

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



TESIS DOCTORAL

EFFECTOS DE LA HIPERPROLACTINEMIA SOBRE
LOS NIVELES DE ARNm DE LAS ISOENZIMAS TIPO
1 Y TIPO 2 DE LA 5 α -REDUCTASA EN RATAS

En Granada a 11 de Abril de 2011

Fdo.: D. Pablo Vílchez Campillos

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Pablo Vilchez Campillos
D.L.: GR 2750-2011
ISBN: 978-84-694-4458-0



D^a Esperanza Ortega Sánchez, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología de la Universidad de Granada,

CERTIFICA:

Que D. Pablo Vílchez Campillos, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología de la Universidad de Granada el trabajo titulado “**Efectos de la hiperprolactinemia sobre los niveles de ARNm de las isoenzimas tipo 1 y tipo 2 de la 5 α -Reductasa en ratas**”, siendo dicho trabajo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, que le hacen acreedor al grado de Doctor.

En Granada, a 11 de Abril de 2011

Fdo.: D^a. M^a. Esperanza Ortega Sánchez



Dº. Jesús M Torres de Pinedo, Profesor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología de la Universidad de Granada,

CERTIFICA:

Que los trabajos que se exponen en la memoria de Tesis Doctoral **“Efectos de la hiperprolactinemia sobre los niveles de ARNm de las isoenzimas tipo 1 y tipo 2 de la 5 α -Reductasa en ratas”**, han sido realizados por Pablo Vílchez Campillos, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología de la Universidad de Granada, correspondiendo fielmente a los resultados obtenidos. La presente memoria ha sido revisada por mí, encontrándola conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor en Bioquímica por el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones legalmente vigentes, a los efectos oportunos.

En Granada, a 11 de abril de 2011

Fdo.: Dr. Dº. Jesus M. Torres de Pinedo



Dra. D^a. Pilar Sánchez Medina, Profesora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología de la Universidad de Granada,

CERTIFICA:

Que los trabajos que se exponen en la memoria de Tesis Doctoral **“Efectos de la hiperprolactinemia sobre los niveles de ARNm de las isoenzimas tipo 1 y tipo 2 de la 5 α -Reductasa en ratas”**, han sido realizados por Pablo Vílchez Campillos, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología de la Universidad de Granada, correspondiendo fielmente a los resultados obtenidos. La presente memoria ha sido revisada por mí, encontrándola conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor en Bioquímica por el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones legalmente vigentes, a los efectos oportunos.

En Granada, a 11 de abril de 2011

Fdo.: D^a. Pilar Sánchez Medina

A mi madre Emilia y mi hermano Daniel

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 la Dra. D^a Pilar Sánchez Medina y al Dr. D^o Jesús M. Torres de Pinedo, directores de esta tesis, por mostrarme sus conocimientos científicos, apoyo, y enseñarme que lo imposible, se puede hacer posible.

A todo el personal del Departamento de Bioquímica Clínica y Biología Molecular III, por su ayuda brindada en este trabajo.

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

A toda mi familia, mi padre hermanos y hermana por su amor, comprensión y ejemplo y por haberme animado a embarcarme en este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, por su ayuda desinteresada y su apoyo demostrado en todo momento.

A la Fundación Hospital Clínico por su colaboración en la edición de esta tesis.

A todas las personas que de alguna u otra forma han intervenido en esta tesis.

Publicaciones propias en que se basa la presente Tesis Doctoral:

- Sánchez P, Torres JM, Vílchez P, del Moral RG, Ortega E. Effects of Sulpiride on prolactin and mRNA levels of Steroid 5alpha-Reductase isozymes in adult rat brain. *Neurochem Res.* 2008.
- Sánchez P, Torres JM, Vílchez P, del Moral RG, Ortega E. Effects of Sulpiride on mRNA levels of Steroid 5alpha-Reductase isozymes in prostate of adult rats. *IUBMB Life* 2008.
- Sánchez P, Torres JM, Vílchez P, del Moral RG, Ortega E. Effects of Metoclopramide on mRNA levels of 5alpha-Reductase isozymes in rat brain. *Neuroreport* 2009.

Proyecto de Investigación BFU2008-05340 “Efectos de las situaciones de estrés sobre neuroesteroides e isoenzimas 5 α -Reductasa”. I.P.: Esperanza O.S.

Índice

INTRODUCCIÓN

1. 5 alfa-reductasa.....	2
2. Genética.....	5
3. Propiedades bioquímicas.....	6
4. Localización tisular extracerebral.....	8
5. Localización subcelular.....	8
6. Efectos de la 5 alfa-Reductasa tipo 2.....	9
7. Efectos de la 5 alfa-Reductasa tipo 1.....	14
8. Patología asociadas con la 5 alfa-Reductasa.....	16
8.1 Enfermedades prostáticas.....	16
9. 5 alfa-Reductasa en el cerebro.....	17
9.1 Distribución en el cerebro.....	17
9.2 Las isoenzimas durante la ontogénesis y diferenciación sexual del cerebro.....	20
10. Regulación en la expresión de la 5 alfa-Reductasa.....	24
11. Neuroesteroides y 5 alfa-Reductasa.....	26
12. Estrés/Neuroesteroides/5 α -Reductasa.....	28
13. Neuroesteroides/5 α -reductasa/Comportamiento Maternal.....	30
14. Comportamiento Maternal/Prolactina.....	32
15. PRL/Estrés/Ansiedad.....	35
OBJETIVOS.....	40

MATERIAL Y METODOS

1. Material fungible e inventariable.....	44
2. Material Farmacológico.....	46

3. Animales de Experimentación.....	47
4. Tratamientos recibidos.....	47
4.1 Tratamiento con Sulpiride.....	47
4.2 Tratamiento con Metoclopramida.....	48
5. Recogida de muestras.....	49
5.1 Recogida de sangre.....	49
5.2 Recogida de cerebro.....	49
5.3 Recogida de Próstata	50
6. Análisis hormonal.....	50
6.1 Concentración plasmática de Prolactina.....	50
6.2 Concentración plasmática de Testosterona.....	50
7. Extracción de ARN.....	51
8. Cuantificación del ARN.....	52
9. Diseño de oligonucleótidos para PCR.....	53
10. Construcción del estándar interno.....	55
11. Eficiencia de amplificación de dos moléculas competidoras.....	57
12. Reverso transcripción y reacción en cadena de la polimerasa.....	62
13. Análisis de los productos de PCR.....	63
13.1 Electroforesis en gel de agarosa.....	63
13.2 Electroforesis capilar.....	64
14. Análisis Estadístico.....	65

RESULTADOS

1. Niveles plasmáticos de PRL en ratas macho control y tratadas con Sulpiride.....	68
2. Niveles plasmáticos de PRL en ratas hembra control y tratadas con Sulpiride.....	69

3. Estudio comparativo del incremento sobre los niveles basales de PRL en ratas macho y hembra tratadas con Sulpiride.....	70
4. Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 en corteza prefrontal de ratas macho control y tratadas con Sulpiride	71
5. Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 en corteza prefrontal de ratas hembra control y tratadas con Sulpiride	72
6. Estudio comparativo del incremento sobre los niveles basales de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 en ratas macho y hembra tratadas con Sulpiride.....	73
7. Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 en corteza prefrontal de ratas macho control y tratadas con Sulpiride.....	74
8. Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 en corteza prefrontal de ratas hembra control y tratadas con Sulpiride.....	75
9. Estudio comparativo del incremento sobre los niveles basales de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 en ratas macho y hembra tratadas con Sulpiride.....	76
10. Niveles plasmáticos de Testosterona en ratas macho control y tratadas con Sulpiride.....	77
11. Efectos de la hiperprolactinemia sobre el peso de la próstata en ratas macho control y tratadas con sulpiride.....	78
12. Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 en próstata de ratas macho control y tratadas con Sulpiride.....	79
13. Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 en próstata de ratas macho control y tratadas con Sulpiride.....	80
14. Niveles plasmáticos de PRL en ratas macho control y tratadas con Metoclopramida.....	81
15. Niveles plasmáticos de PRL en ratas hembra control y tratadas con Metoclopramida.....	82

16. Estudio comparativo del incremento sobre los niveles basales de PRL en ratas macho y hembra tratadas con Metoclopramida.....	83
17. Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 en corteza prefrontal de ratas macho control y tratadas con Metoclopramida.....	84
18. Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 en corteza prefrontal de ratas hembra control y tratadas con Metoclopramida	85
19. Estudio comparativo del incremento sobre los niveles basales de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 en ratas macho y hembra tratadas con Metoclopramida.....	86
20. Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 en corteza prefrontal de ratas macho control y tratadas con Metoclopramida.....	87
21. Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 en corteza prefrontal de ratas hembra control y tratadas con Metoclopramida.....	88
22. Estudio comparativo del incremento sobre los niveles basales de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 en ratas macho y hembra tratadas con Metoclopramida.....	89
23. Estudio comparativo de los niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 en ratas macho tratadas con sulpiride y tratadas con metoclopramida.....	90
24. Estudio comparativo de los niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 en ratas macho tratadas con sulpiride y tratadas con metoclopramida.....	91
25. Estudio comparativo de los niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 en ratas hembra tratadas con sulpiride y tratadas con metoclopramida.....	92
26. Estudio comparativo de los niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 en ratas hembra tratadas con sulpiride y tratadas con metoclopramida.....	93

DISCUSIÓN.....	96
CONCLUSIONES.....	110
BIBLIOGRAFÍA.....	114

Abreviaturas comúnmente utilizadas

3 α -HSD: 3 alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa

5 α -R: 5 alfa-Reductasa

5 α -R1: 5 alfa-Reductasa tipo 1

5 α -R2: 5 alfa-Reductasa tipo2

5 α -R3: 5 alfa-Reductasa tipo 3

ADN: Acido desoxiribonucleico

ARN: Acido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

AN: Acidos Nucleicos

BOA: Bulbo Olfatorio Accesorio

BZD: Benzodiazepina

cDNA: ácido desoxiribonucleico cíclico

CM: Comportamiento Maternal

CP: Carcinoma de Próstata

CS: Cordón Espinal

DHDOC: Dihidrodeoxicorticosterona

DHEA: Dehidroepiandosterona

DHP: Dihidroprogesterona

DHT: Dihidrotestosterona

DOC: Desoxicorticosterona

E2: Estradiol

GABA: ácido gamma aminobutírico

GABA_A-R: Receptor GABA tipo A

HBP: Hipertrofi Benigna de Próstata

HPA: Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal

IS: Estandar Interno

NMDA: N-metil-D-aspartato

PHDA: Dopaminérgicas Hipofisario Periventricular

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

PCF: Corteza Prefrontal

PREG: Pregnenolona

PRL: Prolactina

PRL-R: Receptores de Prolactina

PTX: Picrotoxina

RIA: Radioinmunoanálisis

RT-PCR: Retrotranscripción Reacción en Cadena de la Polimerasa

SDN-POA: Nucleo Sexo dimorfico del Area Preóptica

SNB: Nucleo Sexodimórfico del Bulbocavernoso

SNC: Sistema Nervioso Central

T: Testosterona

TH: Hidroxilasa Tirosina

THDA: Tuberohipofisal

THDOC: Tetrahydrodeoxicorticosterona

THP: Tetrahydroprogesterona

TIDA: Tuberoinfundibular

Introducción

1. 5 α -Reductasa

Desde su descubrimiento la enzima 5 α -reductasa (5 α -R) (EC 1.3.99.5) 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, 2003b, 2006).

La virilización en los mamíferos está mediada por dos hormonas esteroideas, la testosterona (T) y la 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, y gracias en parte a estudios realizados por nuestro grupo, DHT puede considerarse como una auténtica hormona con un papel importante en la fisiología del mamífero (Torres y Ortega, 2003b, 2006).

Desde que se descubrió, en los años 50, la actividad 5 α -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 5 α -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 5 α -reducción de esteroides se llevaba a cabo por un sólo enzima o por un complejo multienzimático.

La 5α -reducción de sustratos esteroideos hace que sus grupos 3-oxo sean susceptibles a la reducción por 3α y 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, y a la sulfatación y glucuronización. Estas últimas modificaciones tienen la función de reducir la afinidad de los esteroideos 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 esteroideos. Sin embargo, trabajos llevados a cabo en los años 60, pusieron de manifiesto que la 5α -R no cataliza la reacción inversa (deshidrogenación de esteroideos 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 clonando 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 tres isoenzimas de la 5 α -Reductasa: La 5 α -Reductasa tipo 1 (5 α -R1), la 5 α -Reductasa tipo 2 (5 α -R2), y más recientemente la 5 α -Reductasa tipo 3. 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 Wislson, 1994). Con respecto a la isoenzima tipo tres no está claro aún su papel.

2. Genética.

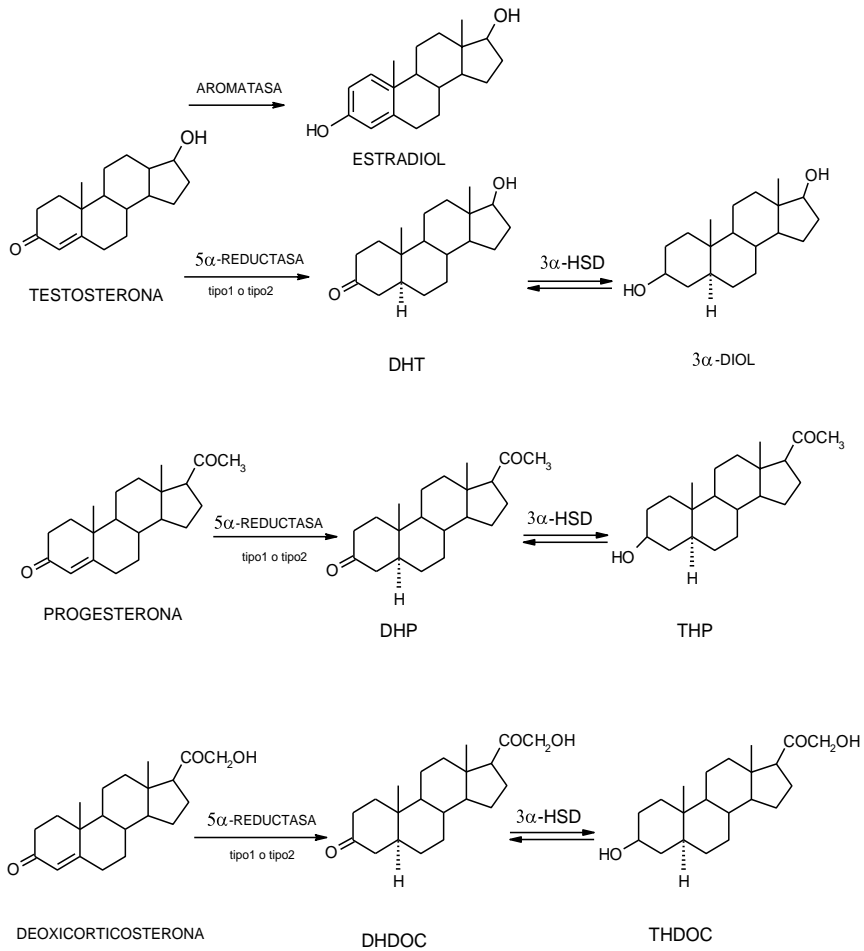
Las dos isoenzimas de la 5 α -R han sido clonadas en humano, rata, ratón y mono (Andersson y col., 1989; Andersson y col., 1991; Labrie y col., 1992; Normington y Russell 1992; Russell y Wilson 1994; Levy y col., 1995; Mahendroo y col., 1996). En humano, el gen que codifica la 5 α -R1 es SRD5A1 está 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 5α -reducción de todos los $\Delta 4-5$ keto esteroides, pero con diferente cinética 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 tipo 1 para todos los sustratos está en un rango de micromolar ($K_{map}=1-5 \mu M$) menor, por tanto, que la de la isoforma tipo 2 que está en un rango de nanomolar ($K_{map}=4-50 \text{ nM}$) (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 tienen un pH óptimo diferente, la 5α -R1 es activa en un rango de pH óptimo amplio entre 5 y 8, mientras que la 5α -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 catalizan 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).



Camino enzimático de la 5alfa-reductasa y aromatsa.

3 α -diol=5andostran-3 α ,17b-diol.

DHT=dihidrotestosterona.

3 α -HSD=3alfa-hidroxiesteroidedeshidrogenesa.

DHP=dihidroprogesterona.

THP=tetrahidroprogesterona.

DHDOC=dihidrodeoxicorticosterona.

THDOC=tetrahidrodeoxicorticosterona.

4. Localización tisular extracerebral.

En humano, el gen de la reductasa tipo 1 se expresa a muy bajos niveles en tejidos andrógénicos (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 5 α -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 5 α -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 más 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 Southern 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, 2003d). 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 5α -R2 es una enfermedad que se hereda de forma autosómica recesiva como se ha evidenciado por; análisis bioquímicos (Imperato-McGinley y col., 1974, 1985, 1987), 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 5α -R2 tienen un fenotipo masculino normal. Hembras homocigotas con una mutación en el gen 5α -R2 tienen poco vello corporal y una elevada fertilidad (Katz y col., 1995; Milewich y col., 1995). La 5α -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 5α -Reductasa tipo 1.

Los ratones macho que carecen de 5α -R1, no se ve modificada 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 5α -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 α -reductasa.

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

8.1 Enfermedades prostáticas.

La hipertrofia benigna de próstata (HPB) 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 en el varón, 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., 2003c). 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 han visto 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).

9. 5α -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, 2003b; 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 contienen 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 CS de rata (Pozzi y col., 2003; Patte-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 CS 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 5 α -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 5 α -R presentes en la mielina han sido estudiadas en una serie de análisis cinéticos, llevados a cabo a pH neutro, que han confirmando que la actividad enzimática medida es en gran parte debido a la isoenzima tipo 1 (Poletti y col., 1997). La actividad enzimática 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 5 α -R1.

La distribución celular de la actividad 5 α -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 iniciando la producción de andrógenos. En machos los niveles de testosterona circulante incrementa progresivamente y muestra un patrón característico con dos picos. En rata, los picos de testosterona ocurren en los días de gestación 17-19 (Weisz y Ward, 1980) e inmediatamente después 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 de que al suministrar 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 5α -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 Sengelau, 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 actuar vía receptor de andrógenos activado por DHT.

Actualmente, se desconoce 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 ARNm 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 ligero incremento justo antes del nacimiento y en la primera semana de vida (Poletti y col., 1998). En ambos sexos los niveles de ARNm de la 5α -R1 son mayores en el nacimiento que prenatalmente (Colciago y col., 2005), y según algunos autores no hay diferencias significativas en la expresión de dicho isoenzima entre macho y hembra en el momento del nacimiento (Karolczak y col., 1998), aunque este dato es hoy muy controvertido.

Por el contrario, la expresión de la 5α -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). El patrón de expresión parece estar correlacionado con los niveles de secreción de testosterona del testículo fetal, indicando que la 5α -R2 debe de ser modulado por andrógenos. La expresión transitoria de la 5α -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 que flutamide, un antagonista de los receptores androgénicos, es capaz de abolir el pico de expresión de la 5α -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 5α -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 5α -R2 está altamente inducida por testosterona, mientras que la expresión de la 5α -R1 permanece invariable durante el tratamiento (Poletti y col., 1998). La inducción de la 5α -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 5 α -R1 debe presentar una función catabólica importante, protegiendo a las neuronas del exceso de hormonas esteroideas (Behl y col., 1997).

La implicación de la 5 α -R2 en macho sobre el mecanismo de diferenciación sexual del cerebro es desconocida, los ratones con deficiencia en esta isoenzima (Mahendroo y col., 2001) presentan una adecuada identidad y comportamiento sexual. Esto sugiere que la 5 α -reducción de andrógenos no es tan importante como su aromatización en el mecanismo de diferenciación sexual del cerebro. El papel de la 5 α -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 α -Reductasa.

La regulación en la expresión de la 5 α -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 las dos isoenzimas 5α -R en próstata están regulados de forma positiva por andrógenos, ya que los niveles de ARNm de ambos 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., 2003c). En animales castrados, la DHT ejerce un efecto positivo en la expresión génica de ambos isoenzimas en próstata, aunque este efecto fue menor que el conseguido con el tratamiento con T. El hecho de que DHT incremente los niveles de ARNm 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., 2003c).

Si nos fijamos en el hígado, un órgano multifuncional, encargado entre otras funciones del metabolismo de las hormonas esteroideas, veremos que dispone de todas las enzimas necesarias para dicho metabolismo incluida la enzima 5α -R. La 5α -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 5α -reducidos más hidrosolubles, y por tanto, más fáciles de eliminar. Al igual que en próstata la expresión de 5α -R1 (isoenzima predominante del hígado) están regulados de forma positiva por andrógenos (T y DHT) (Torres y Ortega, 2003d), confirmando la regulación feed-forward ejercida por DHT sobre su propia biosíntesis. La expresión de 5α -R1 hepática es mayor en hígado de rata hembra que en macho, y su regulación por T es diferente en ambos sexos (Torres y Ortega, 2003d; Torres y Ortega, 2004b). Por lo que se piensa que la función de 5α -R hepática en la hembra no sólo sea la catabólica, sino que podría intervenir en otras funciones fisiológicas (Torres y Ortega, 2004b).

11. Neuroesteroides y 5α -R.

El término Neuroesteroide fue introducido en 1991 por Baulieu para designar los esteroides que se sintetizan “de novo” en el SNC, bien directamente desde el colesterol o bien desde otras hormonas esteroides que actúan de precursoras. Dentro del término neuroesteroide se incluyen esteroides cuya acumulación en el SNC y sistema nervioso periférico ocurre independientemente de las fuentes esteroideogénicas exógenas (Baulieu, 1991). Los neuroesteroides influyen sobre diversas funciones del SNC actuando como reguladores paracrinos y autocrinos. Estos esteroides neuroactivos pueden alterar la excitabilidad de la membrana, el comportamiento, el crecimiento, la diferenciación de las células de la glía, etc. Además, se ha visto que tanto los neuroesteroides pregnenolona (PREG) y dehidroepiandrosterona (DHEA) y sus ésteres sulfatos así como los llamados neuroesteroides $3\alpha,5\alpha$ -reducidos, entendiendo por tales los metabolitos $3\alpha,5\alpha$ -reducidos

de la progesterona (allopregnanolona) y la corticosterona/cortisol, actúan como moduladores alostéricos de receptores para neurotransmisores, incluyendo el N-metil-D-aspartato (NMDA), los receptores sigma y sobre todo el receptor tipo A del ácido γ -aminobutírico (GABAA) (Baulieu, 1997). Actualmente se conoce que PRES y DHEAS actúan como moduladores negativos mientras que los derivados 3α , 5α -reducidos de la progesterona y corticosterona, actúan como moduladores positivos del receptor GABAA y por tanto, dichos neuroesteroides reducidos se comportan de manera similar al barbitúrico Diazepam. Las variaciones en las concentraciones de neuroesteroides en condiciones fisiológicas, patológicas o farmacológicas pueden modificar diferentes tipos de comportamiento conociéndose su influencia en fenómenos de ansiedad, agresividad, síndrome premenstrual, mielinización, neuroprotección, crecimiento de axones y dendritas, etc. (Purdy, 1991; Barbaccia y col., 1996; Torres y Ortega, 2003a).

Los neuroesteroides 3α , 5α -reducidos son sintetizados a partir de progesterona y desoxicorticosterona (DOC) por las enzimas esteroideogénica 5α -reductasa y 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3α HSD), siendo la primera la enzima limitante de la reacción. Como hemos indicado las isoenzimas 5α -R1 y 5α -R2 están presentes en diversas regiones cerebrales, incluyendo la corteza cerebral (Agís-Balboa y col., 2006; Sánchez y col., 2005, 2006; Torres y Ortega, 2003b, 2006) y en dichos núcleos cerebrales pueden jugar un papel decisivo, en especial la 5α -R tipo 1 en la biosíntesis de neuroesteroides 3α , 5α -reducidos.

12. Estrés/Neuroesteroides/5 α -Reductasa.

Hace más de 60 años que Seyle describiera que todos los animales responden ante una situación estresante con una respuesta que él describió como “Síndrome general de adaptación” llamando así a una serie de respuestas estereotipadas que aparecen sobre todo en los mamíferos. La respuesta es producida por un estímulo que altera la homeostasis del individuo. El proceso, es adaptativo y generalmente mediado e integrado por el sistema nerviosos central (SNC).

En 1991 Purdy y colaboradores describieron por primera vez una asociación entre el estrés agudo y los niveles de neuroesteroides 3 α , 5 α -reducidos, demostrando que el estrés físico como es el caso de la natación forzada, induce un aumento en la concentración de allopregnanolona, neuroesteroide 3 α , 5 α -reducido, tanto en plasma como en cerebro de rata. A partir de entonces, numerosos autores derterminaron que en diferentes situaciones de estrés se va modificando la concentración de neuroesteroides en plasma y cerebro de roedores (Biggio y col., 1996, 2000), diferenciando entre los efectos del estrés agudo y crónico (Barbaccia y col., 2001). Del mismo modo, los estudios en humanos han demostrado que las situaciones de estrés agudo (por ejemplo, intoxicación alcohólica aguda) aumentan los niveles plasmáticos de allopregnanolona neuroesteroide 3 α , 5 α -reducido, en varones y mujeres adolescentes (Torres y Ortega, 2003a, 2004a).

La transmisión GABAérgica juega un papel clave en el control del estado emocional y en la regulación de la reactividad a los cambios rápidos en las condiciones ambientales que pueden conducir a la

ansiedad (Barbaccia y col., 2001). Así, situaciones de estrés modifican la función GABA-R en la corteza cerebral de rata (Biggio y col., 1981; Biggio, 1983; Biggio y col., 1987; Concas y col., 1985, 1987). Las benzodiazepinas y sus congéneres, que actúan como moduladores alostéricos positivos del complejo GABAA-R, alivia la ansiedad en los seres humanos, y pueden participar en la respuesta endógena al estrés (Haefely, 1994). Los neuroesteroides $3\alpha,5\alpha$ -reducidos y las benzodiazepinas modulan alostéricamente la función GABA-R a través de diferentes sitios de unión (AKK y col., 2007; Majewska, 1992; Mellon y col., 2001; Paul y Purdy, 1992) y puede, por lo tanto, desempeñar un papel en esta respuesta.

Por ello, la determinación de neuroesteroides bajo condiciones de estrés puede mejorar nuestra comprensión del papel de los neuroesteroides en las situaciones de estrés y contribuir al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para los trastornos psicóticos o mentales (Higashi y col., 2005).

Como hemos indicado anteriormente la síntesis de neuroesteroides $3\alpha,5\alpha$ -reducidos está controlado por el enzima 5α -R, enzima clave en su biosíntesis. Por ello es muy importante conocer el comportamiento de las isoenzimas 5α -R1 y 5α -R2 en situaciones de estrés. Esto nos permitiría un nuevo abordaje terapéutico en el estudio de las patologías asociadas al estrés. La corteza prefrontal puede ser un buen objeto de estudio, ya que desempeña un papel importante en los procesos cognitivos superiores, y en la regulación de la actividad hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) inducida por estrés (Diorio y col., 1993; Radley y col., 2006a, 2006b; Sullivan y Gratton, 1999).

En este sentido nuestros trabajos previos han demostrado que una situación de estrés físico produce un incremento en los niveles de ARNm de los isoenzimas tipo 1 y tipo 2 de la 5 α -R en cerebro de rata. Más recientemente hemos podido demostrar por primera vez a nuestro conocimiento, que condiciones de estrés medioambiental producen un aumento de los niveles de ARNm de los isoenzimas de la 5 α -R. En el mundo industrializado estamos siendo sometidos a continuas condiciones de estrés ambiental. Los factores ambientales, son importantes en la salud humana y se debe considerar en el desarrollo de políticas de salud adecuadas, ya que se han asociado con trastornos psicológicos e incluso la muerte (Rainham y Smoyer Tomic, 2003; Tanaka, 2007; Woo y Postolache, 2008). Los resultados de nuestros trabajos pueden aportar nuevos datos a estos procesos.

13. Neuroesteroides/5 α -reductasa/Comportamiento Maternal.

Los neuroesteroides también están implicados en el desarrollo del sistema nervioso (Lipton y Kater, 1989; Mattson, 1988) y en la diferenciación sexual del cerebro y de la conducta maternal (CM) (Segovia y col., 1996; Pérez-Laso y col., 1994; Bach y col., 1992; Segovia y col., 1991; Dolher, 1991; Mattson, 1988; Dorner, 1979; Kincl, 1965). Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado que el neurotransmisor GABA, vía del receptor GABA_A participa en el desarrollo de las diferencias de género en cerebro de rata (Segovia y col., 1996). Así la administración durante el periodo postnatal de diferenciación sexual del SNC (PO-P16) de diazepam (DZ) (agonista del receptor GABA_A) a ratas macho y picrotoxina (PTX) (antagonista del receptor GABA_A) a ratas hembra,

lograron cuando los animales alcanzaron su estado adulto, una inversión en la diferenciación sexual del Bulbo Olfatorio Accesorio (BOA) y en la conducta maternal inducida de la rata, es decir la rata macho presentaba comportamiento maternal y la rata hembra carecía de él. Este hecho se consiguió sin que los niveles plasmáticos de los esteroides gonadales testosterona (T), Estradiol (E2) y Progesterona sufrieran alteraciones significativas ni en el macho y ni en la hembra. Es decir, los sexos neural y conductual resultaron invertidos por los tratamientos, pero ese efecto no era debido a una alteración de la función gonadal.

La conducta maternal (CM) es una conducta “motivada” que requiere de una integración apropiada entre los estímulos externos y el estado interno del organismo (Rosenblatt 1985). La función que desempeña esta compleja conducta en la reproducción es asegurar la supervivencia de individuos recién nacidos o de corta edad, mediante los cuidados que, generalmente, individuos adultos de la misma especie, desarrollan hacia éstos (Numan, 1994).

En este sentido, se considera que tanto la conducta maternal como la conducta sexual, forman parte del amplio contexto de las denominadas conductas reproductoras. En el mamífero la CM es exclusiva de la hembra. Las diferencias conductuales entre los dos sexos es la base conceptual de considerar las conductas reproductoras como compartimentos sexualmente diferenciados o dimórficos y estas diferencias de comportamiento están controladas perinatalmente por los esteroides gonadales quienes a su vez diferencian el SNC (McEwen, 1991).

14. Conducta maternal/Prolactina.

La CM es un proceso complejo que implica diferentes funciones neuroendocrinas y por tanto diversos neurotransmisores y hormonas, entre ellas la Prolactina (PRL). Está bien establecido que la PRL participa en la promoción y continuación de la CM (Bridges y col., 1985, Bridges y Ronsheim, 1990). Hoy sabemos que la PRL ejerce multitud de funciones diversas como la activación de las neuronas productoras de dopamina del hipotálamo para controlar su propia secreción, la supresión de la fertilidad, la estimulación de la mielinización del sistema nervioso central, la generación de nuevas neuronas en el bulbo olfatorio y la participación en la regulación de la CM (Purdy y col., 1991; Majewska, 1992.).

Los animales que carecen de receptores de prolactina funcionales exhiben profundos déficits en la atención maternal (Lucas y col., 1998), demostrando un papel funcional de la prolactina en la mediación de este proceso. La administración en ratas nulíparas de prolactina reduce significativamente el tiempo de aparición de la conducta maternal (Bridges y col., 1985; Bridges y col., 1990), mientras que el bloqueo en la secreción de prolactina con bromocriptina (Bridges y col., 1990) retrasa significativamente la aparición de la conducta maternal. Estas acciones estimulantes de la prolactina en el comportamiento de la madre pueden ser imitadas por el lactógeno placentario (Bridges y col., 1993). Curiosamente, los animales con un gen alterado de prolactina muestran un comportamiento maternal (Horseman y col., 1997), probablemente mediado por la activación de los receptores de la prolactina por lactógeno placentario. En consonancia con lo que se conoce acerca de

los circuitos neuronales que regulan el comportamiento materno, parece que la acción de la prolactina o lactógeno placentario para estimular la conducta maternal se ejerce en el núcleo medial preóptico (Bridges y col., 1997).

La evidencia actual sugiere que la secreción de prolactina está regulada por las tres poblaciones de los sistemas dopaminérgicos del hipotálamo (DeMaria y col., 1999): la tuberoinfundibular (DATI), tuberohipofisal (THDA), y neuronas dopaminérgicas hipofisario periventricular (PHDA). La dopamina de las neuronas PHDA y THDA contribuye a la regulación basal de la secreción de prolactina, después de su transporte a la glándula pituitaria anterior a través de vasos cortos portales desde la neurohipófisis (Freeman y col., 2000). La prolactina también se puede producir en el cerebro, y por lo tanto, funciona como un neuropéptido, así como una hormona neuroendocrina.

La PRL es producida principalmente por la glándula pituitaria anterior y al contrario que el resto de hormonas hipofisarias, es predominantemente inhibida por el hipotálamo, y si la inhibición del hipotálamo se ve interrumpida, será espontáneamente secretada en altos niveles (Freeman y col., 2000). El órgano diana de la prolactina no es un órgano endocrino, y por lo tanto el clásico bucle de retroalimentación mediado por hormona que controla a otras hormonas pituitarias está ausente. En su lugar hay un sistema conocido como cortocircuito de retroalimentación, por lo que la prolactina se retroalimenta en el hipotálamo para regular su propia secreción (Grattan, 2002). La prolactina estimula la síntesis hipotalámica de dopamina (Hokfelt y Fuxe, 1972), y promueve la secreción de dopamina en la sangre portal hipofisaria (Gudelsky y Porter, 1979).

Estas observaciones identificaron la rama aferente de un mecanismo de retroalimentación en corto-circuito que regula la secreción de prolactina. La dopamina inhibe la secreción de prolactina aislada de la hipófisis (Koch y col., 1970; MacLeod y col., 1970). Agonistas dopaminérgicos también son eficaces en la supresión de la secreción de prolactina in vivo (MacLeod y col., 1970). La presencia de dopamina en la sangre portal hipofisaria (Kamberi y col., 1970) demuestra que los diferentes niveles de dopamina en la sangre portal podrían explicar gran parte de las variaciones de la secreción de prolactina en la glándula pituitaria anterior (Ben-Jonathan y col., 1980; Ben-Jonathan y col., 1977; Gibbs y Neill, 1978; De Greef y Neill, 1979).

Múltiples estudios, han confirmado la relación recíproca entre la prolactina y la secreción de la dopamina hipotalámica. La prolactina actúa directamente sobre las neuronas de dopamina neuroendocrinas, que expresan receptores de la prolactina (Lerant y Freeman, 1998; Kokay y Grattan, 2005). La activación de estas neuronas por la prolactina requiere la activación de la vía de transducción de señal JAK2/STAT5b (Grattan y col., 2001; Ma y col., 2005) y también implica una serie de otras vías de señalización (Ma y col., 2005). La prolactina estimula la expresión del gen de la tirosina hidroxilasa (TH), la enzima limitante en la síntesis de dopamina en las neuronas de dopamina neuroendocrinas (Arbogast y Voogt, 1991), y también modula la fosforilación de la TH resultando un aumento de la síntesis de dopamina (Ma y col., 2005). La síntesis y liberación de dopamina aumentan en respuesta a incrementos agudos o crónicos en los niveles de prolactina en la sangre (Moore, 1987; Demarest y col., 1984; Demarest y col., 1986), mientras que la hiperprolactinemia resulta de

la supresión de la secreción de dopamina (Arbogast y Voogt, 1991), cumpliendo así los criterios para ser un sistema de regulación homeostático.

15. PRL/Estrés/Ansiedad.

Independientemente de su función en el comportamiento maternal, la prolactina es también una hormona de adaptación producida en situaciones de estrés.

La ansiedad es un rasgo complejo que ha evolucionado para ayudar a los animales a evaluar y evitar situaciones potencialmente peligrosas. En las bases neurobiológicas de la ansiedad relacionada con el comportamiento intervienen diferentes sistemas neuropeptidérgicos, incluyendo hormona liberadora de corticotropina (CRH) (Mitchell, 1999), el neuropéptido Y (Wahlestedt y col., 1993), la sustancia P (Kramer y col., 1998), y la vasopresina (Liebsch y col., 1996). En condiciones patológicas de hiperansiedad (Holsboer y Barden, 1996) o en ratas que muestran una elevación innata de la ansiedad relacionada con el comportamiento (Landgraf y col., 1999), se ha descrito una hiperactividad aberrante del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA), lo que indica una estrecha interacción entre la emotividad y el sistema neuroendocrino.

La PRL, además de su papel durante la lactancia, puede influir tanto en las respuestas emocionales como en la actividad del eje HPA. Utilizando diferentes técnicas, se ha demostrado que PRL participa en la regulación de la conducta maternal (Bridges y col., 1990; Lucas y col., 1998.), Aseo (Drago y col., 1983), y la ingesta de alimentos en los

mamíferos (Noel y Woodside, 1993) y las especies no mamíferos (Li y col., 1995).

Una posible implicación de la PRL en los mecanismos de respuesta al estrés es sugerido por el resultados que (1) PRL es liberada en sangre desde las células lactotropas de la hipófisis en respuesta a la exposición a diferentes factores estresantes (Neill, 1970; Seggie y Brown, 1975), (2) el estrés crónico induce la expresión de la forma larga de los receptores de PRL (PRL-R) en las células del plexo coroideo (Fujikawa y col., 1995), y (3) la administración de PRL en los ventrículos cerebrales previene la formación de úlceras gástricas inducida por estrés y mostró efectos antidepresivos durante la natación forzada (Drago et al., 1985, 1990). Por otra parte, se encontraron respuestas neuroendocrinas al estrés atenuadas en los estados de hiperprolactinemia (Schlein y col., 1974; Carter y Lightman, 1987).

Objetivos

Nuestro objetivo es estudiar si la Prolactina modifica la transcripción de los genes que codifican las dos isoenzimas tipo 1 y 2 de la enzima 5α -R.

Para ello:

1. Cuantificamos los niveles de ARNm de las isoenzimas tipo 1 y 2 de la 5α -R en corteza prefrontal de cerebro de ratas macho y hembra control y tras la hiperprolactinemia inducida por sulpiride.
2. Cuantificamos los niveles de ARNm de las isoenzimas tipo 1 y 2 de la 5α -R en próstata de ratas macho control y tratadas con sulpiride.
3. Cuantificamos los niveles de ARNm de las isoenzimas tipo 1 y 2 de la 5α -R en corteza prefrontal de ratas macho y hembra control y tras la hiperprolactinemia inducida por metoclopramida.

Material y Métodos

1. Material fungible e inventariable

Agitador de tubos IKA minishaker 2.

Analizador genético ABIPRISM310 Genetic Analyzer y software asociado.

Autoclave P-Selecta.

Balanza de precisión AND ER-60^a.

Cámara Polaroid Bio-Rad.

Centrífuga Beckman TJ-6.

Congelador -20°C.

Congelador -80°C.

Contador gamma Berthold GC-360.

Espectrofotómetro Shimadzu UV-VIS 1600.

Frigorífico 4°C.

Fuente de alimentación Bio-Rad 3000.

Guillotina.

Homogenizador Polytron.

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

Lector de placas de ELISA, Bio-Rad.

Máquina de hielo Difri.

Microcentrífuga de mesa Eppendorf 5410.

Microondas Samsung M1713.

Pipeta automática 0.1-2.5 μ l Eppendorf.

Pipeta automática 0.5-10 μ l Boeco.

Pipeta automática 200-1000 μ l Boeco.

Pipeta automática 50-200 μ l Boeco.

Pipeta automática 5-50 μ l Boeco.

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

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

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

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

Sistema Elecsys 2010.

Tanques de nitrógeno líquido.

Termobloque P-Selecta®.

Termociclador PE-Applied Biosystem 2400.

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

Transiluminador UV Bio-Rad Mini-transiluminator.

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

Tubos Eppendorf de 0.5 ml. Daslab.

Tubos Eppendorf de 1.5 ml. Aslab.

Tubos Eppendorf de 2 ml. Daslab.

2. Material Farmacológico

Sulpiride (Dogmatil®)

Metoclopramida (Primperam®)

Suero salino (CINa 0,9%)

3. Animales de experimentación.

Ratas macho adultas de 260-280 g. de peso y ratas hembras adultas de 180-200 g. de peso en ambos casos de cepa Wistar. Fueron suministradas por el Servicio de Animales de Experimentación de la Comisión de Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. Las ratas eran alimentadas con dieta estándar de mantenimiento A04 (Panlab) y agua *ad lib*. Las ratas eran mantenidas en un animalario con aire acondicionado e iluminación desde las 7:00 horas hasta las 19:00 horas.

Los experimentos se realizaron acorde a la guía NIH para el “Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” y al comité ético en experimentación animal (CEEA).

Animales de experimentación:

- Ratas macho control tratadas con suero salino
- Ratas hembra control tratadas con suero salino
- Ratas macho tratadas con Sulpiride
- Ratas hembra tratadas con Sulpiride
- Ratas macho tratadas con Metoclopramida
- Ratas hembra tratadas con Metoclopramida

4. Tratamientos recibidos:

4.1 Tratamiento con Sulpiride:

La hiperprolactinemia fue inducida mediante inyecciones intraperitoneales diarias de 40 mg/Kg de una solución acuosa de

sulpiride a las 9 de la mañana durante 30 días en concordancia con Van Coppenolle y colaboradores (2001). Al grupo de ratas control se le administró suero salino de la misma forma. El ultimo día a los 30 minutos de la sesión de las 9h, las ratas fueron decapitadas (evitando así posibles efectos adversos de la anestesia).

El Sulpiride es una benzamida utilizada como fármaco antipsicótico que actúa bloqueando una serie de receptores cerebrales, en particular los receptores dopaminérgicos D2 pero también D3 y D4. La dopamina está implicada en la transmisión de señales en el cerebro, cuando existe un exceso de dopamina, se produce una hiperestimulación de sus receptores lo que se traduce en enfermedad psicótica. El sulpiride bloquea los receptores dopaminérgicos, especialmente los receptores D2. Además, presenta una ligera actividad antiemética, sedante y bloqueante alfa-adrenérgica mientras que su actividad anticolinérgica es casi nula.

4.2 Tratamiento con Metoclopramida:

En el caso de la metoclopramida se inyectaron peritonealmente 2.2 mg/kg a las 9 de la mañana dos veces por semana durante 14 días para producir hiperprolactinemia acorde con Sluczanowska-Glabowska y colaboradores (2006). Al grupo de ratas control se le administró suero salino de la misma forma. El ultimo día a los 30 minutos de la sesión de las 9h, las ratas fueron decapitadas (evitando así posibles efectos adversos de la anestesia).

La Metoclopramida es una benzamida sustituida utilizada como fármaco gastrocinético con propiedades antieméticas. La

metoclopramida posee actividad antidopaminérgica bloqueando receptores de dopamina, especialmente los de tipo D2 en el área de excitación de los quimiorreceptores, sin presentar actividad antipsicótica o tranquilizante. Es menos sedante que otros antagonistas de la dopamina. Los efectos antieméticos resultan del antagonismo dopaminérgico central y de sus efectos gastrocinéticos. Además, posee efectos antagonistas sobre los receptores 5-HT₃, también implicados en los mecanismos de la náusea y los vómitos. El bloqueo de la dopamina en el sistema nervioso central produce efectos extrapiramidales, y a nivel de la pituitaria y el hipotálamo estimula la secreción de prolactina.

5. Recogida de muestras

5.1 Recogida de sangre:

Las muestras sanguíneas se recogieron en tubos heparinizados. Después de la coagulación, se centrifugó la sangre a 2000 rpm durante 10 minutos. El plasma se separó y guardó a -20 °C hasta el momento de su análisis hormonal.

5.2 Recogida de cerebro:

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 cingular anterior, prelímbica e infralímbica.

5.3 Recogida de Próstata:

La próstata fue extraída, pesada, congelada en nitrógeno líquido, y guardada a -80°C hasta la realización del análisis de toda la próstata.

6. Análisis Hormonal.

6.1 Concentración plasmática de Prolactina

Las concentraciones plasmáticas de prolactina (PRL) se midieron mediante ELISA utilizando un kit comercial de prolactina de rata Milenia (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles CA). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y realizadas con el mismo tipo de análisis. El coeficiente de variación intra-ensayo fue de 4.3%, y la sensibilidad fue de 0.6 ng/ml.

6.2 Concentración Plasmática de Testosterona.

La concentración plasmática de testosterona (T) se midió mediante un kit de radioinmunoensayo (RIA). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y realizadas con el mismo tipo de análisis. El coeficiente

de variación intra-ensayo fue de 7.4% y la sensibilidad fue de 0.05 ng/ml.

7. Extracción de ARN.

El ARN total fue extraído de 25 mg de corteza prefrontal de las ratas macho y hembra y 25 mg de próstata de las ratas macho. Se realizó mediante Tiocinato de Guanidina-fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987). Brevemente, el método se utilizó tanto para tejido cerebral como tejido prostático y consistió en homogenizar 25 mg de tejido en una solución desnaturalizante (Tiocionato de guanidina 4M, N-guanidina 4M, N-lauril-sarcosina 0.5%, β -mercaptoetanol 0.1M en tampón de citrato sódico 25mM, pH 7.0) usando un homogenizador Polytron Kinetica PT 1200. Se centrifuga a 13000 rpm. Durante 2 minutos. 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 minutos. 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 ARN es precipitado con isopropanol al 60% durante toda la noche a -20°C. Centrifugamos 30 min. A 13000 rpm. a 4°C y decantamos el isopropanol. Lavamos el pellet de ARN con 1 ml de etanol 75% frío. Centrifugamos 5 min. a 13000 rpm. Repetimos el lavado. El ARN 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 ADN genómico contaminante en la extracción de ARN. Para degradar el ADN contaminante se tomaron 9 µl de la muestra de ARN previamente resuspendida, 0.8 µl de 0.1 U/ 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 ARN se comprobó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

8. Cuantificación del ARN.

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 $\epsilon = 44,19$

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 240 nm y 340 nm. 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 estima de 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 .

9. 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 5α -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 sometió a una búsqueda de homología de secuencia mediante el algoritmo BLAST, para evitar amplificaciones inespecíficas.

Los primers de los isoenzimas 5α -R son de 20 pb de longitud, mientras que los primers utilizados para sintetizar ambas moléculas

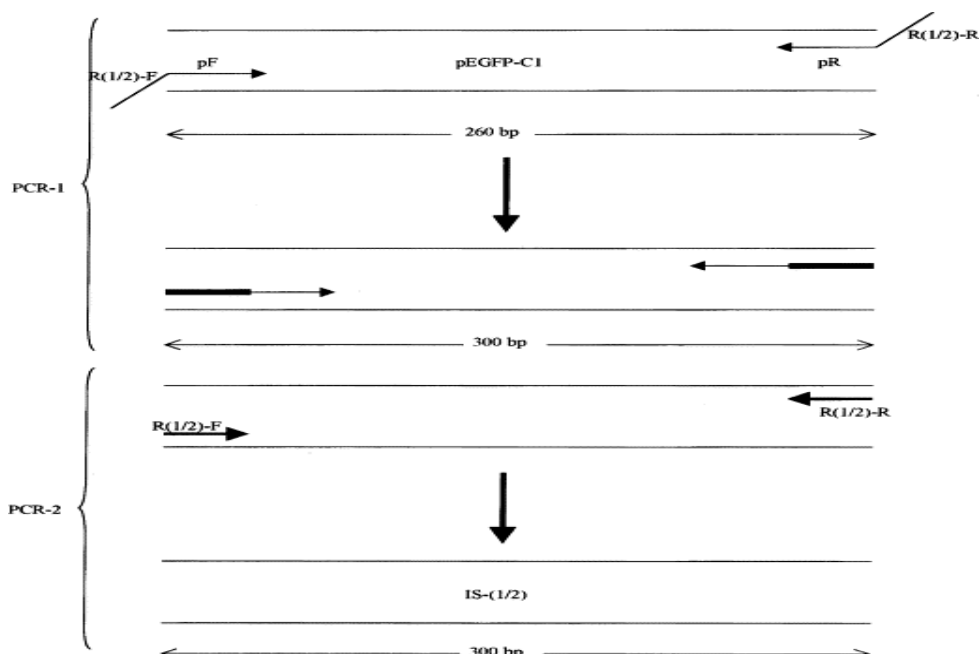
competidoras fueron de 40 pb de longitud. Todos los primers forward estaban marcados con 6-carboxi-fluoresceina (6-FAM), en posición 5'. Los oligonucleótidos eran sintetizados por PE-Applied Biosystems, UK. La secuencia de los primers (5'-3') y el tamaño de los productos de PCR se muestran en la siguiente 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	GAGATATTCAGCTGAGACCCACGTAAACGCCCA CAAGTTC	300
IS1-R	TTAGTATGTGGGCAGCTTGGTCTTGTAGTTGCCG TCGTCC	
IS2-F	ATTTGTGTGGCAGAGAGAGGACGTAAACGCCCA CAAGTTC	300
IS2-R	TTGATTGACTGCCTGGATGGTCTTGTAGTTGCCG TCGTCC	

10. Construcción del Estándar Interno

Los dos estándares internos sintéticos (IS) DNA_S 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 -R-2), 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-1y 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 ARNm 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.

11. 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:

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

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

Ec.1

Donde:

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

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

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

$N_{f\text{-st}}$: 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 :

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

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:

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

Y en analogía a la ecuación de una recta:

$$Y = b-x$$

Donde:

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

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

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

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 ha 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.

$$Y = 0 \quad \Leftrightarrow \log(N_{f-pro} / N_{f-st}) = 0 \quad N_{f-pro} = N_{f-st} \quad N_{0-pro} = N_{0-st}$$

(según la ec. 2)

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

Y combinando con la ecuación 4:

$$N_{0-mRNA} = k \times 10^{x_0} \quad \text{Ec. 5}$$

Se admite que el número de moléculas iniciales de cDNA problema (N_{0-prob}) es equivalente al número de moléculas iniciales de mRNA problema (N_{0-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, 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 $k_3 \cong 1$.

12. 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 ARNm de los isoenzimas 1 y 2 de la 5α -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 $MnCl_2$, 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 ± 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 - 32 P] dCTP (3000 Ci/mmol; 10 mCi/ml).

Después de ser generado el cDNA a partir del RNA total mediante la reacción de retrotranscripción 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.

13. Análisis de los productos de PCR

13.1 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 fotografían con una cámara Kodak (Bio-Rad, CA, USA).

13.2 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 (1µl) fue diluido a 1/20 con 18.5µl de formamida y 0.5µl 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 μm 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).

14. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los resultados se ha llevado a cabo mediante la t de Student. Los datos son expresados como la media \pm DS.

Resultados

1. Niveles plasmáticos de PRL en ratas macho control y tratadas con sulpiride.

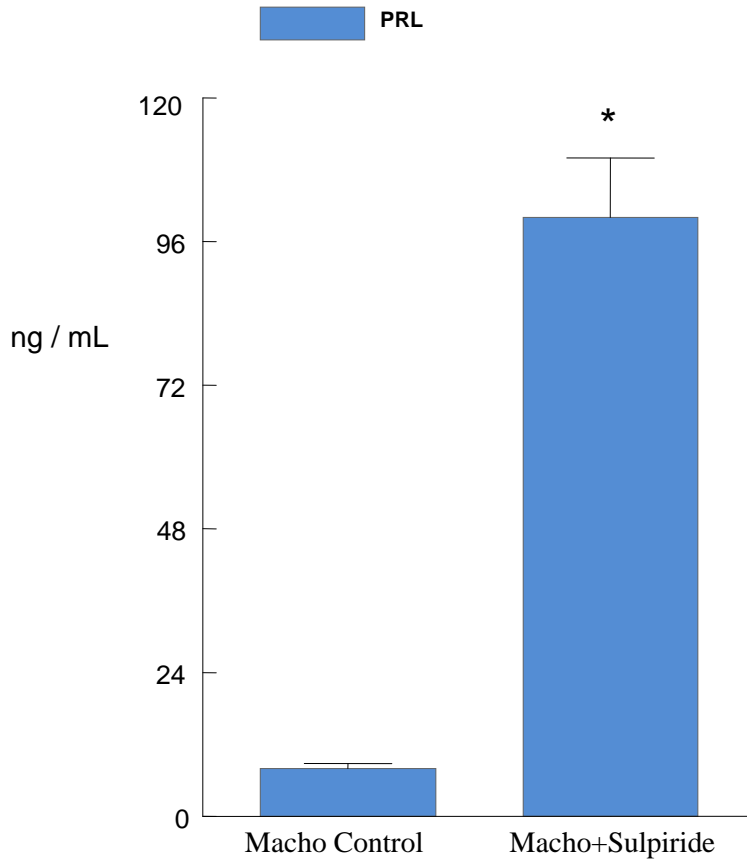


Figura 1

Figura 1: representa los niveles plasmáticos de prolactina en ratas macho control y tratadas con sulpiride. * $p < 0.001$ vs. Controles.

2. Niveles plasmáticos de PRL en ratas hembra control y tratadas con sulpiride.

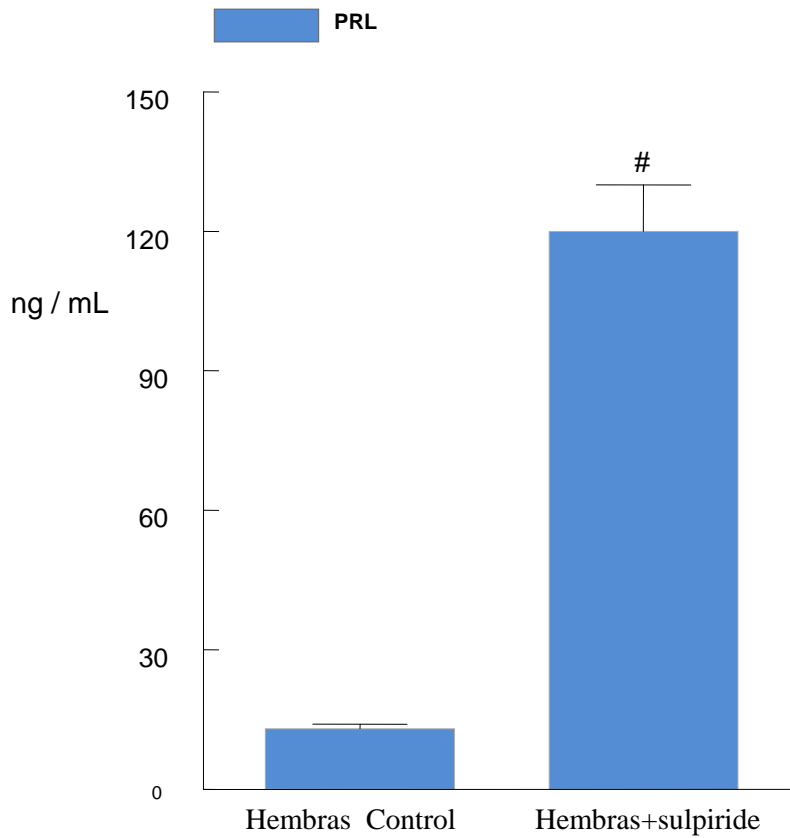


Figura 2

Figura 2: representa los niveles plasmáticos de prolactina en ratas hembra control y tratadas con sulpiride. * $p < 0.001$ vs. Controles.

3. Estudio comparativo del incremento sobre los niveles plasmáticos basales de PRL en ratas macho y hembra tratadas con sulpiride.

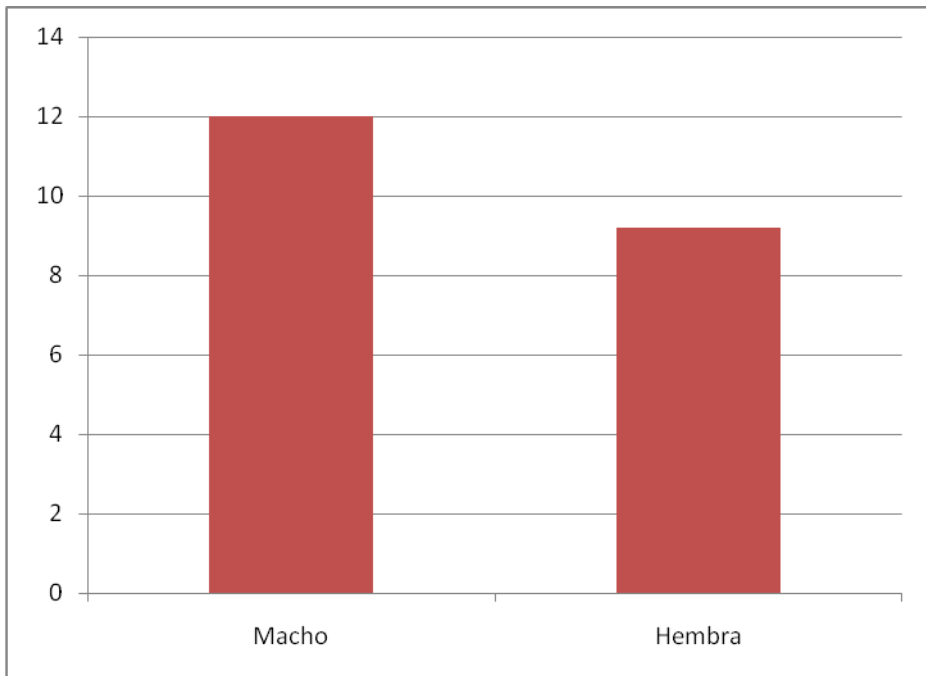


Figura 3

Figura 3: Incremento sobre los niveles basales de PRL en sangre de ratas macho y hembra tras la administración de sulpiride. En rojo el número de veces que ha aumentado con respecto a las basales.

El aumento fue mayor en ratas macho si tenemos en cuenta los niveles basales de PRL (ratas control) que eran mayores en ratas hembras.

4. Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 en corteza prefrontal de ratas macho control y tratadas con sulpiride.

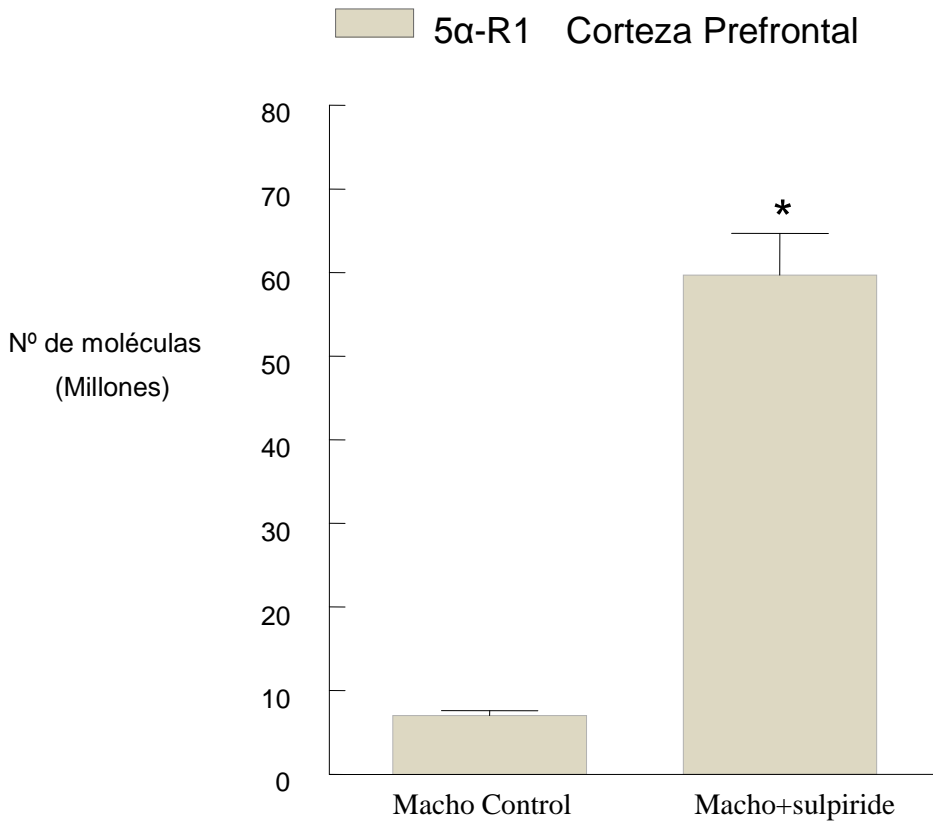


Figura 4

Figura 4: Efectos de la PRL sobre los niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 en corteza prefrontal de ratas macho control y tratadas con sulpiride. * $p < 0.001$ vs. Controles.

5. Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 en corteza prefrontal de ratas hembra control y tratadas con sulpiride.

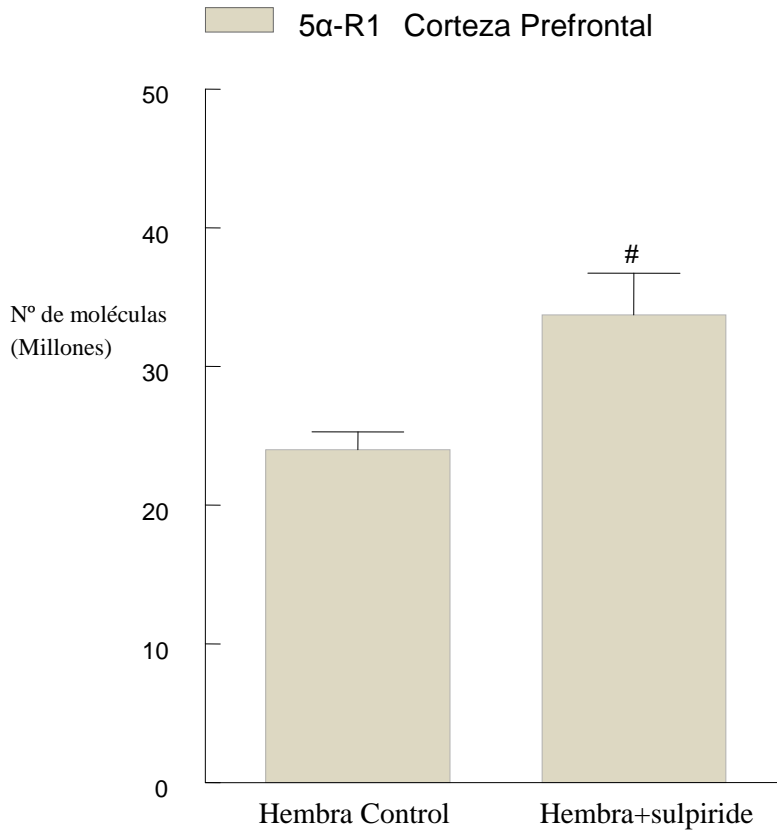


Figura 5

Figura 5: Efecto de la PRL sobre los niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 en corteza prefrontal de ratas hembra control y tratada con sulpiride. # $p < 0.001$ vs. Controles

6. Estudio comparativo del incremento sobre los niveles basales de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 en corteza prefrontal de ratas macho y hembra tratadas con sulpiride.

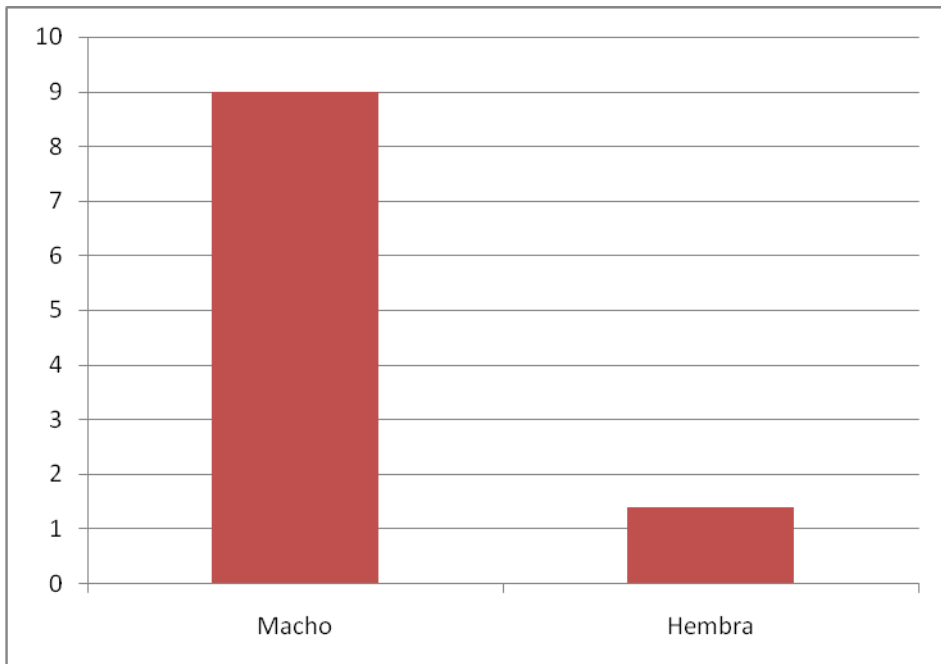


Figura 6

Figura 6. Incremento sobre los niveles basales de 5 α -R tipo 1 en corteza prefrontal de ratas macho y hembra tras la administración de sulpiride. En rojo las veces que ha aumentado con respecto a las basales.

El aumento fue mayor en ratas macho que en hembras teniendo en cuenta sus niveles basales (ratas control).

7. Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 en corteza prefrontal de ratas macho control y tratadas con sulpiride.

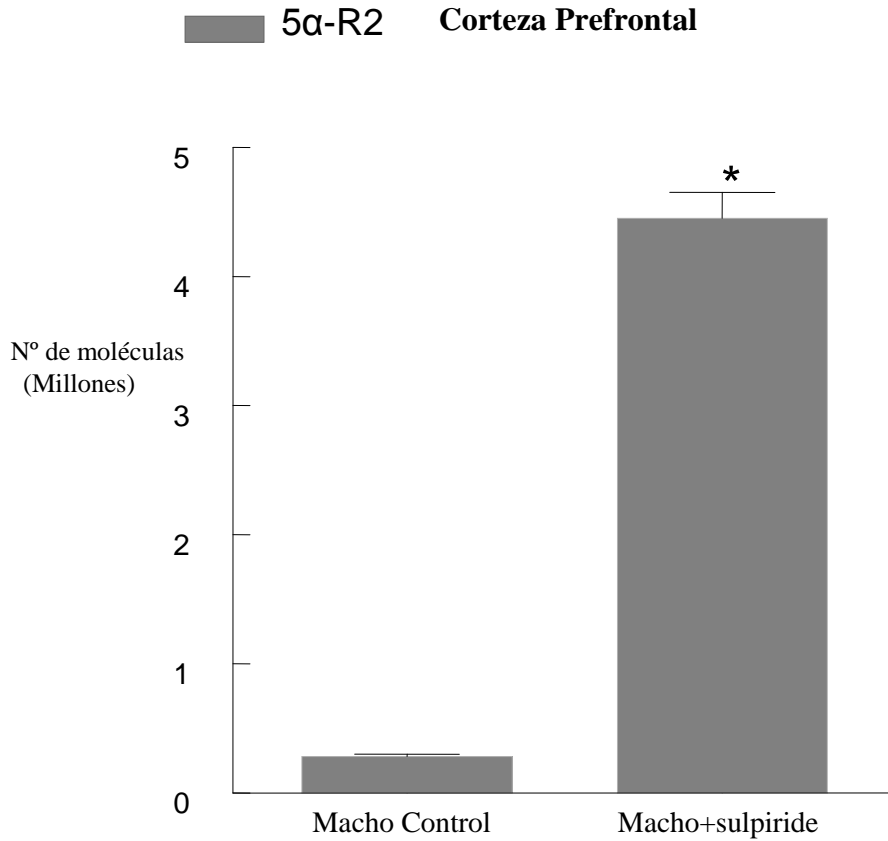


Figura 7

Figura 7: Efectos de la PRL sobre los niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 en corteza prefrontal de ratas macho control y tratadas con sulpiride. * $p < 0.001$ vs. Controles.

8. Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 en corteza prefrontal de ratas hembra control y tratadas con sulpiride.

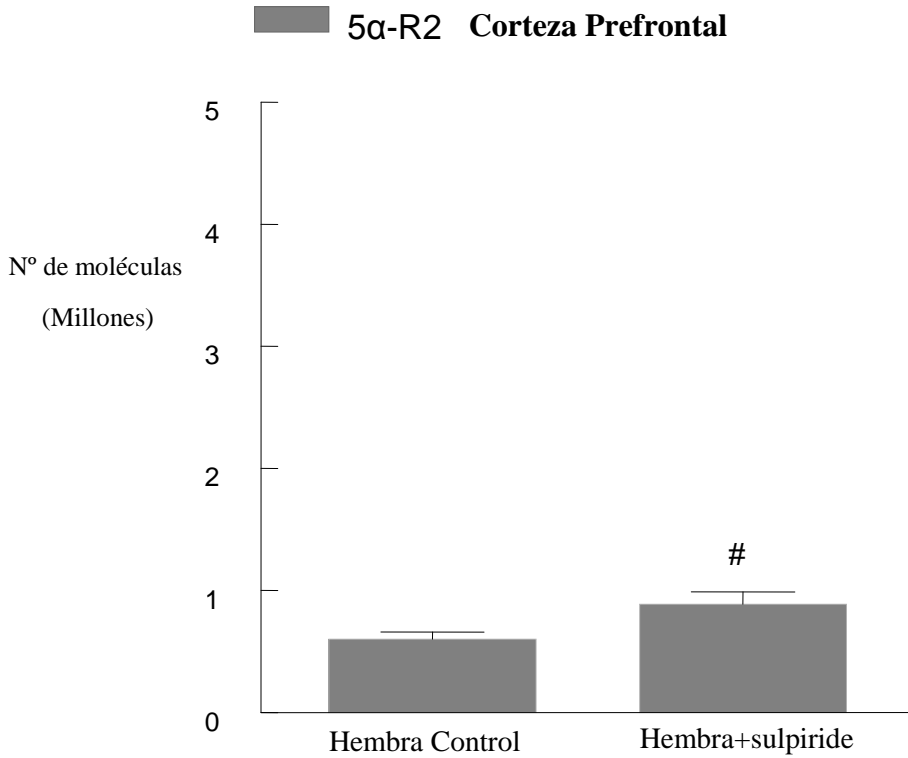


Figura 8

Figura 8: Efectos de la PRL sobre los niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 en corteza prefrontal de ratas hembra control y tratadas con sulpiride. # $p < 0.001$ vs. Controles.

9. Estudio comparativo del incremento sobre los niveles basales de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 en corteza prefrontal de ratas macho y hembra tratadas con sulpiride.

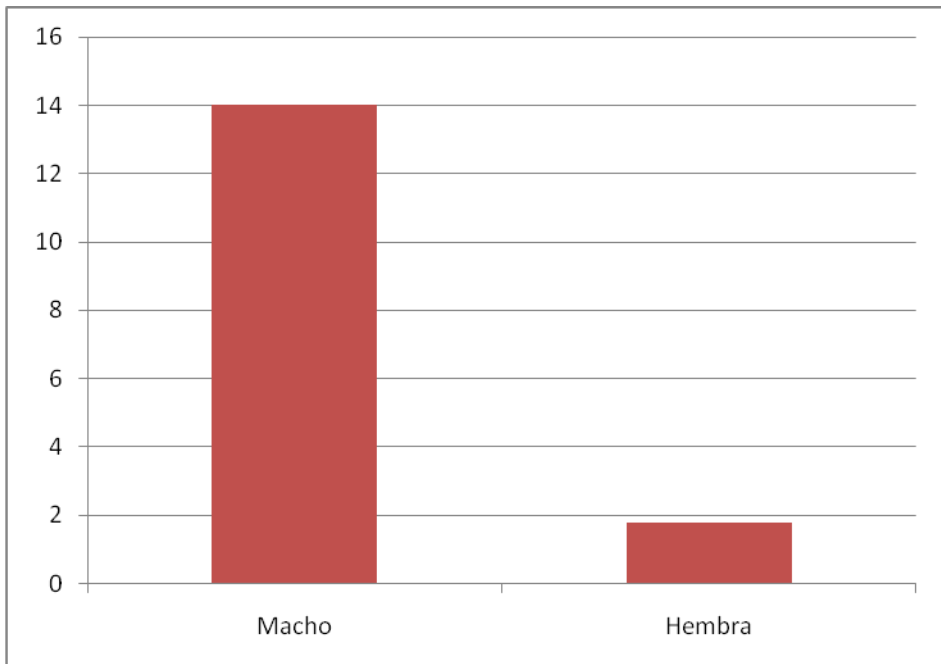


Figura 9

Figura 9. Incremento sobre los niveles basales de 5 α -R tipo 2 en corteza prefrontal de ratas macho y hembra tras la administración de sulpiride. En rojo el número de veces que ha aumentado con respecto a las basales.

El aumento con respecto a los niveles basales de ARNm de 5 α -R tipo 2 fue mayor en ratas macho que en hembra.

10. Niveles plasmáticos de T en ratas macho control y tratadas con sulpiride.

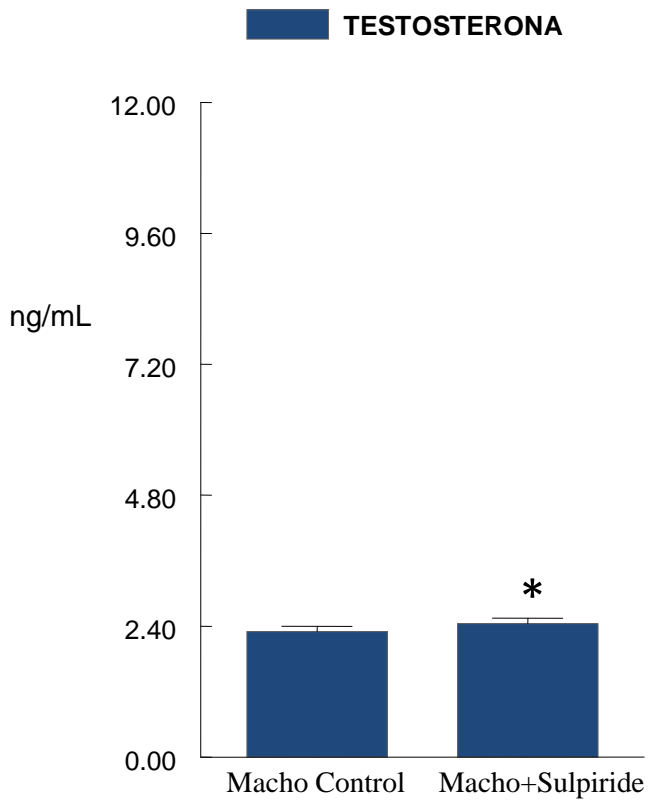


Figura 10

Figura 10. Niveles plasmáticos de Testosterona en ratas macho control y tratadas con sulpiride. * $p < 0.001$ vs. Controles. No se encontró diferencia significativa.

11. Efectos de la hiperprolactinemia sobre el peso de la próstata en ratas macho control y tratadas con sulpiride.

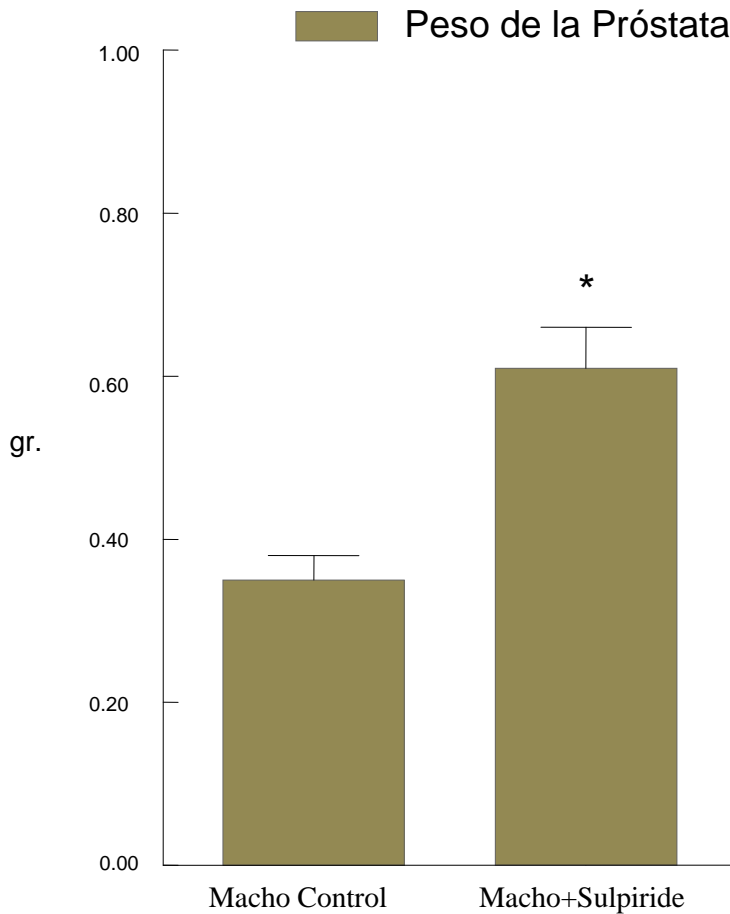


Figura 11

Figura 11. Efectos de la hiperprolactinemia sobre el peso de la Próstata (gr) de ratas control y tratadas con sulpiride. * $p < 0.01$ vs. Controles.

El peso húmedo de la próstata fue medido después de 30 días de tratamiento con sulpiride y fue significativamente mayor en ratas tratadas con sulpiride que en ratas control.

12. Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 en próstata de ratas macho control y tratadas con sulpiride.

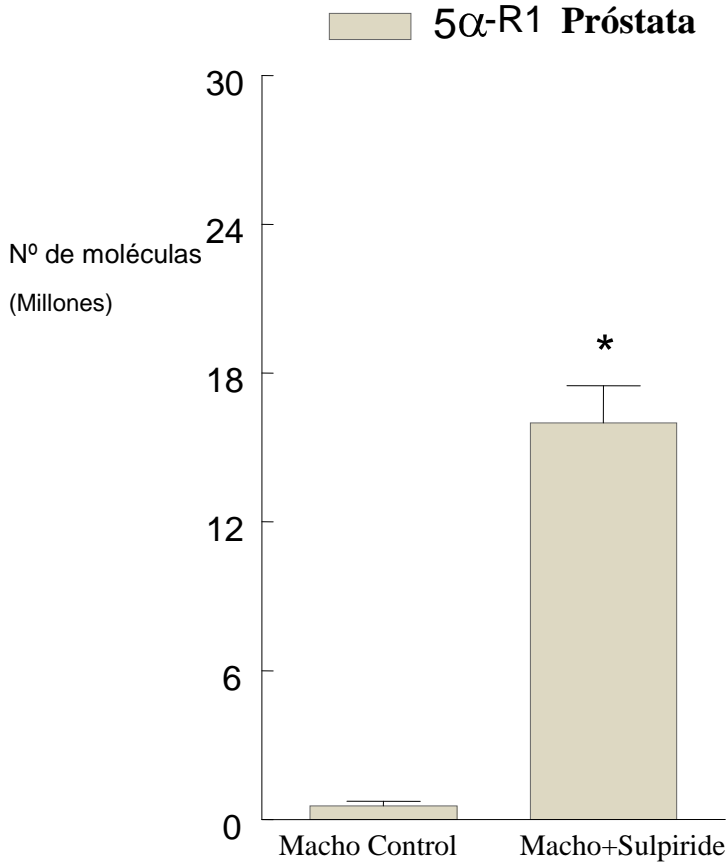


Figura 12

Figura 12: Efectos de la hiperprolactinemia sobre los niveles de ARNm del esteroide 5 α -Reducido tipo 1 (5 α -R1) en próstata de ratas macho control y tratadas con sulpiride. * $p < 0.001$ vs. Controles.

Los niveles de ARNm de 5 α R-1 fueron significativamente mayores en próstata de ratas tratadas con sulpiride que en ratas control.

13. Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 en próstata de ratas macho control y tratadas con sulpiride.

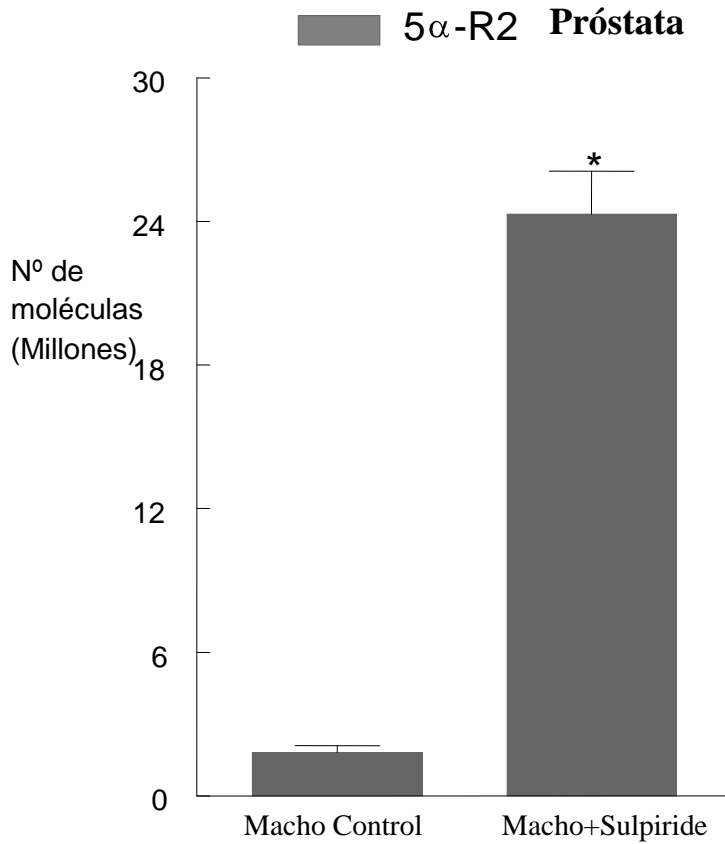


Figura 13

Figura 13: Efectos de la hiperprolactinemia en los niveles de ARNm del esteroide 5 α -Reducido tipo 2 (5 α -R2) en próstata de ratas control macho y tratadas con sulpiride. * $p < 0.001$ vs. Controles.

14. Niveles Plasmáticos de Prolactina en ratas macho control y tratadas con metoclopramida.

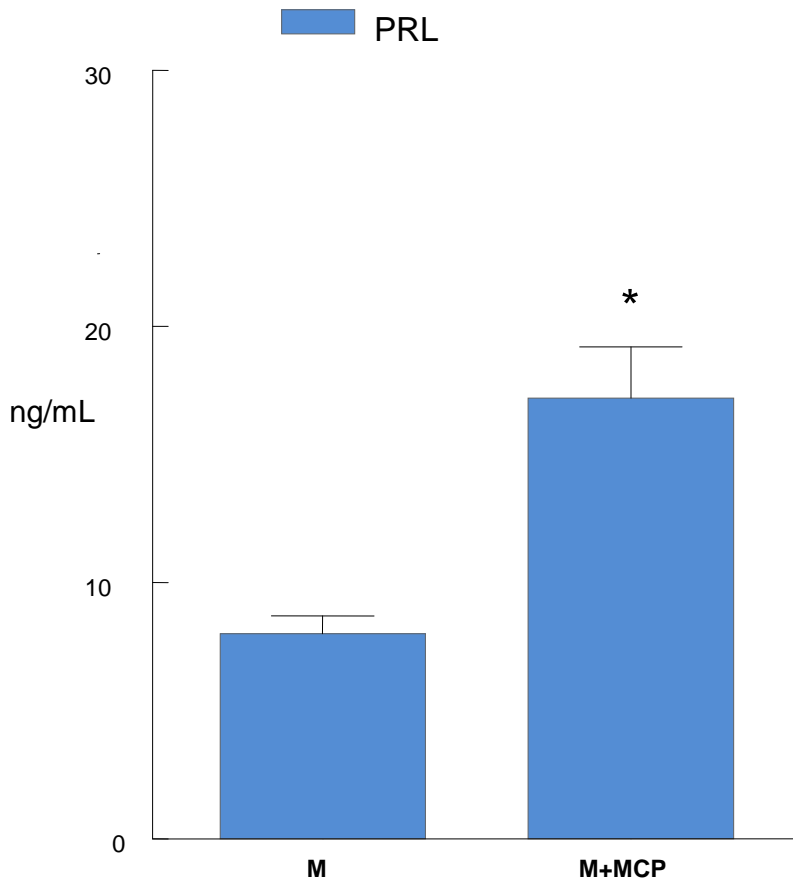


Figura 14

Figura 14: Niveles plasmático de PRL en ratas macho con y sin tratamiento con metoclopramida (MCP). *P <0.01 versus controles. **M**, machos control; **M+MCP**, machos tratados con metoclopramida.

Después del tratamiento con metoclopramida, las ratas macho mostraron un aumento significativo en los niveles de Prolactina en comparación con sus respectivos controles.

15. Niveles Plasmáticos de Prolactina en ratas hembra control y tratadas con metoclopramida.

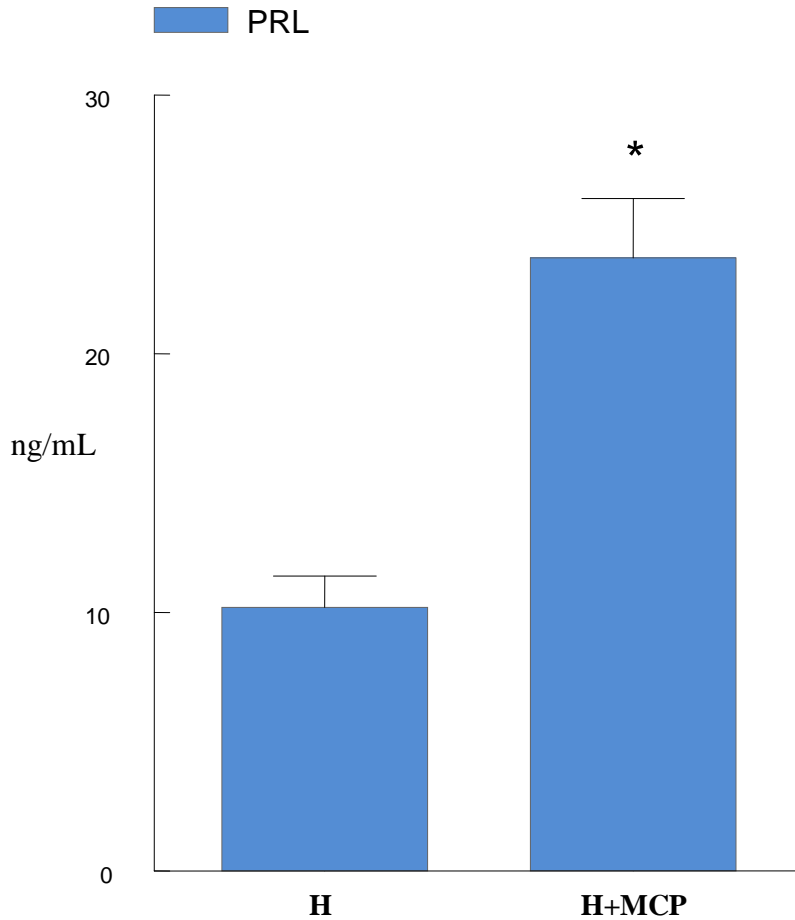


Figura 15

Figura 15: Niveles plasmático de PRL en ratas hembra con y sin tratamiento con metoclopramida (MCP). * $p < 0.01$ vs. Controles. **H**, hembras control; **H+MCP**, hembras tratados con metoclopramida.

Después del tratamiento con metoclopramida, las ratas hembra mostraron un aumento significativo en los niveles de prolactina en comparación con sus respectivos controles.

16. Estudio comparativo del incremento sobre los niveles basales de PRL en sangre de ratas macho y hembra tratadas con metoclopramida.

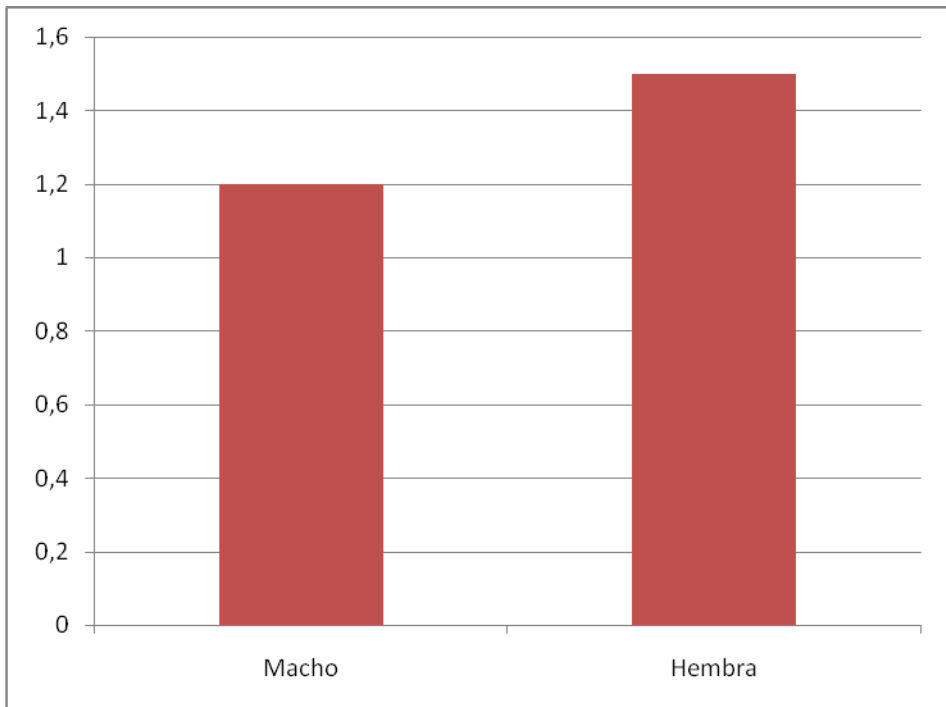


Figura 16

Figura 16. Incremento sobre los niveles basales de PRL en sangre de ratas macho y hembra tras la administración de metoclopramida. En rojo las veces que ha aumentado con respecto a las basales.

17. Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 en corteza prefrontal de ratas macho control y tratadas con metoclopramida.

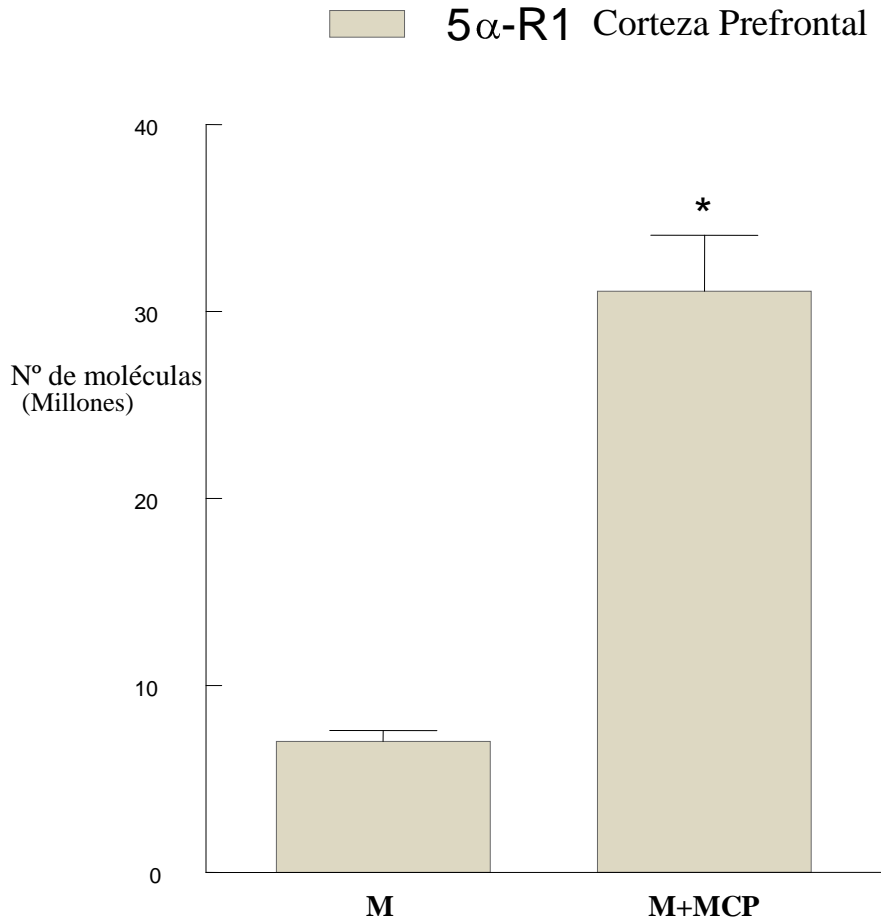


Figura 17

Figura 17: Efectos de la metoclopramida en los niveles del esteroide 5 α -reductasa tipo1 en corteza prefrontal de ratas macho. **M**, ratas macho control; **M+MCP**, ratas macho tratadas con metoclopramida. * p <0.01 vs. Controles.

18. Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 en corteza prefrontal de ratas hembra control y tratadas con metoclopramida.

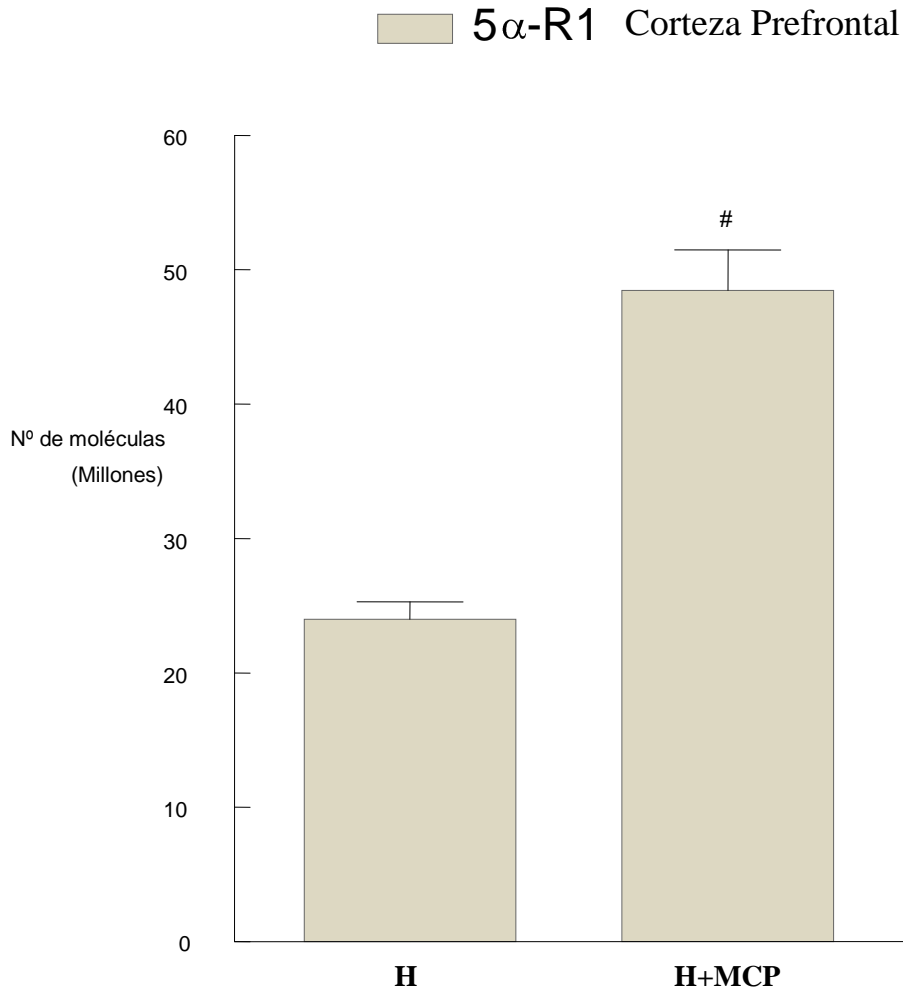


Figura 18

Figura 18: Efectos de la metoclopramida en los niveles del esteroide 5 α -reductasa tipo1 en corteza prefrontal de ratas hembra. * $p < 0.01$ vs. Controles. **H**, ratas hembra control; **H+MCP**, ratas hembra tratadas con metoclopramida.

19. Estudio comparativo del incremento sobre los niveles basales de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 en ratas macho y hembra tratadas con metoclopramida.

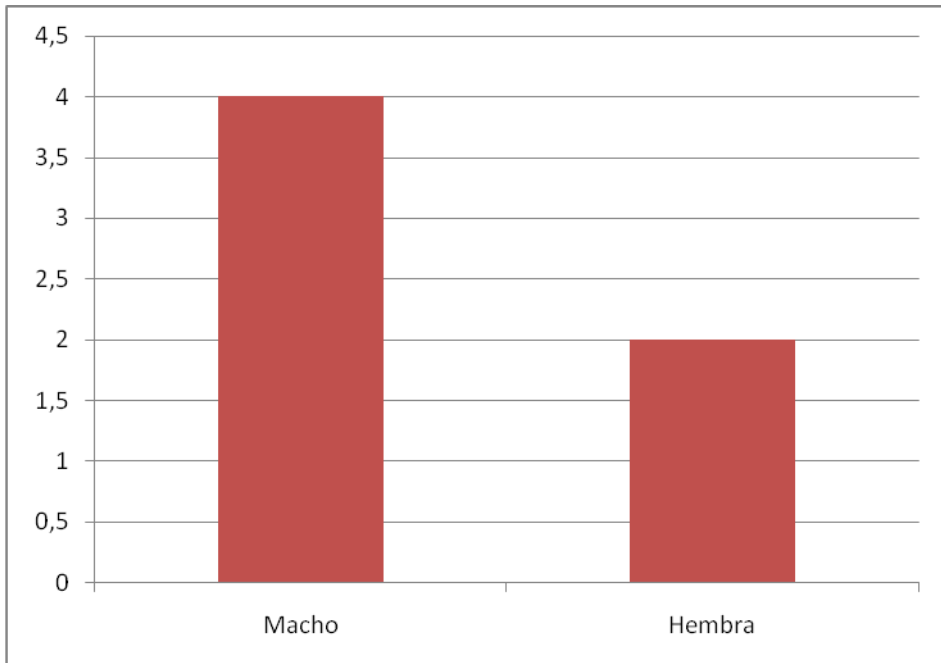


Figura 19

Figura 19. Incremento sobre los niveles basales de 5 α -R tipo 1 en corteza prefrontal de ratas macho y hembra tras la administración de metoclopramida. En rojo las veces que ha aumentado con respecto a sus respectivos basales.

Después del tratamiento con metoclopramida, hubo un aumento significativo en los niveles de ARNm de la 5 α -R1 en corteza prefrontal de ratas hembra y ratas macho, con un aumento mayor en ratas macho que en hembras con respecto a sus basales.

20. Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 en corteza prefrontal de ratas macho control y tratadas con metoclopramida.

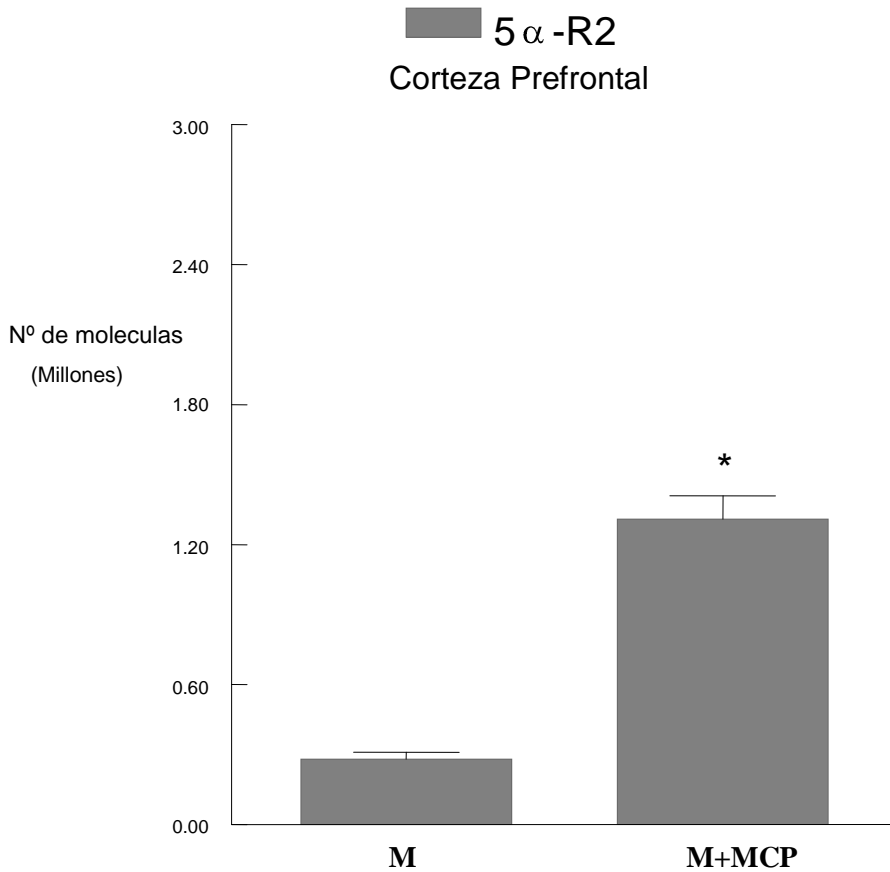


Figura 20

Figura 20: Efectos de la metoclopramida en los niveles del esteroide 5 α -reductasa tipo2 en corteza prefrontal de ratas Macho. *P <0.01 versus animales M. **M**, ratas macho control; **M+MCP**,ratas macho tratadas con metoclopramida.

21. Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 en corteza prefrontal de ratas hembra control y tratadas con metoclopramida.

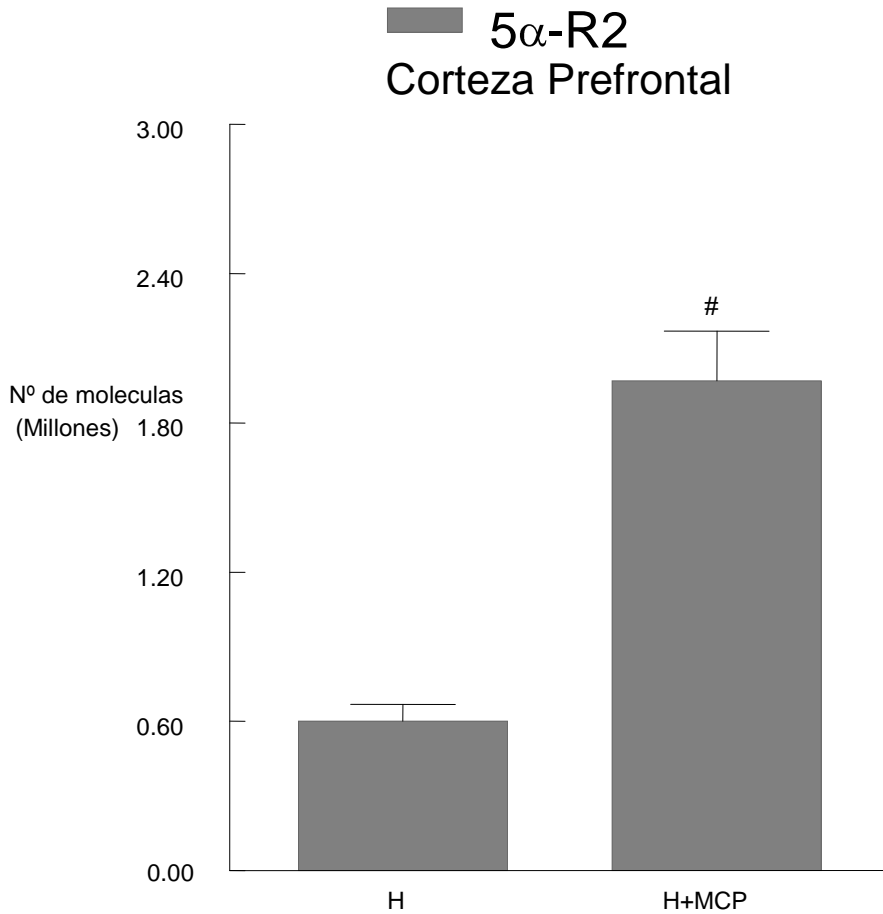


Figura 21

Figura 21: Efectos de la metoclopramida en los niveles del esteroide 5 α - reductasa tipo2 en corteza prefrontal de ratas hembra. # $p < 0.01$ vs. Controles H. **H**, ratas control hembra; **H+MCP**, ratas hembra tratadas con metoclopramida.

22. Estudio comparativo del incremento sobre los niveles basales de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 en corteza prefrontal de ratas macho y hembra tratadas con metoclopramida.

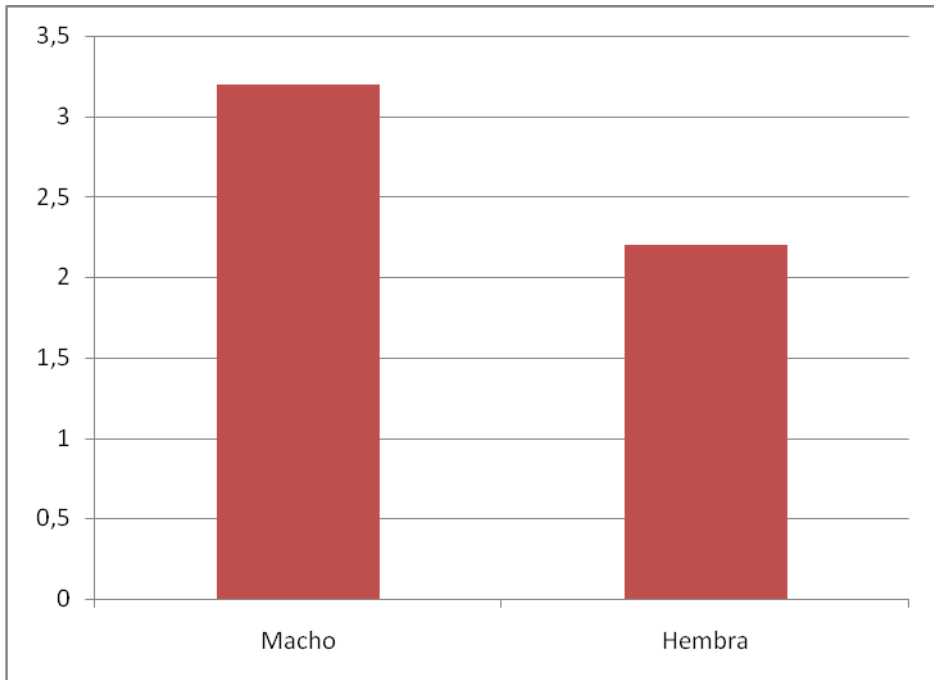


Figura 22

Figura 22. Incremento sobre los niveles basales de 5 α -R tipo 2 en corteza prefrontal de ratas macho y hembra tras la administración de metoclopramida. En rojo el número de veces que ha aumentado con respecto a las basales.

23. Estudio comparativo de los niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 en ratas macho tratadas con sulpiride y tratadas con metoclopramida.

Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1

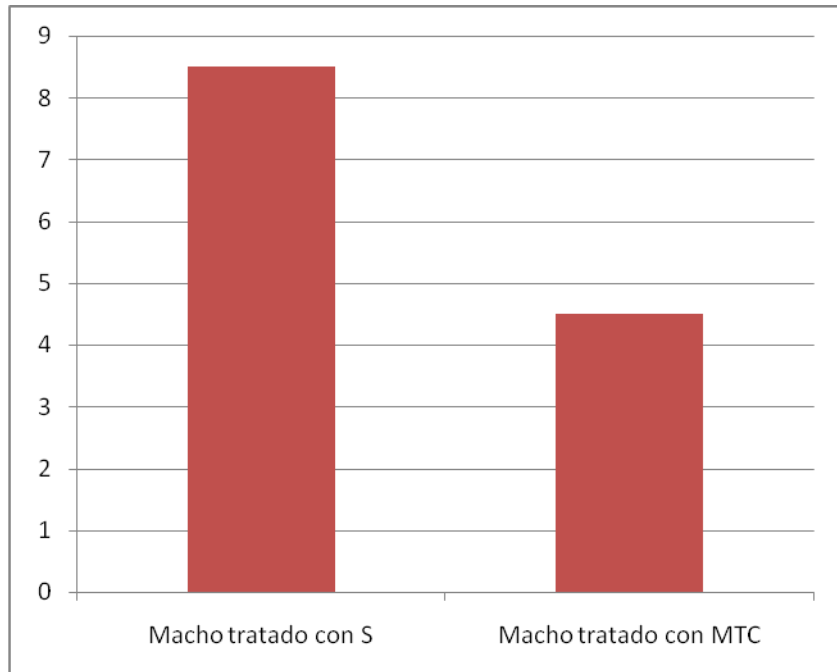


Figura 23

Fig. 23. Los niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 aumentaron menos en ratas macho con el tratamiento de metoclopramida (4,5 veces) que con el de sulpiride (8,5 veces).

24. Estudio comparativo de los niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 en ratas macho tratadas con sulpiride y tratadas con metoclopramida.

Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2

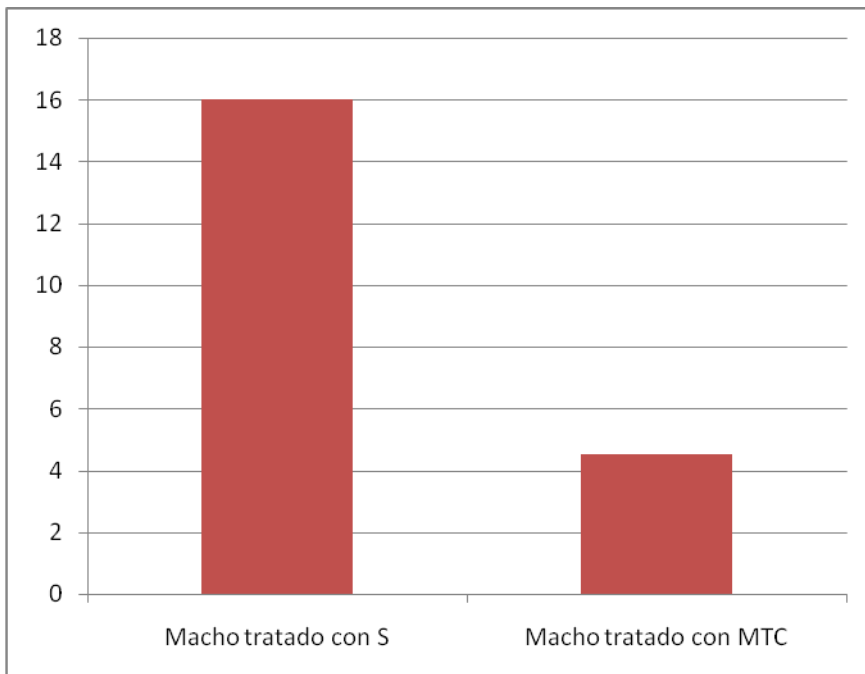


Figura 24

Fig.24. Los niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 aumentaron menos en ratas macho con el tratamiento de metoclopramida (4,5 veces) que con el de sulpiride (16 veces).

25. Estudio comparativo de los niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 en ratas hembra tratadas con sulpiride y tratadas con metoclopramida.

Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1

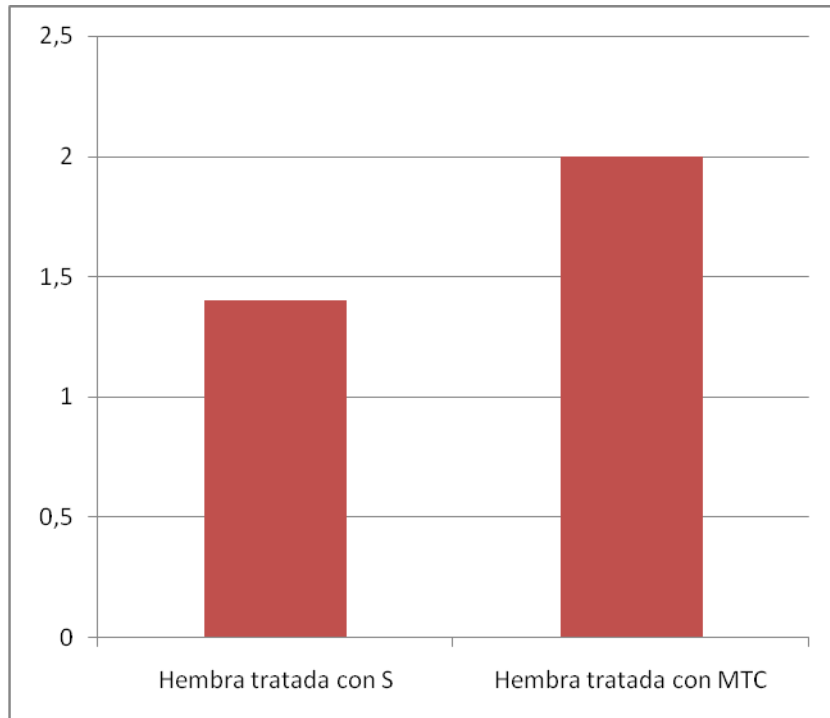


Figura 25

Fig. 25. Los niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 1 aumentaron más en ratas hembra con el tratamiento de metoclopramida (2 veces) que con el de sulpiride (1,4 veces).

26. Estudio comparativo de los niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 en ratas macho tratadas con sulpiride y tratadas con metoclopramida.

Niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2

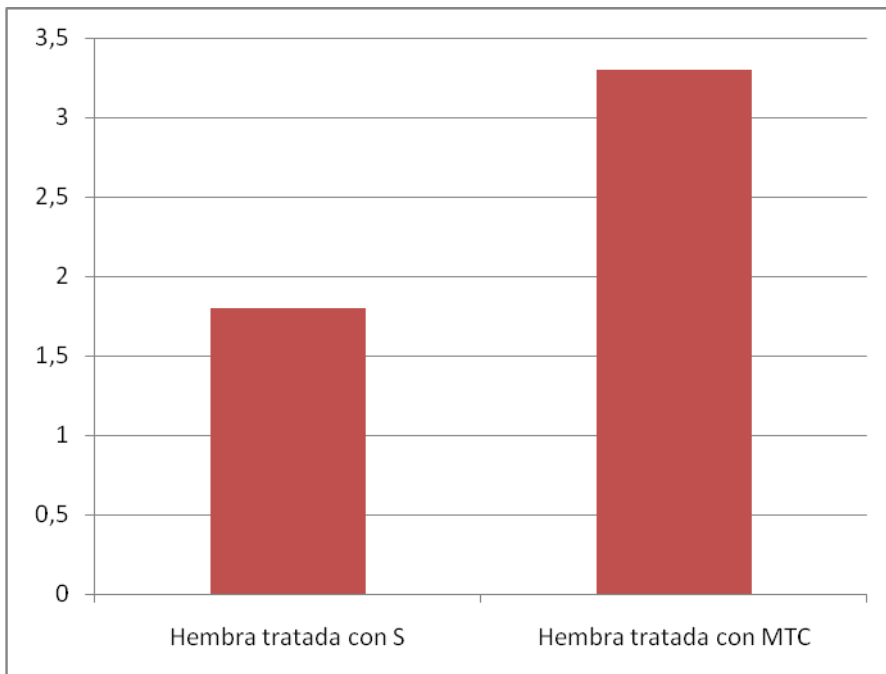


Figura 26

Fig.26. Los niveles de ARNm de la isoenzima 5 α -R tipo 2 aumentaron más en ratas hembra con el tratamiento de metoclopramida (3,3) que con el de sulpiride (1,6 veces).

Discusión

Es bien conocido que existe una asociación entre las situaciones de estrés y los niveles de los neuroesteroides 3α , 5α -reducidos. Numerosos autores han encontrado modificaciones en los niveles de neuroesteroides 3α , 5α -reducidos en plasma y cerebro de roedores bajo diferentes situaciones de estrés (Biggio G y col., 1996; Biggio G y col., 2000) diferenciando entre los efectos de las situaciones de estrés agudo y crónico (Barbaccia ML y col., 2001). Nuestros propios trabajos, realizados en sujetos humanos, han demostrado que una situación de estrés agudo como podría considerarse la intoxicación etílica aguda, aumenta los niveles plasmáticos de allopregnenolona, neuroesteroide 3α , 5α -reducido, en jóvenes adolescentes tanto machos como hembras (Torres y Ortega, 2003a; Torres y Ortega, 2004a).

Los neuroesteroides 3α , 5α -reducidos están también implicados en la diferenciación sexual del cerebro y de la conducta maternal (Segovia y col., 1996; Pérez-Laso y col., 1994; Bach y col., 1992; Segovia y col., 1991; Dolher, 1991; Mattson, 1988; Dorner, 1979; Kincl, 1965).

La prolactina (PRL) regula la producción y composición de la leche en la glándula mamaria y también regula el comportamiento maternal (Bridges RS y col., 1985; Bridges y Ronsheim, 1990) función específica de la hembra. Además de estas funciones, la PRL es una hormona que juega un papel en la respuesta del individuo al estrés (Drago y col., 1985). Es probable que la PRL cerebral atenúe la excesiva secreción inducida por el estrés de la ACTH y de la corticoesterona en la sangre (Donner y col., 2007), promocionando adaptaciones significativas en la respuesta emocional y neuroendocrina

al estrés (Russell y col., 1999; Toufexis y Walker, 1996; Lightman y col., 2001; Nuemann y col., 2001; DeWeerth y Buitelaar, 2005).

Los neuroesteroides $3\alpha,5\alpha$ -reducidos se sintetizan en el cerebro y también en otras glándulas endocrinas tales como la corteza suprarrenal, ovarios y testículos, a partir de progesterona y corticosterona, necesitando para su biosíntesis los enzimas 5α -reductasa y 3α -oxidoreductasa, siendo la primera la enzima limitante de la reacción. La enzima 5α -reductasa se expresa como dos isoenzimas 5α -reductasa tipo1 (5α -R1) y 5α -reductasa tipo2 (5α -R2), aunque recientemente se ha encontrado un nuevo isoenzima de la 5α -reductasa, la 5α -R tipo 3, cuyo papel no es aún conocido.

Nuestros trabajos previos han demostrado que las isoenzimas tipo 1 y tipo 2 de la 5α -reductasa se encuentran en la corteza prefrontal de rata; que los niveles de ARNm de ambas isoenzimas se regulan por las hormonas androgénicas testosterona y dihidrotestosterona de manera diferente en el macho y en la hembra lo que indica su dimorfismo sexual (Torres y Ortega., 2003b); y que una situación de estrés agudo incrementa los niveles de ARNm de ambas isoenzimas de la 5α -R en corteza prefrontal de rata macho (Sánchez y col., 2007).

Por todo ello, nos parece sumamente importante estudiar la relación PRL/neuroesteroides $3\alpha,5\alpha$ -reducidos, ya que los efectos de PRL tanto en situaciones de estrés, como en la inducción del comportamiento maternal, podrían ejercerse, al menos en parte, a través de los neuroesteroides $3\alpha,5\alpha$ -reducidos.

Los resultados de nuestros experimentos demuestran que la administración diaria de 40 mg/Kg de sulpiride durante 30 días de

acuerdo con los trabajos de Van Copenolle y col., 2001, produjo un aumento significativo en los niveles plasmáticos de prolactina tanto en machos como en hembras (Fig. 1 y Fig. 2 respectivamente). Si bien el aumento de PRL fue mayor en la rata hembra que en la rata macho, el incremento sobre los niveles basales fue mayor en la rata macho que en la hembra (Fig. 3).

Como puede observarse en las figuras 4 y 5 tanto las ratas macho (Fig. 4) como las hembras (Fig. 5) a las que se les había administrado sulpiride, mostraron un aumento significativo en los niveles de ARNm de la isoenzima 5α -R1 en corteza prefrontal. El incremento sobre los niveles basales fue mayor en ratas macho que en ratas hembra (Fig. 6). Igualmente la administración de sulpiride produjo un aumento significativo en los niveles de ARNm de la isoenzima 5α -R2 tanto en la rata macho (Fig.7) como en la hembra (Fig.8). Como muestra la figura 9, el incremento con respecto a los niveles basales fue mucho mayor en ratas macho que en ratas hembra. A la vista de estos resultados nosotros apuntamos que el aumento de los niveles de PRL inducidos por sulpiride está claramente asociado con un aumento en los niveles de ARNm de ambas isoenzimas de la 5α -R.

Como ya hemos comentado tanto los neuroesteroides 3α , 5α -reducidos, como la PRL son ambos secretados en situaciones de estrés (Purdy y col., 1991; Torres y Ortega, 2003a; Torres y Ortega, 2004a; Russell y col., 1999; Toufexis y Walker, 1996; Lightman y col., 2001; Nuemann y col., 2001; DeWeerth y Buitelaar, 2005). Por lo tanto, es lógico pensar que PRL a través de neuroesteroides 3α , 5α reducidos o bien conjuntamente con neuroesteroides 3α , 5α reducidos, participen posiblemente en una vía común de adaptación a las situaciones de

estrés. En este sentido es bien conocido el efecto ansiolítico de la PRL y de los neuroesteroides 3α , 5α reducidos (Donner y col., 2007; Purdy y col., 1991).

En cuanto a lo que conocemos sobre el comportamiento maternal, nuestros resultados aportarían nuevos datos al respecto. Tal y como hemos indicado la PRL, no solo interviene en los procesos de lactación sino también en el comportamiento maternal. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha sido pionero en hipotetizar que los neuroesteroides 3α , 5α reducidos, a través de la modulación del receptor tipo A del GABA, inducen la conducta maternal. Los presentes resultados nos indican que al igual que sucede con el estrés, PRL y neuroesteroides 3α , 5α reducidos, podrían participar conjuntamente para potenciar dicha conducta maternal.

La enzima 5α -R, juega un papel fundamental en la próstata. De hecho, el principal andrógeno en la glándula prostática es la 5α dihidrotestosterona, producida por reducción en posición 5-alfa de la testosterona mediante la enzima 5α -Reductasa (Russell y Wilson, 1994). La glándula prostática expresa la isoenzima tipo1 y la isoenzima tipo 2, como previamente demostramos nuestro grupo de investigación, así como otros investigadores (Torres y col., 2003c; Mahendroo y col., 2001). Según nuestra hipótesis, ambas isoenzimas 5α -R podrían contribuir al incremento de DHT en próstata. DHT podría actuar de manera tanto paracrina como autocrina en la próstata, estimulando su diferenciación y crecimiento (Torres y col., 2003c). En las células epiteliales, la isoenzima tipo1 podría sintetizar DHT, que actuará de manera autocrina para estimular su diferenciación. Alternativamente DHT podría actuar de manera paracrina para estabilizar o estimular la

división del epitelio luminal adyacente dependiente de andrógenos (Russell y Wilson, 1994).

Desde hace tiempo se sabe que la PRL promueve el crecimiento y proliferación de las células prostáticas (Lane y col., 1997; Nevalainen y col., 1997; Wennbo y col., 1997; Costello y Franklin, 1994; Tangbanluekal y Robinette, 1993). Además se conocía que la hiperprolactinemia estaba asociada con el incremento del peso de la próstata (Van Copenolle y col., 2000). Todo esto unido a las evidencias de receptores D2 en próstata de rata (Amenta y col., 1987), nos llevó a hipotetizar que la PRL podría ejercer una acción directa en la glándula prostática y que este efecto podría ejercerse a través de las isoenzimas de la 5α -R, promoviendo un aumento del ARNm de los mismos en dicha glándula.

Los resultados de nuestros experimentos demuestran claramente que la hiperprolactinemia inducida por sulpiride está asociada a un incremento en los niveles de ARNm de ambas isoenzimas de la 5α -R tipo 1 y tipo 2, (Fig. 12 y Fig. 13, respectivamente). Por lo tanto los efectos de la PRL en el crecimiento de la próstata (Fig.11) pueden ser ejercidos, entre otros factores, por un incremento de ambas isoenzimas 5α -R en dicha glándula.

Nuestros resultados estarían apoyados por un trabajo previo que demostró que la hiperprolactinemia en ratas aumentaba la actividad de la enzima 5α -R en próstata de dicho animal (Van Copenolle y col., 2000). También estaría apoyado por otro, en el que se vió que la administración de PRL ovina aumentaba el peso de la próstata y la actividad de la enzima 5α -R (Yamanaka y col., 1975).

Son varios los estudios que se han hecho para explicar la relación PRL/glándula prostática. Diversas investigaciones en animales y humanos, aunque muy controvertidas, indican que existe una relación entre la hiperprolactinemia y las concentraciones de andrógenos en plasma. (Ruiz y col., 1984; Huang y col., 2001; Bartke y col., 1977). Si bien algunos autores utilizando modelos in vitro de próstata de ratones transgénicos han indicado que la prolactina puede ejercer sus efectos sobre la próstata independientemente de los andrógenos (Wennbo y col., 1997; Crépin y col., 2007; Reiter y col., 1995; Price D, 1963; Smith y col., 1985; Van Copenolle y col., 2004). Muchos otros autores consideran que la PRL puede también actuar en la próstata a través de los andrógenos (Prins G, 1987). Así se ha demostrado que la PRL aumenta la concentración libre de esteroide en sangre y la captación de testosterona en células prostáticas (Farnsworth W, 1988). Otros investigadores demostraron que la hiperprolactinemia afectaba al crecimiento de la próstata en animales castrados tratados con testosterona pero no en animales sin tratamiento (Van Copenolle y col., 2001), demostrando que los andrógenos median en los efectos de la PRL sobre el crecimiento de la próstata

Los genes que codifican para las isoenzimas tipo 1 y tipo 2 de la 5α -R son regulados positivamente por la testosterona, el andrógeno más abundante (Torres Ortega, 2003b). Por ello existía la posibilidad de que la PRL no hubiera ejercido una acción directa en la próstata sobre la expresión de los genes de la 5α -R, sino que el efecto podría haber sido indirecto a través de la testosterona. Para dilucidar este hecho, nosotros medimos los niveles plasmáticos de testosterona en ratas control y tratadas con sulpiride. Como muestra la Fig. 10 la falta de una diferencia significativa entre los niveles plasmáticos de testosterona

entre las ratas control y las tratadas con sulpiride excluye a la testosterona como la responsable del incremento de los niveles de ARNm de las isoenzimas de la 5α -R en ratas tratadas con sulpiride.

Van Coppenolle y col., 2001, habían demostrado que la hiperprolactinemia es efectiva para inducir crecimiento de la próstata en animales castrados si son tratados con implantes de DHT. Este hallazgo no contradice en absoluto los resultados encontrados ni indica que la PRL no pueda tener un efecto directo en la próstata a través de las isoenzimas de la 5α -reductasa. Probablemente además del aumento de la cantidad de DHT prostático por el incremento de ambas isoenzimas 5α -R, la PRL produzca también un aumento de los efectos de la DHT en esta glándula.

Si bien ha quedado patente la interrelación PRL e isoenzimas 5α -R, no se puede descartar que los efectos que nosotros obtenemos sobre los niveles de ARNm de las isoenzimas de 5α -R en corteza prefrontal y en próstata no sean ejercidos por la hiperprolactinemia inducida por sulpiride sino por el sulpiride “per se”.

Para dilucidar esta posibilidad, nosotros hemos hecho nuevos experimentos en los que hemos inducido una hiperprolactinemia con otra droga diferente al sulpiride, concretamente la metoclopramida que es una droga con estructura química y propiedades farmacológicas muy diferentes al sulpiride, pero que es antagonista de los receptores tipo D2 de dopamina y por tanto, elimina la inhibición de la secreción de PRL inducida por dopamina (Debeljuk y col., 1975).

El sulpiride es un fármaco que pertenece al grupo de los antipsicóticos derivados de sustituir la benzodiazepinas y es usado en el tratamiento de la ansiedad, fobias, trastorno obsesivo compulsivo, esquizofrenia, paranoia, delirio y otras patologías, algunas de las cuales están asociadas con una disminución en los neuroesteroides 3α , 5α -reducidos (Uzunova y col., 1998; Dong y col., 2001; Guidotti y col., 2001; Van Broekhoven y Verkes, 2003; Marx y col., 2006). Por lo tanto, al menos hipotéticamente, el sulpiride podría aumentar “per se” los niveles de ARNm de ambas isoenzimas de la 5α -R, el enzima clave y limitante en la biosíntesis de neuroesteroides 3α , 5α -reducidos. En contraste, la metoclopramida es un fármaco gastrocinético y es usado como antiemético y estimulante de la motilidad intestinal, situaciones no asociadas a los neuroesteroides ni a las isoenzimas 5α -R . Por tanto no es de suponer que aumente “per se” los niveles de ARNm de las isoenzimas de la 5α -R.

Los resultados de nuestros experimentos reflejados en las figuras 14 y 15, demuestran por primera vez a nuestro conocimiento, que la administración de 2,2 mg/Kg de Metoclopramida dos veces por semana durante 14 días a ratas macho y hembra produce una hiperprolactinemia , la cual está asociada con un aumento de los niveles de las isoenzimas tipo 1 (Fig. 17 y Fig. 18) y tipo 2 (Fig. 20 y Fig. 21) de 5α -R en corteza prefrontal de ratas macho y hembra siendo el aumento mayor, tanto para la 5α -R1 como para la 5α -R2 (Fig. 19 y Fig. 22) , en ratas macho que en ratas hembras.

Interesantemente, aunque sulpiride (Sánchez y col., 2008) y metoclopramida aumenten los niveles de ARNm de las dos isoenzimas de 5α -R en cerebro de rata adulta, no tienen efectos idénticos. En ratas

macho, los niveles de 5 α -R1 aumentaron menos con la metoclopramida (4.5 veces) que con el sulpiride (8.5 veces) como se observa en la Figura 23, y los niveles de ARNm de 5 α -R2 también fueron menores con la metoclopramida (4.5 veces) que con el Sulpiride (16 veces), Figura 24. En ratas hembra, los niveles de ARNm de la 5 α -R1 aumentaron más por la metoclopramida (2 veces) que por el sulpiride (1.4 veces) Figura 25, y los niveles de ARNm de 5 α -R2 también incrementaron más por la metoclopramida (3.3 veces) que con el sulpiride (1.8 veces) Figura 26. Estas diferencias en la regulación de estas isoenzimas después de la administración de metoclopramida o sulpiride (Sánchez y col., 2008) pueden no solo ser atribuido a la hiperprolactinemia inducida por estas drogas, como la respuesta de ambos sexos podría ser la misma cuando ese fuese el caso. Por lo tanto otros factores inducidos por estas drogas además de la prolactina, pueden intervenir en la regulación de ambas isoenzimas de 5 α -R.

Nuestros resultados pueden tener un importante significado fisiológico. De hecho, 5 α -R fue considerada previamente una enzima constitutiva que protege neuronas del exceso de glucocorticoides que podían inducir apoptosis (Mahendroo y col., 1997; Poletti y col., 1998). Sin embargo, estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación demostró que 5 α -R podía ejercer otras funciones además de su función catabólica, como por ejemplo, la biosíntesis de neuroesteroides 3 α , 5 α - reducidos (Torres y Ortega, 2003b). Algunos resultados publicados apoyan esta hipótesis: los niveles de ARNm de 5 α -R1 son superiores en ratas hembra que en ratas macho (Torres y Ortega, 2003b; Torres y Ortega, 2006) y los niveles de neuroesteroides

3 α , 5 α -reducidos son también superiores en ratas hembra que en ratas macho (Torres y col., 2001).

La isoenzima 5 α -R2 es considerada una enzima androgénica (Torres y Ortega, 2003b; Poletti y col., 1998; Torres y col., 2003c) que puede producir dihidrotestosterona en cerebro de rata hembra bajo condiciones fisiológicas, las cuales pueden servir para establecer y mantener el dimorfismo sexual en algunas regiones cerebrales (Torres y Ortega, 2003b; Sánchez y col., 2005; Torres y Ortega, 2006). En ratas hembra, 5 α -R2 puede servir para sintetizar neuroesteroides 3 α , 5 α -reducidos, a partir de los niveles de progesterona (por la cual estas isoenzimas tienen una alta afinidad) (Negri-Cesi y col., 1996) son mayores que en machos. En este trabajo el tratamiento de las ratas hembra y macho tanto con sulpiride como con metoclopramida, aumentó ambas isoenzimas 5 α -R que puede conducir a un incremento de neuroesteroides 3 α , 5 α -reducidos en cerebro.

El aumento de 5 α -R inducido tanto por la metoclopramida como por el sulpiride, puede producir un incremento en los neuroesteroides 3 α , 5 α -reducidos, los cuales pueden participar posiblemente en una vía común con la PRL en la inducción y mantenimiento del comportamiento maternal y la lactancia y en la adaptación al estrés.

Nuestros resultados aportan nuevos datos sobre los efectos de la hiperprolactinemia inducida por sulpiride en la glándula prostática, incluyendo un incremento en los niveles de ARNm de ambas isoenzimas 5 α -R. El incremento de 5 α -R1 está asociado con el cáncer de próstata, y el incremento de 5 α -R2 está asociado con el cáncer de próstata y con la hiperplasia benigna de próstata. Ambas enfermedades son muy frecuentes en países desarrollados (Novelli y col., 2001).

Según los presentes resultados, el aumento de los niveles de PRL en varones de edad avanzada puede ser considerado un nuevo factor de riesgo de enfermedades prostáticas. De este modo, Yatani y colaboradores., 1987, demostraron una asociación entre niveles elevados de PRL y el cáncer de próstata en humanos.

Conclusiones

1. El sulpiride a la dosis de 40 mg/Kg/día durante 30 días produjo un aumento significativo de los niveles plasmáticos de PRL en ratas macho y hembra. El aumento con respecto a las cifras basales fue mayor en ratas macho.
2. La hiperprolactinemia inducida por sulpiride a la dosis y tiempos estudiados causó un aumento significativo de los niveles de ARNm de las isoenzimas tipo 1 y tipo 2 de la 5 α -R en corteza prefrontal de cerebro de ratas macho y hembra.
3. El incremento para ambos isoenzimas de la 5 α -R en corteza prefrontal, tras la administración de sulpiride fue mayor en ratas macho y significativamente mayor para la reductasa tipo 1 que para la tipo 2.
4. La administración de sulpiride a la dosis 40 mg/Kg/día y durante 30 no produjo modificaciones significativas de los niveles plasmáticos de testosterona en ratas macho.
5. La hiperprolactinemia inducida por sulpiride a la dosis y tiempo estudiados produjo un aumento significativo de los niveles de ARNm de las isoenzimas tipo 1 y tipo 2 de la 5 α -R en próstata de ratas macho. El incremento fue mayor para la isoenzima tipo 1.
6. La administración de metoclopramida a la dosis de 2,2 mg/Kg dos veces por semana durante 14 días, produjo un aumento

significativo en los niveles plasmáticos de PRL en ratas macho y hembra. El incremento fue similar en ratas macho y hembra.

7. La hiperprolactinemia inducida por metoclopramida a la dosis y tiempo estudiados indujo un aumento significativo en los niveles de ARNm de las isoenzimas tipo 1 y tipo 2 de la 5α -R en corteza prefrontal de ratas macho y hembra.
8. El incremento para ambas isoenzimas de la 5α -R en corteza prefrontal, tras la administración de metoclopramida fue mayor en ratas macho y mayor para la reductasa tipo 1 que para la reductasa tipo 2.
9. Los dos fármacos estudiados, inductores de Prolactina producen un aumento de los niveles de ARNm de las isoenzimas 5α -R en corteza prefrontal y próstata de rata. Este hecho debe ser tenido en cuenta, dada la importancia de dichos isoenzimas en las patologías prostáticas y psiquiátricas.

Bibliografia

- Agís-Balboa, R.C., Pinna, G., Zhubi, A., Maloku, E., Veldic, M., Costa, E., Guidotti, A., 2006. Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 103 (39), 14602-14607.
- 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.
- Akk, G., Covey, D.F., Evers, A.S., Steinbach, J.H., Zorumski, C.F., Mennerick, S., 2007. Mechanisms of neurosteroid interactions with GABA(A) receptors. *Pharmacol. Ther.* 116 (1), 35-57.
- Amenta D, Cavallotti C, Amenta F (1987) Dopamine receptors mediating the stimulation and the inhibition of adenylate cyclase in rat prostate gland. *Neurosci Lett* 77:66–70 824
Neurochem Res (2008) 33:820–825.
- Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, Russell DW. 1991. Deletion of steroid 5alpha-reductase-2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* 354: 159-161.
- 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.

- Arbogast LA, Voogt JL. Hyperprolactinemia increases and hypoprolactinemia decreases tyrosine hydroxylase messenger ribonucleic acid levels in the arcuate nuclei, but not the substantia nigra or zona incerta. *Endocrinology* 1991; 128: 997–1005.
- Bach F, Flugge G, Wuttke W (1992) GABAergic influences on the development of the sexually dimorphic nucleus in male and female rats. *Brain Res* 573:341–344.
- 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, M.L., Serra, M., Purdy, R.H., Biggio, G., 2001. Stress and neuroactive steroids. *Int. Rev. Neurobiol.* 46, 243-272.
- Barbaccia, ML Roscetti, G, Concas, A and Biggio G (1996). Neurosteroids in the brain of rats effects of CO₂ inhalation. *Eur J Pharmacol* 261, 317-320.
- Bartke, A., Smith, M. S., Michael, S. D., Peron, F. G., and Dalterio, S. (1977) Effects of experimentally-induced chronic hyperprolactinemia on testosterone and gonadotropin levels in male rats and mice. *Endocrinology* 100, 182–186.
- Baulieu EE 1991 (1991). Neurosteroids a new function in the brain *Biol Cell* 71, 3-10.
- Baulieu EE. (1997): Neurosteroids: Of the nervous system by the nervous system for the nervous system. *Recent Prog Horm Res* 52, 1-32.

- 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.
- Ben-Jonathan N, Neill MA, Arbogast LA, Peters LL, Hoefler MT. Dopamine in hypophysial portal blood: relationship to circulating prolactin in pregnant and lactating rats. *Endocrinology* 1980; 106: 690–696.
- Ben-Jonathan N, Oliver C, Weiner HJ, Mical RS, Porter JC. Dopamine in hypophysial portal plasma of the rat during the estrous cycle and throughout pregnancy. *Endocrinology* 1977; 100: 452–458.
- Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL. 1984. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J. Urology* 132: 474-479.
- Biggio G, Concas A, Mostallino MC et al (1996) Inhibition of GABAergic transmission enhances neurosteroid concentrations in the rat brain. In: Genazzi AR, Petraglia F, Purdy RH (eds) *The brain: source and target for sex steroid hormones*. Parthenon Press, New York pp 43–62.
- Biggio, G., 1983. The action of stress, β -carboline, diazepam and Ro 15-1788 on GABA receptors in the rat brain. In: G. Biggio, E. Costa, (Eds), *Benzodiazepine Recognition Site Ligands: Biochemistry and Pharmacology*. Raven Press, New York, pp. 105-17.
- Biggio, G., Barbaccia, M.L., Follesa, P., Serra, M., Purdy, R.H., Concas, A., 2000. Neurosteroids and GABA_A receptor

plasticity. In: R.W. Olsen, D.L. Martin (Eds), GABA in the Nervous System. Lippincott, New York, pp. 207-232.

Biggio, G., Concas, A., Mele, S., Corda, M.G., 1987. Changes in GABAergic transmission by zolpidem, an imidazopyridine with preferential affinity for type I benzodiazepine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 161 (2-3), 173-180.

Biggio, G., Concas, A., Mostallino, M.C., Purdy, R.H., Trabucchi, M., Barbaccia, M.L., 1996. Inhibition of GABAergic transmission enhances neurosteroid concentrations in the rat brain. In: A.R. Genazzi, F. Petraglia, R. H. Purdy (Eds), *The Brain: Source and Target for Sex Steroid Hormones*. Parthenon Press, New York, pp. 43-62.

Biggio, G., Corda, M.G., Concas, A., 1981. Rapid changes in GABA binding induced by stress in different areas of the rat brain. *Brain Res.* 229 (2), 363-369.

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.

Bridges RS, DiBiase R, Loundes DD, Doherty PC. Prolactin stimulation of maternal behavior in female rats. *Science* 1985; 227: 782-784.

- Bridges RS, Numan M, Ronsheim PM, Mann PE, Lupini CE. Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 8003–8007.
- Bridges RS, Robertson MC, Shiu RP, Sturgis JD, Henriquez BM, Mann PE. Central lactogenic regulation of maternal behavior in rats: steroid dependence, hormone specificity, and behavioral potencies of rat prolactin and rat placental lactogen I. *Endocrinology* 1997; 138: 756–763.
- Bridges RS, Robertson MC, Shiu RPC, Friesen HG, Stuer AM, Mann PE. Endocrine communication between conceptus and mother: placental lactogen stimulation of maternal behavior. *Neuroendocrinology* 1996; 64: 57–64.
- Bridges RS, Ronsheim PM. Prolactin (PRL) regulation of maternal behavior in rats: bromocriptine treatment delays and PRL promotes the rapid onset of behavior. *Endocrinology* 1990; 126:837-848.
- 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.
- 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.
- Carter DA, Lightman SL (1987) Oxytocin responses to stress in lactating and hyperprolactinemic rats. *Neuroendocrinology* 46:532–537.
- 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, 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, 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.
- 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, M.G., 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 (1), 50-56.

Concas, A., Mele, S., Biggio, G., 1987. Foot shock stress decreases chloride efflux from rat brain neurosynaptosomes. *Eur. J. Pharmacol.* 135 (3), 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.

Costello, L. C., and Franklin, R. B. (1994) Effect of prolactin on the prostate. *Prostate* 24, 162–166.

Crépin, A.,Bidaux, G.,Vanden-Abeelee, F.,Dewailly, E.,Goffin, V.,Prevorskaya, N., and Slomianny C. (2007) Prolactin stimulates prostate cell proliferation by increasing endoplasmic reticulum content due to SERCA 2b over-expression. *Biochem. J.* 401, 49–55.

De Greef WJ, Neill JD. Dopamine levels in hypophysial stalk plasma of the rat during surges of prolactin secretion induced by cervical stimulation. *Endocrinology* 1979; 105: 1093–1099.

Debeljuk L, Rozados R, Daskal H, Velez V, Mancini AM. Acute and chronic effects of sulpiride on serum prolactin and

- gonadotropin levels in castrated male rats (38581). *Proc Soc Biol Med* 1975; 148:550-552.
- Demarest KT, Riegler GD, Moore KE. Prolactin-induced activation of tuberoinfundibular dopaminergic neurons: evidence for both a rapid 'tonic' and a delayed 'induction' component. *Neuroendocrinology* 1984; 38: 467–475.
- Demarest KT, Riegler GD, Moore KE. The rapid 'tonic' and the delayed 'induction' components of the prolactin-induced activation of tuberoinfundibular dopaminergic neurons following the systemic administration of prolactin. *Neuroendocrinology* 1986; 43: 291–299.
- DeMaria JE, Lerant AA, Freeman ME. Prolactin activates all three populations of hypothalamic neuroendocrine dopaminergic neurons in ovariectomized rats. *Brain Res* 1999; 837: 236–241.
- DeWeerth C, Buitelaar J (2005) Physiological stress reactivity in human pregnancy—a review. *Neurosci Biobehav Rev* 29:295–312.
- Diorio, D., Viau, V., Meaney, M.J., 1993. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress *J. Neurosci.* 13 (9), 3839-3847.
- Doerner G (1979) Hormones and sexual differentiation of the brain. Sex hormones and behavior, Ciba Foundation Symposium 62. Elsevier, Amsterdam, pp 81–110.
- Dölher KD (1991) The pre- and postnatal influence of hormones and neurotransmitters on sexual differentiation of the mammalian hypothalamus. *Int Rev Cytol* 131:1–57.

- Dong E, Matsumoto K, Uzunova V, Sugaya I, Takahata H, Nomura H, et al. Brain 5 α -dihydroprogesterone and allopregnanolone synthesis in a mouse model of protracted social isolation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:2849-2854.
- Donner N, Bredewold R, Maloumby R et al (2007) Chronic intracerebral prolactin attenuates neuronal stress circuitries in virgin rats. *Eur J Neurosci* 25:1804–1814.
- Dörner G (1976). *Hormones and brain differentiation*. Amsterdam. Elsevier.
- Drago F, Bohus B, Gispen WH, Scapagnini U, De Wied D (1983) Prolactin-enhanced grooming behavior: interaction with ACTH. *Brain Res* 263:277–282.
- Drago F, Continella G, Conforto G, Scapagnini U (1985) Prolactin inhibits the development of stress-induced ulcers in the rat. *Life Sci* 36:191–197.
- Drago F, Pulvirenti L, Spadaro F, Pennisi G (1990) Effects of TRH and prolactin in the behavioral despair (swim) model of depression in rats. *Psychoneuroendocrinology* 15:349–356.
- 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.
- Farnsworth, W. (1988) Prolactin effect on the permeability of human benign hyperplastic prostate to testosterone. *Prostate* 12, 221–229.
- 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.
- 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.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2000; 80: 1523–1631.
- Fujikawa T, Soya H, Yoshizato H, Sakaguchi K, Doh-Ura K, Tanaka M, Nakasima K (1995) Restraint stress enhances the gene expression of prolactin receptor long form at the choroid plexus. *Endocrinology* 136:5608 –5613.

- Gibbs DM, Neill JD. Dopamine levels in hypophysial stalk blood in the rat are sufficient to inhibit prolactin secretion in vivo. *Endocrinology* 1978; 102: 1895–1900.
- 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.
- Grattan DR, Xu JJ, McLachlan MJ, Kokay IC, Bunn SJ, Hovey RC, Davey HW. Feedback regulation of PRL secretion is mediated by the transcription factor, signal transducer, and activator of transcription 5b. *Endocrinology* 2001; 142: 3935–3940.
- Grattan DR. Behavioural significance of prolactin signalling in the central nervous system during pregnancy and lactation. *Reproduction* 2002; 123: 497–506.
- 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.

Gudelsky GA, Porter JC. Release of newly synthesized dopamine into the hypophysial portal vasculature of the rat. *Endocrinology* 1979; 104: 583–587.

Guidotti A, Dong E, Matsumoto K, Pinna G, Rasmusson AM, Costa E. The socially-isolated mouse: a model to study the putative role of allopregnanolone and 5 α -dihydroprogesterone in psychiatric disorders. *Brain Res Rev* 2001; 37:110-115.

Guillamon A, Segovia S. 1997. Sex differences in the vomeronasal system. *Brain Res. Bull.* 44: 377-82.

Haefely, W.E., 1994. Allosteric modulation of the GABA_A receptor channel: A mechanism for interaction with a multitude of central nervous system functions. In: H.C. Mohler, M. Da Prada (Eds), *The Challenge of Neuropharmacology*. Editions Roche, Basel, pp. 15-39.

Hauser KF, McLusky NJ, Toran-Allerand CD. 1987. Androgen action in fetal spinal cultures: Metabolic and morphologic aspects. *Brain Res.* 406: 62-72.

Higashi, T., Takido, N., Shimada, K., 2005. Studies on neurosteroids XVII. Analysis of stress-induced changes in neurosteroid levels in rat brains using liquid chromatography-

electron capture atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Steroids* 70 (1), 1-11.

Hokfelt T, Fuxe K. Effects of prolactin and ergot alkaloids on the tubero-infundibular dopamine (DA) neurons. *Neuroendocrinology* 1972; 9: 100–122.

Holsboer F, Barden N (1996) Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr Rev* 17:187–205.

Horseman ND, Zhao WZ, Montecinosrodriguez E, Tanaka M, Nakashima K, Engle SJ, Smith F, Markoff E, Dorshkind K. Defective mammapoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *EMBO J* 1997; 16: 6926–6935.

Houston B, Chisholm GD, Habib FK. 1985. Solubilization of human prostatic 5 alpha-reductase. *J. Steroid Biochem.* 22: 461-67.

Huang, W. J., Yeh, J. Y., Kan, S. F., Chang, L. S., and Wang, P. S. (2001) Effects of hyperprolactinemia on testosterone production in rat Leydig cells. *J. Cell. Biochem.* 80, 313–320.

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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. 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. 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.

Kamberi IA, Mical RS, Porter JC. Prolactin-inhibiting activity in hypophysial stalk blood and elevation by dopamine. *Experientia* 1970; 26: 1150–1151.

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, Koppers E, Beyer C. 1998. Developmental expression and regulation of aromatase and 5 α -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 5 α -reductase-2 deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 3160-3167.
- Kincl FA, Maqueo M (1965) Prevention by progesterone of steroidinduced sterility in neonatal male and female rats. *Endocrinol* 77:859–862.
- Koch Y, Lu KH, Meites J. Biphasic effects of catecholamines on pituitary prolactin release in vitro. *Endocrinology* 1970; 87: 673–675.
- Kokay IC, Grattan DR. Expression of mRNA for prolactin receptor (long form) in dopamine and pro-opiomelanocortin neurones in the arcuate nucleus of non-pregnant and lactating rats. *J Neuroendocrinol* 2005; 17: 827–835.
- 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.
- Kramer MS, Cutler N, Feghner J, Shrivastava R, Carman J, Sramek JJ, Reines SA, Liu G, Snavelly D, Wyatt-Knowles E, Hale JJ, Mills SG, MacCoss M, Swain CJ, Harrison T, Hill RG, Hefti F, Scolnick EM, Chicchi GG, Sadowski S, Williams AR, Hewson

- L, Smith D, Carlson EJ, Hargreaves RJ, Rupniak NMJ (1998) Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science* 281:1640–1645.
- 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.
- Landgraf R, Wigger A, Holsboer F, Neumann ID (1999) Hyper-reactive hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in rats bred for high anxiety-related behavior. *J Neuroendocrinol* 11:405–407.
- Lane, K. E., Leav, I., Ziar, J., Bridges, R. S., Rand, W. M., and Ho, S. M. (1997) Suppression of testosterone and estradiol-17 β -induced dysplasia in the dorsolateral prostate of Noble rats by bromocriptine. *Carcinogenesis* 18, 1505–1510.
- 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.
- Lerant A, Freeman ME. Ovarian steroids differentially regulate the expression of prolactin receptors in neuroendocrine dopaminergic neuron populations – a double-label confocal microscopic study. *Brain Res* 1998; 802: 141–154.
- Levy s 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.
- Levy MA, Brandt M, Greway AT. 1990. Mechanistic studies with solubilized rat liver steroid 5 α -reductase. *Biochemistry* 29: 2808-2815.
- Li C, Kelly PA, Buntin JD (1995) Inhibitory effects of anti-prolactin receptor antibodies on prolactin binding in brain and prolactin-induced feeding behavior in ring doves. *Neuroendocrinology* 61:125–135.
- Liang T, Heiss CE, Ostrove S, Rasmusson GH, Cheung A. 1983. Binding of a 4-methyl-4-aza-steroid to 5 α -reductase of rat liver and prostate microsomes. *Endocrinology* 112: 1460-68.
- Liebsch G, Wotjak CT, Landgraf R, Engelmann M (1996) Septal vasopressin modulates anxiety-related behavior in rats. *Neurosci Lett* 217:101–104.
- Lightman S, Windle R, Wood S et al (2001) Peripartum plasticity within the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Prog Brain Res* 133:111–129.
- Lipton SA, Kater SB (1989) Neurotransmitter regulation of neural outgrowth, plasticity and survival. *Trends Neurosci* 12:265–270.
- 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.

Lucas BK, Ormandy CJ, Binart N, Bridges RS, Kelly PA. Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinology* 1998; 139: 4102–4107.

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.

M. Zhang 1997???

Ma FY, Anderson GM, Gunn TD, Goffin V, Grattan DR, Bunn SJ. Prolactin specifically activates STAT5b in neuroendocrine dopaminergic neurons. *Endocrinology* 2005; 146: 5112–5119.

Ma FY, Grattan DR, Goffin V, Bunn SJ. Prolactin-regulated tyrosine hydroxylase activity and messenger ribonucleic acid expression in mediobasal hypothalamic cultures: the differential role of specific protein kinases. *Endocrinology* 2005; 146: 93–102.

MacLeod RM, Fontham EH, Lehmeyer JE. Prolactin and growth hormone production as influenced by catecholamines and agents that affect brain catecholamines. *Neuroendocrinology* 1970; 6: 283–294.

MacLusky NJ, Clark CR, Shanabroug M, Naftolin F. 1987. Metabolism of androgens in the spinal cord of the rat. *Brain Res.* 422: 83-91.

MacLusky NJ, Naftolin F. 1981. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 211: 1294-1302.

- Mahendroo MS, Cala KM, Hess DL, Russel DW. 2001. Unexpected virilization in male mice lacking steroid 5alpha-reductase enzymes. *Endocrinology* 142: 4652–4662.
- Mahendroo MS, Cala KM, Landrum DP et al (1997) Fetal death in mice lacking 5alpha-Reductase type 1 caused by estrogen excess. *Mol Endocrinol* 11:917–927.
- 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, Russell DW. 1999. Male and female isoenzymes of steroid 5alpha-reductase. *Rev. Reprod.* 4: 179-183.
- Mainwaring WI. 1969. A soluble androgen receptor in the cytoplasm of rat prostate. *J. Endocrinol.* 45: 531-41.
- Majewska, M.D., 1992. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog. Neurobiol.* 38 (4), 379-395.
- Martini L. 1982. The 5alpha-reduction of testosterone in the neuroendocrine structures. Biochemical and physiological implications. *Endocrine Rev.* 3: 1-25.
- Marx CE, Stevens RD, Shampine LJ, Uzunova V, Trost WT, Butterfield MI, et al. Neuroactive steroids are altered in schizophrenia and bipolar disorder: relevance to pathophysiology and therapeutics. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31:1249-1263.

- Matsumoto A, Micevych PE, Arnold P. 1988. Androgen regulates synaptic input to motoneurons of the adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 8: 4168-4176.
- Mattson MP (1988) Neurotransmitters in the regulation of neural cytoarchitecture. *Brain Res Rev* 13:179–212.
- Mc Ewen BS (1991). Non-genomic and genomic actions of steroids on neural activity. *TNS.* 12, 141-147.
- 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.
- 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.
- 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.
- Meinhardt H. 1978. Models for the ontogenetic development of higher organisms. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 80: 47-104.

- 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, 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.
- Mellon, S.H., Griffin, L.D., Compagnone, N.A., 2001. Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 37 (1-3), 3-12.
- 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.
- Mitchell AJ (1999) The role of corticotropin releasing factor in depressive illness: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev* 22:635– 651.
- Moore CR, Price D, Gallagher TF. 1930. *Am. J. Anat.* 45: 71-107.
- Moore KE. Interactions between prolactin and dopaminergic neurons. *Biol Reprod* 1987; 36: 47–58.
- 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.

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.

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.

Neill JD (1970) Effects of "stress" on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 87:1192–1197.

Neumann ID, Toschi N, Ohl F et al (2001) Maternal defence as an emotional stressor in female rats: correlation of neuroendocrine and behavioural parameters and involvement of brain oxytocin. *Eur J Neurosci* 13:1016–1024.

Nevalainen, M. T., Valve, E. M., Ingleton, P. M., Nurmi, M., Martikainen, P. M., and Harkonen, P. L. (1997) Prolactin

- and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate. *J. Clin. Invest.* 99, 618–627.
- Noel MB, Woodside B (1993) Effects of systemic and central prolactin injections on food intake, weight gain, and estrous cyclicity in female rats. *Physiol Behav* 54:151–154.
- 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.
- Novelli, G., Margiotti, K., Sangiulo, F., and Reichardt, J. K. (2001) Pharmacogenetic of human androgens and prostate disease. *Pharmacogenomics* 2, 65–72.
- Nowakowski H, Lenz W. 1961. Genetic aspects in male hypogonadism. *Rec. Prog. Hormone Res.* 17: 53-95.
- Numan, M (1994). Maternal Behavior. In Knobil E and Neill JD (eds). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press NY pp 221-301.
- 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 (6), 2311-2322.
- Pérez-Laso C, Valencia A, Rodríguez-Zafra M et al (1994) Perinatal administration of diazepam alters sexual dimorphism in the rat accessory olfactory bulb. *Brain Res* 634:1-6.
- 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, Coscarella A, Negri-Cesi P et al (1998) 5 alpha-Reductase isozymes in the central nervous system. *Steroids* 63:246-251.
- 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.

- 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.
- Price, D. (1963) Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 12, 351–369.
- Prins, G.(1987) Prolactin influence of cytosol and nuclear androgen receptors in the ventral, dorsal and lateral lobes of the rat prostate. *Endocrinology* 120, 1457–1464.
- Purdy 1991?????.
- Purdy, R.H., Morrow, A.L., Moore, P.H.Jr., Paul, S.M., 1991. Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88 (10), 4553-4557.
- Radley, J.J., Arias, C. M., Sawchenko, P.E., 2006a. Regional Differentiation of the Medial Prefrontal Cortex in Regulating Adaptive Responses to Acute Emotional Stress. *J. Neurosci.* 26 (50), 12967-12976.

- Radley, J.J., Rocher, A.B., Miller, M., Janssen, W.G., Liston, C., Hof, P.R., McEwen, B.S., Morrison, J.H., 2006b. Repeated Stress Induces Dendritic Spine Loss in the Rat Medial Prefrontal Cortex. *Cereb. Cortex* 16 (3), 313-320.
- 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, D.G., Smoyer-Tomic, K.E., 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.
- Reiter, E.,Lardinois, S.,Klug, M.,Sente, B.,Hennuy, B.,Bruyninx, M.,Closset, J., and Hennen G. (1995) Androgen-independent effects of prolactin on the different lobes of the immature rat prostate. *Mol. Cell. Endocrinol.* 112, 113–122.
- Rosenblatt JS, Mayer AD and Siegel HI. (1985). Maternal behavior among the non primate mammals. In Alder N Paff D and Goy RW (eds).*Handbook of Behavioral Neurobiology*. Plenum Press, NY pp 229-298.
- Ruiz, E.,Ortega, E.,Mendoza, C., and Osorio, C. (1984) Effects of sulphiride on levels of FSH, LH and steroid hormones. *Rev. Esp. Fisiol.* 40, 243–248.
- Russell DW, Wilson JD 1994. Steroid 5 α -reductase: two genes/two enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 63: 25-61.
- Russell JA, Johnstone H, Douglas AJ et al (1999) Neuroendocrine stress mechanisms regulating ACTH and oxytocin in pregnancy.

- In: Yamashita H (ed) Control mechanisms of stress and emotions: neuroendocrine-based studies. Elsevier, Amsterdam, pp 33–51.
- Sánchez P, Torres JM, Gavete P, et al (2007) Effects of swim stress on mRNA and protein levels of steroid 5 α -reductase isozymes in prefrontal cortex of adult male rats. *Neurochem Int* (in press).
- Sánchez P, Torres JM, Ortega E (2005) Effects of dihydrotestosterone on brain mRNA levels of steroid 5 α -Reductase isozymes in early postnatal life of rat. *Neurochem Res* 30:577–581.
- Sánchez P, Torres JM, Vílchez P, Del Moral RG, Ortega E. Effects of sulpiride on prolactin and mRNA levels of steroid 5 α -reductase isozymes in adult rat brain. *Neurochem Res* 2008; 33:820-825.
- Sánchez, P., Torres, J.M., Del Moral, R.G., Ortega, E., 2006. Effects of testosterone on brain mRNA levels of steroid 5 α -Reductase isozymes in early postnatal life of rat. *Neurochem. Int.* 49 (6), 626-630.
- Sánchez, P., Torres, J.M., Ortega, E., 2005. Effects of dihydrotestosterone on brain mRNA levels of steroid 5 α -Reductase isozymes in early postnatal life of rat. *Neurochem. Res.* 30 (4), 577-581.
- Sargent NS, Habib FK. 1991. Partial purification of human prostatic 5 α -reductase (3-oxo-5 α -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.

- Schlein PA, Zarrow MX, Denenberg VH (1974) The role of prolactin in the depressed or “buffered” adrenocorticosteroid response of the rat. *J Endocrinol* 62:93–99.
- 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.
- 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.
- Seggie JA, Brown GM (1975) Stress response patterns of plasma corticosterone, prolactin, and growth hormone in the rat, following handling or exposure to novel environment. *Can J Physiol Pharmacol* 53:629–637.
- Segovia S, Del Cerro MCR, Ortega E et al (1996) Role of GABAA receptor in the organization of brain and behavioral sex differences. *NeuroReport* 7:2553–2557.
- Segovia S, Pérez-Laso C, Rodríguez-Zafra M et al (1991) Early postnatal diazepam exposure alters sex differences in the rat brain. *Brain Res Bull* 26:899–907.
- Siiteri PK, Wilson JD. 1974. J. Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. *Clin. Endocrinol. Metab.* 38: 113-25.

- Smith, C., Assimos, D., Lee, C., and Grayhack, J. (1985) Metabolic action of prolactin in regressing prostate: independent of androgen action. *Prostate* 6, 49–59.
- 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.
- Śluczanska-Głabowska S, Laszczyńska M, Głabowski W, Wylot M. Morphology of the epithelial cells and expression of androgen receptor in rat prostate dorsal lobe in experimental hyperprolactinemia. *Folia Histochem Cytobiol* 2006; 44:25-30.
- Sullivan, R.M., Gratton, A., 1999. Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats. *J. Neurosci.* 19 (7), 2834-40.
- Takani K, Kawashima S. 1993. Culture of rat brain preoptic area neurons: effects of sex steroids. *Int. J. Dev. Neurosci.* 11: 63-70.
- Tanaka, M., 2007. Heat stress standard for hot work environments in Japan. *Ind. Health* 45 (1), 85-90.
- Tangbanluekal, L., and Robinette, C. L. (1993) Prolactin mediates estradiol-induced inflammation in the lateral prostate of Wistar rats. *Endocrinology* 132, 2407–2416.

- Taylor MF, Bhattacharyya AK, Collins DC. 1995. Inhibition of rat steroid 5alpha-reductase (isozyme 1) by suramin. *Steroids* 60: 452-456.
- 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 (2003a) Alcohol intoxication increases allopregnanolone levels in female adolescent humans. *Neuropsychopharmacology* 28(6):1207–1209.
- Torres JM, Ortega E (2003b) Differential regulation of steroid 5alpha-Reductase isozymes expression by androgens in the adult rat brain. *FASEB J* 17:1428–1433.

- Torres JM, Ortega E (2004a) Alcohol intoxication increases allopregnanolone levels in male adolescent humans. *Psychopharmacology* 172:352–355.
- Torres JM, Ortega E. 2003d. Precise quantitation of 5 α -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. 2004b. Precise quantitation of steroid 5 α -reductase type 1 mRNA levels by RT-PCR in female rat liver. *Endocr. Res.* 30(2): 149-57.
- Torres JM, Ruiz E, Ortega E (2001) Effects of CRH and ACTH administration on plasma and brain neurosteroid levels. *Neurochem Res* 26:555–558.
- Torres JM, Sanchez P, Ortega E. 2004. Quantitation of mRNA levels of steroid 5 α -reductase isoenzymes in the rat brain by "one-step" RT-PCR and capillary electrophoresis. *J. Neurosci. Methods.* 136(1): 105-10.
- Torres, J. M., Ruíz, E., and Ortega, E. (2003c) Development of a quantitative RT-PCR method to study 5 α -reductase mRNA isozymes in rat prostate in different androgen status. *Prostate* 56, 74–79.
- Torres, J.M., Ortega, E., 2006. Steroid 5 α -Reductase isozymes in the adult female rat brain: central role of dihydrotestosterone. *J. Mol. Endocrinol.* 36 (2), 239-245.

- Toufexis DJ, Walker CD (1996) Noradrenergic facilitation of the adrenocorticotropin response to stress is absent during lactation in the rat. *Brain Res* 737:71–77.
- Trapman J, Klaassen P, Kuiper GGJM, et al. 1988. Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 241-248.
- Uzunova V, Sheline Y, Davis JM, Rasmusson A, Uzunov DP, Costa E, et al. Increase in the cerebrospinal fluid content of neurosteroids in patients with unipolar major depression who are receiving fluoxetine or fluvoxamine. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:3239-3244.
- 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.
- Van Broekhoven F, Verkes RJ. Neurosteroids in depression: a review. *Psychopharmacology* 2003; 165:97-110.
- Van Coppenolle, F., Le Bourhis, X., Carpentier, F., Delaby, G., Cousse, H., Raynaud, J. P., Dupouy, J. P., and Prevarskaya, N. (2000) Pharmacological effects of the lipidosterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon) on rat prostate hyperplasia induced by hyperprolactinemia: comparison with finasteride. *Prostate* 43, 49–58.
- Van Coppenolle, F., Skryma, R., Ouadid-Ahidouch, H., Slomianny, C., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Dewailly, E., Humez, S., Crepin,

- A.,Gourdou, I.,Djjane, J.,Bonnal, J. L.,Mauroy, B., and Prevarskaya, N. (2004) Prolactin stimulates cell proliferation through a long form of prolactin receptor and K⁺ channel activation. *Biochem. J.* 377, 569–578.
- Van Coppenolle, F.,Slomianny, C.,Carpentier, F.,Le Bourhis, X.,Ahidouch, A.,Croix, D.,Legrand, G.,Dewailly, E.,Fournier, S.,Cousse, H.,Authie, D.,Raynaud, J. P.,Beauvillain, J. C.,Dupouy, J. P., and Prevarskaya, N. (2001) Effects of hyperprolactinemia on rat prostate growth: evidence of androgeno-dependence. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, 120–129.
- 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.
- Wahlestedt C, Merlo-Pich E, Koob GF, Yee F, Heilig M (1993) Modulation of anxiety and neuropeptide Y-Y1 receptors by antisense oligodeoxynucleotides. *Science* 259:528 –531.
- 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.
- 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.

- Wennbo, H., Kindblom, J., Isaksson, O. G. P., and Tornell, J. (1997) Transgenic mice overexpressing the prolactin gene develop dramatic enlargement of the prostate gland. *Endocrinology* 138, 4410–4415.
- Wilson JD, Griffin JE, Russell DW. 1993. Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Endocr. Rev.* 14: 577-593.
- 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.
- Woo, J.M., Postolache, T.T., 2008. The impact of work environment on mood disorders and suicide: Evidence and implications. *Int. J. Disabil Hum. Dev.* 7 (2), 185-200.
- Yamanaka, H., Kirdani, R. Y., Saroff, J., Murphy, G. P., and Sandberg, A. A. (1975) Effects of testosterone and prolactin on rat prostatic weight, 5 α -reductase, and arginase. *Am. J. Physiol.* 229, 1102–1119.
- Yatani, R., Kusano, I., Shiraishi, T., Miura, S., Takanari, H., and Liu, P. I. (1987) Elevated prolactin level in prostates with latent carcinoma. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 17, 178–182.
- Yen, SSC and Jaffe RB. (1999). Neuroendocrine mechanisms cells and system. In *Reproductive endocrinology*. Saunder Company.
- 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 ,Imperato-McGinley J. 2002. Male pseudohermaphroditism due to 5alpha-reductase-2 deficiency. In: Sciarra, J.J. (Ed.), Gynecology and Obstetrics. Lippincott Williams & Wilkins.

Zhu YS, Katz MD, Imperato-McGinley J. 1998. Natural potent androgens: lessons from human genetic models. *Baillieres. Clin. Endocrinol. Metab.* 12: 83-113.

