden, J.B., Smith, L.H., Jr, Bennett, J.C. (Eds.), *Cecil Textbook of Medicine*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 132-1332.
- Imperato-McGinley J, Gautier T, Zirinsky K, et al. 1992. Prostate visualization studies in males homozygous and heterozygous for 5alpha-reductase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75: 1022-1026.

- Imperato-McGinley J, Gautier T, Cai LQ, Yee B, Epstein J, Pochi P. 1993. The androgen control of sebum production. Studies of subjects with dihydrotestosterone deficiency and complete androgen insensitivity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76: 524-8.
- Imperato-McGinley J. 1996. Male pseudohermaphroditism. In: Adashi, E.Y., Rock, J.A., Rosenwaks, Z. (Eds.), *Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 936-955.
- Jenkins EP, Andersson S, Imperato-McGinley J, Wilson JD, Russell DW. 1992. Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5 alpha-reductase. *J. Clin. Invest.* 89: 293-300.
- Jurman ME, Erulkar SD, Krieger NR. 1982. Testosterone 5alpha-reductase in spinal cord of *Xenopus laevis*. *J. Neurochem.* 38: 657-661.
- Kantoff PW, Febbo PG, Giovannucci E, et al. 1997. A polymorphism of the 5 alpha-reductase gene and its association with prostate cancer: a case-control analysis. *Cancer Epidemiol. Biomark Prevent.* 6: 189-192.
- Karolczak M, Kupperts E, Beyer C. 1998. Developmental expression and regulation of aromatase and 5alpha-reductase type I mRNA in the male and female Mouse hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* 10: 267-74.
- Katz MD, Cai L-Q, Zhu YS, Herrera C, DeFillo-Ricart M, Shackleton CHL, Imperato-McGinley J. 1995. The biochemical and phenotypic characterization of females homozygous for 5alpha-reductase-2 deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 3160-3167.

- Kovacs WJ, Griffin JE, Weaver DD, Carlson BR, Wilson JD. 1984. A mutation that causes lability of the androgen receptor under conditions that normally promote transformation to the DNA binding state. *J. Clin. Invest.* 73: 1095-1104.
- Krueger KE, Papadopoulos V. 1990. Peripheral-type benzodiazepine receptors mediate translocation of cholesterol from outer to inner mitochondrial membranes in adrenocortical cells. *J. Biol. Chem.* 265(25): 15015-22.
- Labrie F, Sugimoto Y, Luu-The V, Simard J, Lachance Y, Bachvarov D, Leblanc G, Durocher F, Paquet N. 1992. Structure of human type 2 5alpha-reductase gene. *Endocrinology* 131: 1571-1573.
- Lauber ME, Lichtensteiger W. 1996. Ontogeny of 5alpha-reductase (type 1) messenger ribonucleic acid expression in rat brain: Early presence in germinal zones. *Endocrinology* 137: 2718-2730.
- Lephart ED, Ladle DR, Jacobson NA, Rhees RW. 1996. Inhibition of brain 5 alpha-reductase in pregnant rats: effects on enzymatic and behavioral activity. *Brain. Res.* 739(1-2): 356-60.
- Levy MA, Brandt M, Greway AT. 1990. Mechanistic studies with solubilized rat liver steroid 5alpha-reductase. *Biochemistry* 29: 2808-2815.
- Levy MA, Brandt M, Sheedy KM, Holt DA, Heaslip JI, Trill JJ, Ryan PJ, Morris RA, Garrison LM, Bergsma DJ. 1995. Cloning, expression and functional characterization of type 1 and type 2 steroid 5alpha-reductases from Cynomolgus monkey: Comparison with human and rat isoenzymes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52: 307-319.
- Leyden J, Bergfeld W, Drake L, et al. 2004. Systemic type I 5 alpha-reductase inhibitor is ineffective in the treatment of acne vulgaris. *Am. Acad. Dermatol.* 50: 443-7.

- Liang T, Heiss CE, Ostrove S, Rasmusson GH, Cheung A. 1983. Binding of a 4-methyl-4-aza-steroid to 5 alpha-reductase of rat liver and prostate microsomes. *Endocrinology* 112: 1460-68.
- Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM. 1988. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 240: 327-330.
- Lucky AW, Biro FM, Huster GA, Morrison JA, Ratterman J. 1994. Acne vulgaris in premenarchal girls. *Arch. Dermatol.* 130: 308-14.
- Luo JT, Dunn TA, Ewing CM, Walsh PC, Isaacs WB. 2003. Decreased gene expression of steroid 5 alpha-reductase 2 in human prostate cancer: implications for finasteride therapy of prostate carcinoma. *Prostate* 57: 134-139.
- MacLusky NJ, Naftolin F. 1981. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 211: 1294-1302.
- MacLusky NJ, Clark CR, Shanabroug M, Naftolin F. 1987. Metabolism of androgens in the spinal cord of the rat. *Brain Res.* 422: 83-91.
- Mahendroo MS, Cala KM, Russell DW. 1996. 5 alpha-Reduced androgens play a key role in murine parturition. *Mol. Endocrinol.* 10: 380-392.
- Mahendroo MS, Cala Km, Landrum CP, Russell DW. 1997. Fetal death in mice lacking 5 alpha-reductase type 1 caused by estrogen excess. *Mol. Endocrinol.* 11: 917-927.
- Mahendroo MS, Russell DW. 1999. Male and female isoenzymes of steroid 5alpha-reductase. *Rev. Reprod.* 4: 179-183.

- Mahendroo MS, Cala KM, Hess DL, Russel DW. 2001. Unexpected virilization in male mice lacking steroid 5alpha-reductase enzymes. *Endocrinology* 142: 4652–4662.
- Mainwaring WI. 1969. A soluble androgen receptor in the cytoplasm of rat prostate. *J. Endocrinol.* 45: 531-41.
- Majewska MD, Force-Rice F, Kalkay G. 1989. Pregnancy-induced alteration of GABAA receptor sensitivity in maternal brain: An antecedent of post partum “blues”? *Brain Res.* 482: 397-401.
- Majewska MD. 1992. Neurosteroids: Endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog. Neurobiol.* 38: 379-395.
- McCrohan A, Morrissey C, O'Keane C, Mulligan N, Watson C, Smith J, Fitzpatrick JM, Watson RW. 2006. Effects of the dual 5 alpha-reductase inhibitor dutasteride on apoptosis in primary cultures of prostate cancer epithelial cells and cell lines. *Cancer* 15: 2743-52.
- McPhaul MJ, Herbst MA, Matsumine H, Young M, Lephart ED. 1993. Diverse mechanisms of control of aromatase gene expression. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44: 341-6.
- Martini L. 1982. The 5alpha-reduction of testosterone in the neuroendocrine structures. Biochemical and physiological implications. *Endocrine Rev.* 3: 1-25.
- Matsumoto A, Micevych PE, Arnold P. 1988. Androgen regulates synaptic input to motoneurons of the adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 8: 4168-4176.
- McEwen B. 1999. The molecular and neuroanatomical basis for estrogen effects in the central nervous system. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84: 1790-1797.

- McPhaul MJ, Marcelli M, Zoppi S, Griffin JE, Wilson JD. 1993. Spectrum of mutations in the androgen receptor gene that causes androgen resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76: 17-23.
- McPaul MJ, Ypoing M. 2001. Complexities of androgen action. *J. Am. Acad. Dermatol.* 45: 87-94.
- Meaney MJ, Aitken DH, Jensen LK, McGinnis MY, McEwen BS. 1985. Nuclear and cytosolic androgen receptor levels in the limbic brain of neonatal male and female rats. *Dev. Brain Res.* 23: 179-185.
- Medina JH, Novas ML, Wolfman CN, Levi de Stein, De Robertis E. 1983. Benzodiazepine receptors in rat cerebral cortex and hippocampus undergo rapid and reversible changes alter acute stress. *Neuroscience* 9: 331-335.
- Meinhardt H. 1978. Models for the ontogenetic development of higher organisms. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 80: 47-104.
- Melcangi RC, Celotti F, Ballabio M, Castano P, Poletti A, Milani S, Martini L. 1988. Ontogenetic development of the 5alpha-reductase in the rat brain: Cerebral cortex, hypothalamus, purified myelin and isolated oligodendrocyte. *Dev. Brain. Res.* 44: 181-188.
- Melcangi C R, Celotti F, Ballabio M, Castano P, Massarelli R, Poletti A, Martini L. 1990. 5 alpha-reductase activity in isolated and cultured neuronal and glial cells of the rat. *Brain Res.* 516: 229 -236.
- Melcangi RC, Poletti A, Cavarretta I, Celotti F, Colciago A, Magnaghi V, Motta M, Negri-Cesi P, Martini L. 1998. The 5alpha-reductase in the central nervous system: expression and modes of control. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 65(1-6): 295-9.

- Mendelson WB, Martin JV, Perlis M, Wagner R, Majewska MD, Paul SM. 1987. Sleep induction by an adrenal steroid in the rat. *Psychopharmacology* 93: 226-229.
- Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Beaujean D, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H. 1999. Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 51(1): 63-81.
- Milewich L, Mendonca BB, Arnhold I, Wallace AM, Donaldson MD, Wilson JD, Russell DW. 1995. Women with steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency have normal concentrations of plasma 5 alpha-dihydroprogesterone during the luteal phase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 3136-3139.
- Moore CR, Price D, Gallagher TF. 1930. *Am. J. Anat.* 45: 71-107.
- Moore RJ, Wilson JD. 1972. Localization of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: 4-3-ketosteroid 5-oxidoreductase in the nuclear membrane of the rat ventral prostate. *J. Biol. Chem.* 10: 958-67.
- Moore RJ, Wilson JD. 1973. The effect of androgenic hormones on the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate:delta-4-3-ketosteroid 5 alpha-oxidoreductase of rat ventral prostate. *Endocrinology* 93: 581-92.
- Moore RJ, Wilson JD. 1974. Extraction of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate:delta 4-3-ketosteroid-5-alpha oxidoreductase of rat prostate with digitonin and potassium chloride. *Biochemistry* 2: 450-6.
- Mukhin AG, Papadopoulos V, Costa E, Krueger KE. 1989. Mitochondrial benzodiazepine receptors regulate steroid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86(24): 9813-6.

- Negri-Cesi P, Poletti A, Celotti F. 1996. Metabolism of steroids in the brain: a new insight in the role of 5 alpha-reductase and aromatase in the brain differentiation and functions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 58: 455-466.
- Negri-Cesi P, A. Poletti L, Martini F. Piva. 1999. Steroid metabolism in the brain: role in sexual differentiation, in: A. Matsumoto (ed.), *Sexual Differentiation of the Brain*, CRC Press, Boca Raton. pp. 33-58.
- Negri-Cesi P, Colciago A, Celotti F, Motta M. 2004. Sexual differentiation of the brain: role of testosterone and its active metabolites. *J. Endocrinol. Invest.* 27: 120-7
- Noma Y, Sideras P, Naito T, Bergstedt-Lindquist S, Azuma C, et al. 1986. Cloning of cDNA encoding the murine IgG1 induction factor by a novel strategy using SP6 promoter. *Nature* 319: 640-46.
- Nordenskjold A, Magnus O, Aagenaes O, Knudtzon J. 1998. Homozygous mutation (A228T) in the 5 alpha-reductase type 2 gene in a boy with 5alpha-reductase deficiency: genotype-phenotype correlations. *Am. J. Med. Genet.* 80: 269-72.
- Normington K, Russell DW. 1992. Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5alpha-reductase isozymes. Evidence for distinct physiological functions. *J. Biol. Chem.* 267: 19548-19554.
- Nowakowski H, Lenz W. 1961. Genetic aspects in male hypogonadism. *Rec. Prog. Hormone Res.* 17: 53-95
- Olsen RW, Tobin AJ. 1990. Molecular biology of GABAA receptors. *FASEB J.* 4(5): 1469-80.
- Ordyan NE, Pivina SG. 2003. Anxiety levels and neurosteroid synthesis in the brains of prenatally stressed male rats. *Neurosci. Behav. Physiol.* 33(9): 899-903.

- Patte-Mensah C, Penning TM, Mensah-Nyagan AG. 2004. Anatomical and cellular localization of neuroactive 5alpha-3alpha-reduced steroid-synthesizing enzymes in the spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 20: 286-99.
- Paul S M, Purdy R H. 1992. Neuroactive steroids. *FASEB J.* 6: 2311-2322.
- Peterson RE, Imperato-McGinley J, Gautier T, Sturla E. 1977. Male pseudohermaphroditism due to steroid 5alpha-reductase deficiency. *Am. J. Med.* 62: 170-191.
- Poletti A, Celotti F, Motta M, Martini L. 1996. Characterization and subcellular localization of rat 5alpha-reductases type 1 and type 2 expressed in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 314: 1047-1052.
- Poletti A, Celotti F, Rumio C, Rabuffetti M, Martini L. 1997. Identification of type 1 5alpha-reductase in myelin membranes of male and female rat brain. *Mol. Cell. Endocrinol.* 129: 181-190.
- Poletti A, Negri-Cesi P, Rabuffetti M, Colciago A, Celotti F, Martini L. 1998. Transient expression of the type 2 5alpha-reductase isozyme in the brain of the late fetal and early post-natal life. *Endocrinology* 139: 2171-2178.
- Poletti A, Martini LR. 1999. Androgen-activating enzymes in the central nervous system. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69(1-6): 117-22.
- Pozzi P, Bendotti C, Simeoni S, Piccioni F, Guerini V, Marron TU, Martini L, Poletti A. 2003. Androgen 5 alpha-reductase type 2 is highly expressed and active in rat spinal cord motor neurones. *J. Neuroendocrinol.* 15: 882-7.

- Price P, Wass JAH, Griffin JE, et al. 1984. High dose androgen therapy in male pseudohermaphroditism due to 5 alpha-reductase deficiency and disorders of the androgen receptor. *J. Clin. Invest.* 74: 1496-1508.
- Purdy RH, Morrow AL, Moore PH Jr, Paul SM. 1991. Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88(10): 4553-7.
- Kuttent F, Mowszowicz I, Schaison G, Mauvais-Jarvis P. 1977. Androgen production and skin metabolism in hirsutism. *J. Endocrinol.* 1: 83-91.
- Raeymaekers L. 1993. Quantitative PCR: theoretical considerations with practical implications. *Anal. Biochem.* 1;214(2): 582-5.
- Raff MC. 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 2: 397-400.
- Rainham DG, Smoyer-Tomic KE. 2003. The role of air pollution in the relationship between a heat stress index and human mortality in Toronto. *Environ. Res.* 93(1): 9-19.
- Randall VA. 1994. Role of 5 alpha-reductase in health and disease. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 8: 405-31.
- Rapkin AJ, Morgan M, Goldman L, Brann DW, Simone D, Mahesh VB. 1997. Progesterone metabolite allopregnanolone in women with premenstrual syndrome. *Obstet. Gynecol.* 90(5): 709-14.
- Rittmaster RS, Uno H, Povar ML, Mellin TN, Loriaux DL. 1987. The effects of N,N-diethyl-4-methyl-3-oxo-4-aza-5 α -androstane-17betacarboxamide, a 5 alpha-reductase inhibitor and antiandrogen, on the development of baldness in the stumptail macaque. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65: 188-93.

- Rodriguez-Dorantes M, Lizano-Soberon M, Camacho-Arroyo I, et al. 2002. Evidence that steroid 5alpha-reductase isozyme genes are differentially methylated in human lymphocytes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80: 323-30.
- Rosciszewske D, Buntner B, Guz I, Zawisza L. 1986. Ovarian hormones, anticonvulsant drugs, and seizure during the menstrual cycle in women with epilepsy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 49:47-51.
- Russell DW, Wilson JD 1994. Steroid 5a-reductase: two genes/two enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 63: 25-61.
- Sansone G, Reisner RM. 1971. Differential rates of conversion of testosterone to dihydrotestosterone in acne and in normal human skin a possible pathogenic factor in acne. *J. Inves. Dermatol.* 56: 366-7.
- Sapolsky RM, Packan DR, Vale WW. 1988. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: in vitro demonstration. *Brain Res.* 453: 369-371.
- Sargent NS, Habib FK. 1991. Partial purification of human prostatic 5 alpha-reductase (3-oxo-5alpha-steroid: NADP+ 4-ene-oxido-reductase; EC 1.3.1.22) in a stable and active form. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 38: 73-7.
- Schneider JJ, Horstmann PM. 1951. Effects of incubating desoxycorticosterone with various rat tissues. *J. Biol. Chem.* 191: 327-38.
- Schneider JJ. 1952. Further isolation of adrenocortical compounds from male urine. *J. Biol. Chem.* 194: 337-48.
- Schofield PR, Rhee LM, Peralta EG. 1987. Primary structure of the human beta-adrenergic receptor gene. *Nucleic. Acids Res.* 15(8): 3636.

- Schwartz JI, Tanaka WK, Wang DZ, Geissler LA, Hafkin B, Gertz BJ. 1997. MK-386, an inhibitor of 5 α -reductase type 1, reduces dihydrotestosterone concentrations in serum and sebum without affecting dihydrotestosterone concentrations in semen. *J. Clin. Endocr. Metab.* 82: 1373-1377.
- Segovia S, del Cerro MC, Ortega E, Perez-Laso C, Rodriguez-Zafra C, Izquierdo MA, Guillamon A. 1996. Role of GABAA receptors in the organization of brain and behavioural sex differences. *Neuroreport.* 4: 2553-7.
- Selye H. 1941. Anesthetic effect of steroid hormones. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 46: 116-121.
- Selye H. 1942. Correlation between the chemical structure and the pharmacological actions of the steroids. *Endocrinology* 30: 437-453.
- Serafini P, Lobo RA. 1985. Increased 5- α -reductase activity in idiopathic hirsutism. *Fertil Steril.* 43: 74-8.
- Serra M, Sanna E, Concas A, Foddi C, Biggio G. 1991. Foot shock stress enhanced the increase of [35S] TBPS binding in the rat cerebral cortex and the convulsions induced by isoniazid. *Neurochem. Res.* 16: 17-22.
- Siiteri PK, Wilson JD. 1974. J. Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. *Clin. Endocrinol. Metab.* 38: 113-25
- Skalba P, Dabkowska-Huc A, Kazimierczak W, Samojedny A, Samojedny MP, Chelmicki Z. 2006. Content of 5- α -reductase (type 1 and type 2) mRNA in dermal papillae from the lower abdominal region in women with hirsutism. *Clin. Exp. Dermatol.* 31: 564-70.

- Span PN, Voller MC, Smals AG, Sweep FG, Schalken JA, Feneley MR, Kirby RS. 1999. Selectivity of finasteride as an in vivo inhibitor of 5alpha-reductase isozyme enzymatic activity in the human prostate. *J. Urol.* 161: 332-7.
- Steers WD. 2001. 5alpha-reductase activity in the prostate. *Urology.* 58: 17-24.
- Takani K, Kawashima S. 1993. Culture of rat brain preoptic area neurons: effects of sex steroids. *Int. J. Dev. Neurosci.* 11: 63-70.
- Takayasu S, Wakimoto H, Itami S, Sano S. 1980. Activity of testosterone 5 alpha-reductase in various tissues of human skin. *Invest. Dermatol.* 74: 187-91.
- Tanaka M. 2007. Heat stress standard for hot work environments in Japan. *Ind. Health.* 45(1): 85-90.
- Taylor MF, Bhattacharyya AK, Collins DC. 1995. Inhibition of rat steroid 5alpha-reductase (isozyme 1) by suramin. *Steroids* 60: 452-456.
- Thiboutot D, Bayne E, Thorne J, Gilliland K, Flanagan J, Shao I, et al. 2000. Immunolocalization of 5 alpha-reductase isozymes in acne lesions and normal skin. *Arch. Dermatol.* 136: 1125-9.
- Thiele S, Hoppe U, Holterhus PM, Hiort O. 2005. Isoenzyme type 1 of 5alpha-reductase is abundantly transcribed in normal human genital skin fibroblasts and may play an important role in masculinization of 5alpha-reductase type 2 deficient males. *Eur. J. Endocrinol.* 152: 875-80.
- Thigpen AE, Davis DL, Gautier T, Imperato-McGinley J, Russell DW. 1992. The molecular basis of steroid 5 alpha-reductase deficiency in a large Dominican kindred. *New Engl. J. Med.* 327: 1216-1219.

- Thigpen AE, Silver RI, Guileyardo JM, Casey M, McConnel JD, Russell DW. 1993. Tissue distribution and ontogeny of steroid 5alpha-reductase isozyme expression. *J. Clin. Invest.* 92: 903-910.
- Thomas LN, Lazier CB, Gupta R, et al. 2005. Differential alterations in 5alpha-reductase type 1 and type 2 levels during development and progression of prostate cancer. *Prostate* 63: 231-239.
- Torres JM, Ortega E. 2006. Steroid 5alpha-reductase isozymes in the adult female rat brain: central role of dihydrotestosterone. *J. Mol. Endocrinol.* 36(2): 239-45.
- Torres JM, Ortega E. 2004a. Precise quantitation of steroid 5alpha-reductase type 1 mRNA levels by RT-PCR in female rat liver. *Endocr. Res.* 30(2): 149-57.
- Torres JM, Sanchez P, Ortega E. 2004. Quantitation of mRNA levels of steroid 5 alpha-reductase isoenzymes in the rat brain by "one-step" RT-PCR and capillary electrophoresis. *J. Neurosci. Methods.* 136(1): 105-10.
- Torres JM, Ortega E. 2004b. Alcohol intoxication increases allopregnanolone levels in male adolescent humans. *Psychopharmacology (Berl)* 172(3): 352-5.
- Torres JM, Ortega E. 2003b. Precise quantitation of 5alpha-reductase type 1 mRNA by RT-PCR in rat liver and its positive regulation by testosterone and dihydrotestosterone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308(3): 469-73.
- Torres JM, Ortega E. 2003a. Differential regulation of steroid 5alpha-reductase isozymes expression by androgens in the adult rat brain. *FASEB J.* 17(11): 1428-33.

- Torres JM, Ruiz E, Ortega E. 2003. Development of a quantitative RT-PCR method to study 5alpha-reductase mRNA isozymes in rat prostate in different androgen status. *Prostate* 56(1): 74-9.
- Torres JM, Ortega E. 2003c. Alcohol intoxication increases allopregnanolone levels in female adolescent humans. *Neuropsychopharmacology* 28(6): 1207-9.
- Torres JM, Ruiz E, Ortega E. 2001. Effects of CRH and ACTH administration on plasma and brain neurosteroid levels. *Neurochem. Res.* 26(5): 555-8.
- Trapman J, Klaassen P, Kuiper GGJM, et al. 1988. Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Común.* 153: 241-248.
- Valencia A, Collado P, Cales JM, Segovia S, Perez Laso C, Rodriuez Zafra, M, Giullamon A. 1992. Postnatal administration of dihydrotestosterone to the male rat abolishes sexual dimorphism in the accessory olfactory bulb: A volumetric study. *Dev. Brain Res.* 68: 132-135.
- VanGils CH, Onland-Morret NC, Roest M et al. 2003. The V89L polymorphism in the 5alpha-reductase type 2 gene and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12: 1194-9.
- Vicini S. 1991. Pharmacologic significance of the structural heterogeneity of the GABAA receptor-chloride ion channel complex. *Neuropsychopharmacology* 4(1): 9-15.
- Vilchis F, Mendez JP, Canto P, Lieberman E, Chavez B. 2000. Identification of missense mutations in the SRD5A2 gene from patients with steroid 5alpha-reductase 2 deficiency. *Clin. Endocrinol.* 52: 383-7.

- Walsh PC, Madden JD, Harrod MJ, Goldstein JL, MacDonald PC, Wilson JD. 1974. Familial incomplete male pseudohermaphroditism, type 2. Decreased dihydrotestosterone formation in pseudovaginal perineoscrotal hypospadias. *New Engl. J. Med.* 291: 944-949.
- Ward IL. 1972. Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. *Science.* Jan 7;175(17): 82-4.
- Weisz J, Ward IL. 1980. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring, *Endocrinology* 106: 306-316.
- Wilson JD. 1975. Dihydrotestosterone formation in cultured human fibroblasts. Comparison of cells from normal subjects and patients with familial incomplete male pseudohermaphroditism, Type 2. *J. Biol. Chem.* 10: 3498-3504.
- Wilson JD, Griffin JE, Russell DW. 1993. Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Endocr. Rev.* 14: 577-593.
- Yu WA. 1989. Administration of testosterone attenuates neuronal loss following axotomy in the brain-stem nuclei of female rats. *J. Neurosci.* 9: 3908-3914.
- Zhu YS, Katz MD, Imperato-McGinley J. 1998. Natural potent androgens: lessons from human genetic models. Baillieres. *Clin. Endocrinol. Metab.* 12: 83-113.
- Zhu YS, Imperato-McGinley J. 2002. Male pseudohermaphroditism due to 5 α -reductase-2 deficiency. In: Sciarra, J.J. (Ed.), *Gynecology and Obstetrics*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Zwain IH, Yen SS. 1999. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* 140(8): 3843-52.

