

t 6/5

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 8-7-2002
ENTRADA NUM. 2313.

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



BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 61338627x
Nº Copia 15597830

UNIVERSIDAD DE GRANADA
2 - JUN 2002
COMISION DE INVESTIGACIONES

TESIS DOCTORAL

EFFECTOS DE TESTOSTERONA Y DIHIDROTESTOSTERONA  
SOBRE LOS NIVELES DE mRNA DE LOS ISOENZIMAS  
TIPO 1 Y TIPO 2 DE LA 5 $\alpha$ -REDUCTASA

Jesús M. Torres de Pinedo

2002



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

---

D. José Antonio Gómez Capilla, Catedrático y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada,

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada "EFECTOS DE TESTOSTERONA Y DIHIDROTESTOSTERONA SOBRE LOS NIVELES DE mRNA DE LOS ISOENZIMAS TIPO 1 Y TIPO 2 DE LA 5 $\alpha$ -REDUCTASA", ha sido realizada por D. Jesús M. Torres de Pinedo, bajo la inmediata dirección y supervisión de D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Esperanza Ortega Sánchez y que el Departamento ha dado su conformidad para que ésta sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

En Granada, a 1 de Julio de 2002

A handwritten signature in black ink, consisting of several vertical and diagonal strokes.

Fdo.: D. José Antonio Gómez Capilla  
Director del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

---

D.<sup>ª</sup> M.<sup>ª</sup> Esperanza Ortega Sánchez, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada,

CERTIFICA:

Que los trabajos que se exponen en la memoria de Tesis Doctoral "EFECTOS DE TESTOSTERONA Y DIHIDROTESTOSTERONA SOBRE LOS NIVELES DE mRNA DE LOS ISOENZIMAS TIPO 1 Y TIPO 2 DE LA 5 $\alpha$ -REDUCTASA", han sido realizados por D. Jesús M. Torres de Pinedo en el Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada, correspondiendo fielmente a los resultados obtenidos. La presente memoria ha sido revisada por mi, 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 1 de Julio de 2002

Fdo.: D.<sup>ª</sup> M.<sup>ª</sup> Esperanza Ortega Sánchez

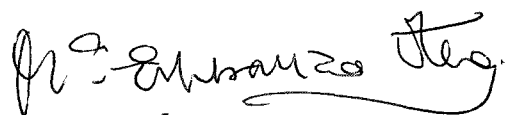
**EFFECTOS DE LA TESTOSTERONA Y DIHIDROTESTOSTERONA SOBRE  
LOS NIVELES DE mRNA DE LOS ISOENZIMAS TIPO 1 Y TIPO 2 DE LA  
5 $\alpha$ -REDUCTASA**

Memoria que presenta el licenciado en Bioquímica

Jesús M. Torres de Pinedo para optar al grado de Doctor.



Fdo.: Jesús M. Torres de Pinedo



V<sup>o</sup>B<sup>o</sup>. DIRECTORA DEL TRABAJO.

Dra. M<sup>a</sup> Esperanza Ortega Sánchez

Profesora Titular de la

Universidad de Granada

La presente memoria ha sido realizada en su totalidad en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada. Ha sido financiada con cargo al Proyecto de Investigación PM97-0177 de la DGES.

## **AGRADECIMIENTOS.**

De la manera más sincera, quiero expresar mi agradecimiento a la directora de este trabajo, M<sup>ª</sup> Esperanza Ortega Sánchez, quién primero me honro con su confianza y después me brindó sus conocimientos y apoyo, y sin la cual no hubiera sido posible este trabajo.

También quisiera agradecer su ayuda y amistad a la Dra. M<sup>ª</sup> Estrella Ruiz Requena y a las auxiliares del Servicio de radioinmunoanálisis del Hospital Universitario San Cecilio de Granada por su ayuda en la determinaciones hormonales.

Al Dr. D. Enrique García Olivares, por ser para mi como un segundo padre. Gracias por haber depositado en mi tu confianza y por haberme enseñado tantas cosas dentro y fuera del laboratorio.

Al Dr. José Antonio Gómez Capilla, quiero agradecer sus conocimientos, su confianza y su desinteresada colaboración en el trabajo experimental de esta tesis al poner a mi disposición su laboratorio y su excelente tecnología.

A D.<sup>ª</sup> Adelaida Antúnez y D. Mariano Arauzo por su ayuda en las cuestiones técnicas, pero sobre todo por su apoyo en los momentos difíciles, y a mis compañeras de la sección de Cromatografía, Carolina, Esther y Sonia, gracias por convertir la rutina del trabajo diario en algo estupendo.

También quiero agradecer su ayuda y amistad a todos mis compañeros de los departamentos de Bioquímica y Fisiología de la Facultad de Medicina,

Miguel, Maria Kimatrai, Raquel, Pablo, Gema, M<sup>a</sup> José, Inés, Belinda, Juan, Maribel, Virginia, Juan Manuel, Rose Mary, Laura, Pepi, Huda, Elena, Carmen, M<sup>a</sup> Carmen y si me olvido de alguien, mi más sincera disculpa. Gracias a todos y cada uno de vosotros por ser como sois.

Mi agradecimiento más sincero a José Antonio Galindo por la sabiduría que encierra y a Araceli Quintana por toda la ayuda que me ha prestado en este tiempo, por su complicidad y por su amistad.

A las enfermeras y auxiliares de la sección de Bioquímica e Inmunología del Hospital Universitario San Cecilio de Granada.

A todos los miembros de los departamentos de Bioquímica y Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Por último, un recuerdo emocionado a los que, por uno u otro motivo ya no se encuentran entre nosotros.



En memoria de mi padre.

A mi madre y hermanos.



*ÍNDICE*

<b>I. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
· Perspectiva histórica.	4
· Expresión de cDNA de 5 $\alpha$ -Reductasa.	7
· Propiedades bioquímicas de la 5 $\alpha$ -Reductasa.	8
· Genética de la 5 $\alpha$ -Reductasa.	13
· Regulación de la 5 $\alpha$ -Reductasa.	19
· Farmacología de la 5 $\alpha$ -Reductasa.	33
· Cuantificación de la cantidad de un mensajero mediante RT-PCR	39
· Resumen.	48
<b>II. OBJETIVOS.</b>	<b>56</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	
<b>57</b>	
· Material fungible e inventariable.	59
· Animales de experimentación.	60
· Análisis hormonal.	62
· Extracción de RNA y cuantificación.	63
· Diseño racional de oligonucleótidos para PCR.	67
· Construcción de estándar internos para RT-PCR competitiva.	69
· Métodos de RT-PCR.	76
- RT-PCR semicuantitativa.	76
- "Two sep" RT-PCR competitiva.	79
- "One step" RT-PCR competitiva.	82
· Técnicas electroforéticas.	85

<b>III. RESULTADOS.</b>	<b>87</b>
· Determinación de los niveles de mRNA de $5\alpha$ -R1 y $5\alpha$ -R2 en próstata de rata mediante RT-PCR semicuantitativa con distintos fluoróforos.	96
· Determinación de los niveles de mRNA de $5\alpha$ -R1 y $5\alpha$ -R2 en próstata de rata mediante RT-PCR semicuantitativa con el fluoróforo 6-FAM.	105
· Determinación de los niveles de mRNA de $5\alpha$ -R1 y hígado de rata mediante RT-PCR semicuantitativa con el fluoróforo 6-FAM.	108
· Construcción de estándar internos para RT-PCR competitiva.	111
· Cuantificación de los niveles de mRNA de $5\alpha$ -R1 y $5\alpha$ -R2 en próstata de rata mediante "two step" RT-PCR competitiva.	114
· Cuantificación de los niveles de mRNA de $5\alpha$ -R1 en hígado de rata mediante "two step" RT-PCR competitiva.	133

· Cuantificación de los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en corteza prefrontal de cerebro de rata mediante "one step" RT-PCR competitiva.	143
· Cuantificación de neuroesteroides en plasma y cerebro de rata tras la administración de hormonas de CRH y ACTH.	158
<b>IV. DISCUSIÓN.</b>	160
<b>V. CONCLUSIONES.</b>	185
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA.</b>	189

*I. INTRODUCCIÓN*

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

En algunos órganos diana, entre ellos la próstata, la T se convierte en DHT por acción del enzima  $5\alpha$ -Reductasa ( $5\alpha$ -R) (EC 1.3.99.5) (Russel y Wilson, 1994).

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

La DHT es un andrógeno mucho más potente que la T en algunos sistemas biológicos, siendo el andrógeno responsable del desarrollo, maduración y funcionalidad de la próstata. Ambos T y DHT se unen al receptor de andrógenos, aunque DHT se une con mucha más afinidad, precisamente la diferencia en la acción de estos dos andrógenos se ha explicado en base a la

cinética del receptor. (Steers, 2001). Recientes estudios han demostrado diferencias en la vía de transducción de señales dependiendo de qué hormona T o DHT se une al receptor de andrógenos. En este sentido, cuando se comparan los efectos de T y DHT en ratas castradas se detectan mecanismos "upregulation" y "down regulation" en la expresión de varios genes dependiendo de la hormona administrada (Avila y col., 1998).

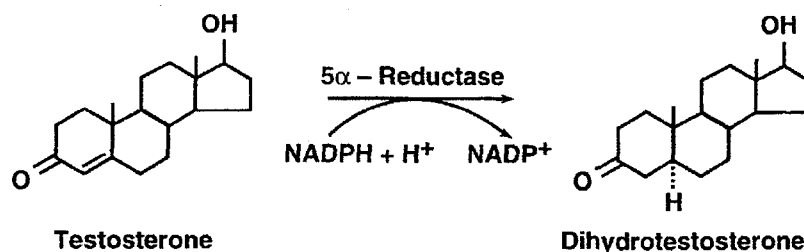
DHT no solo juega un papel crucial en el desarrollo y maduración fisiológico de la próstata sino que también es el andrógeno principal responsable de patologías prostáticas como la hipertrofia benigna de próstata (HBP) (Kaplan, 2001) y podría estar relacionada también con la progresión de ciertos adenocarcinomas prostáticos (Jaffe y col., 2000.)

En el sistema nervioso central también se conoce la existencia de la vía de la  $5\alpha$ -reducción, probablemente implicada en la síntesis de neuroesteroides (Melcangi y col., 1998). Los neuroesteroides son sintetizados en el SNC a partir del colesterol u otros precursores esteroideos. Estos neuroesteroides desempeñan funciones importantes en el cerebro adulto y podrían tener un papel en el desarrollo del cerebro y en la diferenciación sexual del SNC.

### *Perspectiva histórica:*

La primera hormona androgénica aislada y caracterizada fue la androsterona, un esteroide  $5\alpha$ -reducido de 19 átomos de C., aislado por Butenant en 1931 a partir de 25.000 litros de orina de hombres adultos. Este esteroide es un andrógeno potente y se consideró la hormona masculina por

excelencia hasta que en 1935, Erns Laquer y colaboradores demostraron que el andrógeno más potente secretado por los testículos es, en efecto la testosterona, un esteroide de 19 átomos de C. que presenta un doble enlace en posición 4,5. Además, una gran variedad de sustratos con estructura 3-oxo- $\Delta^{4,5}$  en el anillo A son reducidos por el enzima  $5\alpha$ -Reductasa, como el caso de la T que se transforma en DHT.



El enzima  $5\alpha$ -Reductasa fue caracterizado inicialmente en los años 50 utilizando láminas de hígado, en base a su capacidad de convertir deoxicorticosterona en metabolitos  $5\alpha$ -reducidos (Schneider y col., 1951; Schneider y col., 1952). Trabajos posteriores de Tomkins y otros autores demostraron que este enzima estaba presente en la fracción particulada; utilizaba nucleótidos de piridina reducidos (NADPH) como cofactor y, era capaz de metabolizar una gran variedad de sustratos esteroideos (Forchielli y col., 1952; Tomkins y col., 1957; McGuire y col., 1960; Bondy, 1981). Sin embargo, en estos primeros estudios no estaba claro si la  $5\alpha$ -reducción de esteroides era llevada a cabo por una sola enzima o por un complejo multienzimático.



La  $5\alpha$ -reducción de sustratos esteroideos hace que sus grupos 3-oxo sean susceptibles a la reducción por  $3\alpha$  y  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas y a la sulfatación y glucuronización. Estas últimas modificaciones tienen la función de reducir la afinidad de los esteroideos por proteínas de unión, haciéndolos más hidrofílicos y facilitando su excreción (Bondy, 1981). Por esta razón se pensó que la  $5\alpha$ -Reductasa participaría en el catabolismo de los esteroideos. Sin embargo, trabajos llevados a cabo en los años 60 pusieron de manifiesto que la  $5\alpha$ -Reductasa no cataliza la reacción inversa (deshidrogenación de esteroideos reducidos) (Wilson, 1975), dando a entender que la  $5\alpha$ -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  $5\alpha$ -reducción de la T es una etapa crucial en la acción androgénica y por ello centramos nuestra atención en el enzima  $5\alpha$ -Reductasa.

A partir de dos líneas de investigación posteriores se obtuvieron evidencias definitivas del papel clave de la  $5\alpha$ -Reductasa. Primero, estudios del desarrollo demostraron que la actividad de la  $5\alpha$ -Reductasa en embriones de mamíferos era mayor en próstata y genitales externos antes de su virilización pero muy baja en estructuras como los conductos de Wolff (Wilson y col., 1971; Wilson, 1972; Siiteri y col., 1974), sugiriendo que esta reacción es crucial para la formación del fenotipo normal masculino durante la embriogénesis. Segundo, estudios genéticos demostraron que un desorden atípico en la diferenciación sexual masculina, originariamente denominado hipospadias pseudovaginal perineoescrotal (Nowakowski y col., 1961), estaba causado por mutaciones en la  $5\alpha$ -Reductasa (Walsh y col., 1974; Imperato-McGinley y col.,

1974). Esta enfermedad causada por el defecto en la conversión de T en DHT se denominó con posterioridad *deficiencia en 5 $\alpha$ -Reductasa*.

#### *Expresión de cDNA de 5 $\alpha$ -Reductasa:*

Los primeros intentos de purificación de la 5 $\alpha$ -Reductasa fueron infructuosos debido a la extremada insolubilidad de la proteína. Entre 1971 y 1991 se llevaron a cabo múltiples intentos de purificación de la 5 $\alpha$ -Reductasa a partir de muestras humanas y de rata (Frederiksen y col., 1971; Moore y col., 1972; Moore y col., 1974; Liang y col., 1983; Houston y col., 1985; Ichihara y col., 1987; Enderle-Schmitt y col., 1989; Levy y col., 1990; Sargent y col., 1991). En estos estudios se utilizaron con éxito varios detergentes para solubilizar el enzima a partir de membranas celulares, sin embargo la actividad enzimática se perdía rápidamente.

Este "callejón sin salida" en la purificación de la 5 $\alpha$ -Reductasa se resolvió en 1989 cuando se utilizó con éxito la técnica de *expression cloning* en oocitos de *Xenopus laevis* (Noma y col., 1986) para aislar un cDNA de hígado de rata que codificaba para un isoenzima de la 5 $\alpha$ -Reductasa (Andersson y col., 1989). Este cDNA que codifica para la 5 $\alpha$ -Reductasa hepática se utilizó para aislar un homólogo humano del cDNA de rata mediante *screening* en una librería de cDNA de próstata (Andersson y col., 1990). Cuando se comparó la actividad enzimática de la 5 $\alpha$ -Reductasa hepática con la actividad 5 $\alpha$ -Reductasa presente en próstata humana se observaron algunas discrepancias (Jenkins 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 actividad 5 $\alpha$ -Reductasa en próstata. Segundo, la actividad 5 $\alpha$ -Reductasa en hígado presenta un pH óptimo alcalino a diferencia del pH ácido óptimo de actividad en próstata. Tercero, cuando se aisló y analizó el gen que codifica para el cDNA de hígado en individuos con deficiencia en 5 $\alpha$ -Reductasa, no se observaron mutaciones en la región codificante. Todo ello sugiere la existencia de un segundo gen de la 5 $\alpha$ -Reductasa.

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

### ***PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LA 5 $\alpha$ -REDUCTASA:***

#### ***Estructura proteica:***

La estructura primaria de ambos isoenzimas de la 5 $\alpha$ -Reductasa, tanto en rata como en humanos, se determinó a partir de sus respectivos cDNA. Son proteínas hidrofóbicas compuestas por entre 254 y 260 aminoácidos, con pesos moleculares estimados entre 28 y 29 KDa. Aproximadamente un 37% de los residuos presentan cadenas laterales que normalmente se encuentran en el interior hidrofóbico de proteínas globulares (Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Val) (Fletterik y col., 1985). Estos residuos hidrofóbicos se encuentran distribuidos

a lo largo de toda la secuencia de la proteína. Estas características estructurales sugieren que los isoenzimas de la 5 $\alpha$ -Reductasa son proteínas intrínsecas de membrana profundamente embebidas en la bicapa lipídica, y ello explica la necesidad del uso de detergentes para solubilizar el enzima en los primeros intentos de purificación. El contenido en aminoácidos hidrofóbicos podría además explicar el extraño comportamiento de movilidad electroforética que presentan los isoenzimas de la 5 $\alpha$ -Reductasa en SDS-PAGE. En este tipo de geles los isoenzimas migran con pesos moleculares entre 21 y 27 KDa., en lugar de los 28-29 KDa. que se estimaron a partir de la secuencia de cDNA (Andersson y col., 1989; Thigpen y col., 1993a; Thigpen y col., 1993 b).

Existe un 60% de identidad entre la secuencia de la 5 $\alpha$ -Reductasa tipo 1 en humano y en rata, mientras que para la 5 $\alpha$ -Reductasa tipo 2 la identidad entre ambas secuencias alcanza el 77%. Comparando entre sí las dos isoenzimas encontramos un 47% de identidad, lo cual indica que ambas isoenzimas son homólogas. Algunas secuencias de aminoácidos son idénticas en todas las isoformas de la 5 $\alpha$ -Reductasa, y se han empleado con éxito oligonucleótidos contruidos a partir de estas secuencias en el clonaje de cDNA de 5 $\alpha$ -Reductasa mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Andersson y col., 1991).

*pH óptimo de actividad:*

Los isoenzimas tipo 1 de la 5 $\alpha$ -Reductasa presentan un amplio rango de pH óptimo que alcanza valores entre 6 y 8.5 (Andersson y col., 1990;

Normington y col., 1992), mientras que los isoenzimas tipo 2 presentan un estrecho intervalo de pH óptimo alrededor de 5 (Andersson y col., 1991; Normington y col., 1992). Esta característica distintiva de ambos isoenzimas referente al pH óptimo de actividad, ácido o básico, puede ser de utilidad para asignar una u otra actividad 5 $\alpha$ -Reductasa a un isoenzima en particular en un determinado tejido humano o de rata.

El pH óptimo de actividad de un enzima normalmente es consecuencia del estado iónico de los aminoácidos cargados del centro activo (Fersht, 1985). Este hecho sugiere que sólo un pequeño número de aminoácidos es el responsable de determinar el pH óptimo de actividad de un enzima.

#### *Constantes cinéticas:*

Estudios de transfección con el isoenzima tipo 1 de rata o humano produce un enzima en el lisado celular con afinidades en el rango micromolar ( $K_{m_{ap}}=1-5 \mu M$ ) para sustratos como testosterona, androstendiona y progesterona (Andersson y col., 1990). Para el isoenzima tipo 2, la  $K_m$  aparente para la T, medida a pH 5.0, está en el rango submicromolar (0.1-10  $\mu M$ ) (Andersson y col., 1991; Thigpen y col., 1993). La  $K_m$  aparente para el cofactor de la reacción (NADPH) determinada a  $V_{max}$  está en el rango de 3-10  $\mu M$  para ambos isoenzimas (Thigpen y col., 1993).

Es importante señalar que los valores de  $K_m$  aparente para el isoenzima tipo 2 a pH 7.0 en lisados celulares, células permeabilizadas y células intactas, se encuentran en el rango de 4-50 nM (Thigpen y col., 1993; Faller y col.,

1993). Esta observación relativa a la mayor afinidad del isoenzima tipo 2 por sustratos esteroideos a pH neutro en lisados celulares sugiere que este isoenzima actúa con mayor eficiencia a pH neutro en el interior celular. El isoenzima tipo 2 de la  $5\alpha$ -Reductasa presenta un pH óptimo neutro en su estado nativo. Métodos físicos de lisis celular producen un isoenzima tipo 2 con actividad a pH 5.0. Este cambio en los requerimientos de pH refleja un cambio conformacional en el isoenzima.

#### *Purificación y expresión:*

Se han llevado a cabo varios intentos de purificación de uno o ambos isoenzimas de la  $5\alpha$ -Reductasa a partir de tejidos humanos y de rata. Estos intentos no han tenido éxito debido a la aparente labilidad del enzima. Además, la mayoría de los tejidos y líneas celulares, especialmente los humanos, presentan un bajo nivel de expresión de ambos isoenzimas.

Los experimentos de expresión y clonaje descritos con anterioridad permiten un mayor nivel de expresión en células heterólogas y por tanto una mejor purificación de los isoenzimas de la  $5\alpha$ -Reductasa.

#### *Localización subcelular y renovación intracelular:*

Ambos isoenzimas de la  $5\alpha$ -Reductasa humana presentan una vida media prolongada (20-30 horas), la cual no es alterada por la presencia de concentraciones del orden de micromolar de inhibidores 4-azaesteroides. Uno de estos inhibidores (Finasteride) se une de forma irreversible a ambos

isoenzimas de la  $5\alpha$ -Reductasa. Estos resultados sugieren que el enzima no está regulado a nivel de degradación proteica. Tampoco se han encontrado evidencias de modificaciones postraduccionales de los isoenzimas (fosforilación, acilación isoprenilación).

Estudios de inmunofluorescencia indirecta indican que ambos isoenzimas de la  $5\alpha$ -Reductasa humana se localizan en el retículo endoplasmático (Thigpen y col., 1993), probablemente embebidos en la bicapa lipídica de este orgánulo. La localización subcelular de la  $5\alpha$ -Reductasa varía en función del tejido que se utilice como fuente del enzima. Así, la actividad enzimática sedimenta con la fracción nuclear en células de próstata tanto en rata como en humanos (Frederiksen y col., 1971; Moore y col., 1972; Hudson, 1981), mientras que en células de hígado la actividad  $5\alpha$ -Reductasa sedimenta con la fracción de retículo endoplasmático (Moore y col., 1972). La diferente localización subcelular de la  $5\alpha$ -Reductasa en hígado y próstata refleja una diferencia en la proliferación del retículo endoplasmático, ya que este orgánulo se extiende de forma continua desde la membrana nuclear hacia el exterior. Esta diferencia podría tener además 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 de la actividad enzimática con los receptores de andrógenos nucleares.

## GENÉTICA DE LA 5 $\alpha$ -REDUCTASA:

### *Estructura génica:*

Los genes que codifican para ambos isoenzimas de la 5 $\alpha$ -Reductasa humana contienen cinco exones separados por cuatro intrones (Jenkins y col., 1991; Thigpen y col., 1992a; Labrie y col., 1992). La posición de los intrones es prácticamente idéntica en ambos genes, lo cual sugiere que ambos genes proceden de la duplicación de un gen primordial. Aunque ambos genes comparten la misma estructura, se localizan en cromosomas distintos tanto en la especie humana como en ratón (Jenkins y col., 1991; Thigpen y col., 1992b). El gen que codifica el isoenzima tipo 1 en humanos (SRD5A1) se localiza en la región distal del brazo corto del cromosoma 5, banda p15, mientras que el gen que codifica para el isoenzima tipo 2 (SRD5A2) se localiza en la banda p23 del cromosoma 2 (Thigpen y col., 1992b). En el brazo largo del cromosoma X (banda q24) mapea un pseudogen procesado (SRD5AP1) que aparentemente deriva de un fragmento de mRNA del gen tipo 1. Este pseudogen contiene un codon sin sentido en la posición correspondiente al aminoácido 147 y por tanto se piensa que no codifica para una proteína funcional (Jenkins y col., 1991). Se desconoce si a partir de este pseudogen se transcribe algún mRNA.

Se han identificado tres polimorfismos en la secuencia de DNA del gen SRD5A1 en humanos:

- Exón 1: Arg 30, CGG versus CGC
- Exón 2: Ala 116, GCA versus GCG



- Exón 3: Thr 160, ACG versus ACA

La frecuencia alélica en la que se presenta cada uno de estos 3 polimorfismos es cercana al 50% (Jenkins y col., 1991).

En la secuencia del gen SRD5A2 en humanos se han identificado otros tres polimorfismos.

- En un segmento del exón 5 correspondiente a la región 3' del mRNA (Davis y col., 1993) se presenta un número variable de repeticiones del dinucleótido AT. La forma alélica más frecuente (96%) no posee repeticiones del dinucleótido AT, sin embargo, existen dos variantes alélicas que contienen 9 y 18 copias respectivamente de AT. Se desconoce si la presencia o ausencia de repeticiones en la región 3' del mRNA altera su estabilidad o traducción.

- Val 89 (GTA) versus Leu 89 (CTA). No se han determinado las consecuencias bioquímicas de esta alteración.

- En los primeros nucleótidos del intrón 1 del gen se presenta una variación C versus T.

#### ***Deficiencia en 5 $\alpha$ -Reductasa tipo 2 en humanos:***

El desarrollo del fenotipo masculino en mamíferos puede dividirse en tres etapas sucesivas en el tiempo, comenzando con el establecimiento del sexo cromosómico en el momento de la fecundación. A continuación, el sexo gonadal viene determinado por la expresión de un gen regulador clave localizado en el cromosoma Y, gen determinante del testículo (SRY), (Sinclair y col., 1990). La expresión de este gen transforma una gónada bipotencial en un testículo fetal capaz de sintetizar testosterona y otras hormonas requeridas

para la tercera fase del desarrollo sexual, el establecimiento del sexo fenotípico masculino. En esta última etapa, la testosterona actúa en concierto con el producto del gen del receptor de andrógenos para iniciar la formación de las estructuras reproductoras internas masculinas como son el epidídimo, la vesícula seminal y los vasos deferentes. En el tracto urogenital del embrión, la testosterona se convierte en dihidrotestosterona, la cual se une también al receptor de andrógenos para llevar a cabo la diferenciación de los genitales externos (pene y escroto) y la próstata.

Las bases de este complejo proceso del desarrollo se han deducido a partir de experimentación animal (Jost, 1970) y del estudio de mutaciones naturales que ocurren en genes clave que alteran el fenotipo masculino. Por ejemplo, individuos XY que presentan mutaciones que afectan a la actividad del receptor de andrógenos tendrán testículos y sintetizarán T y DHT pero serán incapaces de desarrollar estructuras reproductoras masculinas internas y externas (Griffin y col., 1994). Para el caso de la deficiencia en  $5\alpha$ -Reductasa, la incapacidad de sintetizar DHT conduce a alteraciones en el desarrollo de los genitales externos y de la próstata pero no afecta a otras etapas del desarrollo (Wilson y col., 1993).

Como se mencionó anteriormente, una serie de estudios sugerían que mutaciones en el gen de la  $5\alpha$ -Reductasa tipo 2 eran responsables de la deficiencia en  $5\alpha$ -Reductasa (Moore y col., 1976; Jenkins y col., 1992). Esta hipótesis se confirmó con el clonaje de un cDNA tipo 2 y una serie de experimentos de Southern blotting en los cuales se observó que existía una gran delección en los genes de un grupo de individuos que presentaban la

deficiencia en 5 $\alpha$ -Reductasa (Andersson y col., 1991). Desde entonces se han identificado 29 mutaciones en el gen tipo 2 y se han llevado a cabo numerosos estudios a nivel clínico, genético y bioquímico.

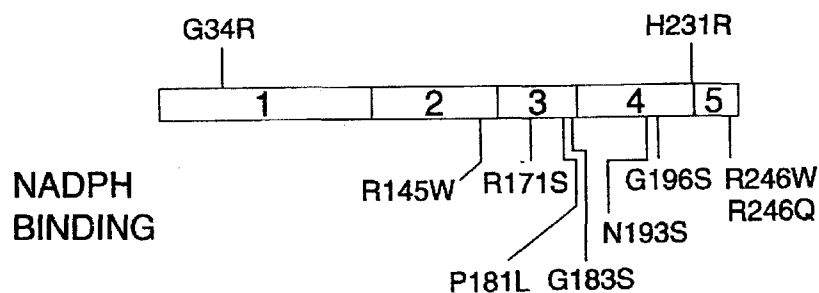
### *Mutaciones en el gen de la 5 $\alpha$ -Reductasa tipo 2:*

Las mutaciones en el gen de la 5 $\alpha$ -Reductasa tipo 2 se han identificado utilizando métodos estándar de análisis genético (Andersson y col., 1991; Thigpen y col., 1992b,c). Estos estudios revelan dos deleciones, dos mutaciones sin sentido, un defecto de splicing y 24 sustituciones. Estas mutaciones se han detectado en 27 familias sin relación alguna, y en ellas aproximadamente el 65% de los individuos afectados son homocigotos y el 35% restante heterocigotos. Teniendo en cuenta la rareza de la enfermedad, la abundancia de heterocigotos sugiere que la frecuencia de portadores en la población es relativamente alta. En algunos casos podemos encontrar la misma mutación en individuos con un ancestro común, por ejemplo la mutación 359  $\Delta$ TC se encuentra en varias familias procedentes de Malta.

En la mayoría de los individuos afectados, la enfermedad se hereda de forma autosómica recesiva (Thigpen y col., 1992a). Sin embargo, en cuatro casos bien documentados se ha encontrado una sola mutación (Wilson y col. 1993). Esto induce a pensar en la posibilidad de que ciertas mutaciones sean dominantes. Hasta ahora no se ha encontrado una correlación entre la severidad de la manifestación de la enfermedad y una mutación particular de la 5 $\alpha$ -Reductasa heredada por un individuo afectado.

***Dominios funcionales:***

Las consecuencias bioquímicas de 22 de las 24 mutaciones por sustitución se pueden deducir a partir de estudios de mutagénesis dirigida y transfección en cultivos de células de mamíferos. Todas las mutaciones afectan a la  $V_{max}$  del enzima. Doce de estas mutaciones resultan en una proteína en la que no se detecta actividad enzimática, mientras que las otras diez mutaciones resultan en una proteína con una actividad enzimática muy disminuida. Este último grupo de mutaciones se puede dividir en dos clases: Aquellas que afectan la capacidad del enzima de unir el sustrato Testosterona y aquellas en las que disminuye la afinidad por el cofactor NADPH. Las mutaciones que afectan la capacidad del enzima de unir T (aumentando la  $K_m$ ) mapean en los dos extremos del gen para el isoenzima tipo 2, mientras que aquellas que afectan la capacidad de unir NADPH se distribuyen a lo largo de la segunda mitad de la secuencia del gen (ver figura). La localización de las distintas mutaciones sugiere una organización no lineal de los aminoácidos que componen los dos dominios funcionales del enzima. El hecho de que las mutaciones afecten, bien la capacidad de unión de sustrato o bien la de unión de cofactor, sugiere que los aminoácidos determinantes de estos dos dominios pueden ser distintos.

TESTOSTERONE  
BINDING

Los isoenzimas de la 5 $\alpha$ -Reductasa utilizan únicamente NADPH como cofactor, y su mecanismo de acción sería mediante la inserción del átomo de H en posición 4 del anillo de la nicotinamida (grupo reactivo) dentro de la configuración en 5 $\alpha$  de la T (Wilson, 1975; Björkhem y col., 1990). A pesar de esta dependencia con el NADPH, las secuencias de aminoácidos de los isoenzimas humano y de rata no contienen secuencias consenso ni residuos específicos para la unión de NADPH como las identificadas en otras reductasas (Perham y col., 1991). Esta ausencia sugiere que el dominio de unión del cofactor en la 5 $\alpha$ -Reductasa podría representar una nueva estructura, hipótesis que estaría de acuerdo con la diversidad y localización de mutaciones que afectan a la unión del NADPH en el isoenzima tipo 2.

Estudios cinéticos de la 5 $\alpha$ -Reductasa tipo 1 de rata sugieren un mecanismo de catálisis ordenado bi-bi en el que el NADPH es el primer sustrato en unirse y el NADP<sup>+</sup> el último producto en salir del enzima (Levy y col., 1990). Numerosos estudios indican que el NADPH estabiliza la actividad en extractos de tejidos. Así, enzimas mutantes en los que se ve afectada la afinidad por NADPH presentan una vida media más corta. Estos resultados

corroboran la conclusión de que las mutaciones que afectan al sitio de unión de NADPH alteran directamente este dominio en el enzima.

Un hecho sorprendente derivado de estos estudios es que todas las mutaciones que actúan disminuyen la actividad enzimática excepto una (R145W) también provocan un cambio en el pH óptimo de actividad en el isoenzima tipo 2. Las mutaciones que afectan tanto a la unión del sustrato como del cofactor se traducen en un pH óptimo más alcalino, sugiriendo que el efecto que producen es a nivel de conformación mas que a nivel de catálisis. Parece como si un residuo fundamental para la conformación (presumiblemente con un  $pK_a$  ácido) o un par de iones requeridos para la catálisis se vieran afectados por sustituciones precisas en el isoenzima tipo 2. Sin embargo, se necesitan estudios estructurales y de mutagénesis para descubrir las bases bioquímicas de estas observaciones.

#### **REGULACIÓN DE LA 5 $\alpha$ -REDUCTASA:**

La regulación de la expresión de la 5 $\alpha$ -Reductasa ha sido estudiada en varios sistemas biológicos. La interpretación de los datos obtenidos en los primeros estudios es complicada debido a la existencia de dos isoenzimas, ya que en la mayoría de los casos se asumía la medida de una sola actividad 5 $\alpha$ -Reductasa. Sirviéndonos de estos estudios iniciales como guía y utilizando los mismos sistemas experimentales, se ha vuelto a estudiar la regulación de la 5 $\alpha$ -Reductasa usando sondas génicas y anticuerpos específicos para cada isoenzima. Los estudios más recientes se han centrado en establecer qué células y en qué tejidos se expresan los distintos isoenzimas de la 5 $\alpha$ -

Reductasa y el impacto de la manipulación hormonal en la expresión de dichos isoenzimas. En estos estudios se incluye el intento de determinar por qué existen dos isoenzimas que desempeñan un único papel en el metabolismo de las hormonas esteroideas y de los andrógenos.

*Distribución tisular de los isoenzimas de la 5 $\alpha$ -Reductasa:*

Estudios de distribución tisular se han llevado a cabo en rata (Normington y col., 1992), humanos (Thigpen y col., 1993) y ratón. En muchos tejidos se detecta al menos uno de los dos isoenzimas de la 5 $\alpha$ -Reductasa, existiendo un patrón de expresión único en cada especie estudiada (Tabla).

Especie	Tejido	5 $\alpha$ -Reductasa 1	5 $\alpha$ -Reductasa 2
Rata	Próstata	+	++
	Epidídimo	+	+++
	Ves. seminal, vasos deferentes,		
	testículos	+	+
	Hígado	+++	-
	Adrenales, cerebro, colon,		
	intestino, riñón	++	-
	Corazón	-	-
	Pulmón	++	-
Músculo, bazo, estómago, ovario	+	-	

Humano	Próstata, epidídimo, ves. seminales	-	++
	Testículo, ovario, adrenal, cerebro, riñón	-	-
	Hígado	+	+

En hígado de rata existe también un dimorfismo sexual en la expresión de la 5 $\alpha$ -Reductasa y consiste en que las hembras expresan de 10 a 20 veces más el isoenzima tipo 1 que los machos (Andersson y col., 1989; Farkash y col., 1988; Normington y col., 1992; Yates y col., 1958). Se piensa que esta expresión sexualmente dimórfica se debe a diferencias en el patrón de secreción de hormona de crecimiento (GH) entre machos y hembras (Gustafsson y col., 1983; Bullock y col., 1991).

En próstata de rata se detectan ambos isoenzimas siendo predominante el tipo 2. En humano se creía que el isoenzima tipo 2 era exclusivo, sin embargo actualmente se ha demostrado también la existencia del isoenzima tipo 1 aunque en mucha menor proporción. Estas diferencias ponen de manifiesto que lo encontrado en una especie no puede en ocasiones ser extrapolado a otras especies. Además, estas diferencias dificultan la asignación de distintas funciones fisiológicas a uno o ambos isoenzimas.

En rata, los niveles de mRNA para un isoenzima concreto se correlacionan bien con los niveles de proteína detectados mediante inmunoblotting y medida de la actividad enzimática (Normington y col., 1992).



Por el contrario, algunos tejidos humanos expresan el mRNA para el isoenzima tipo 1 pero no se detecta proteína (Jenkins y col., 1992; Thigpen y col., 1993b). No se sabe con exactitud si esto es indicativo de la existencia de mecanismos de regulación a nivel de síntesis de proteína, o que el mRNA adopte una estructura inusual que impida la traducción o bien que la proteína sea inestable. Las secuencias que no se traducen en la región 5' del mRNA son diferentes en los distintos isoenzimas de la 5 $\alpha$ -Reductasa y podría ser este el motivo de que estos mRNA se traduzcan a proteína con diferente eficiencia.

#### *Expresión específica de la 5 $\alpha$ -Reductasa en distintos tipos celulares:*

Estudios de hibridación in situ de mRNA (Berman y col., 1993) e inmunohistoquímica han revelado patrones de expresión célula-específicos y gradientes de expresión de los distintos isoenzimas de la 5 $\alpha$ -Reductasa dentro de los tejidos. Un ejemplo de especialización celular lo encontramos en la próstata, en la cual las células del epitelio basal expresan el isoenzima tipo 1 mientras que las células estromales expresan el isoenzima tipo 2 (Berman y col., 1993). Las células del epitelio basal son un tipo de células de la próstata menos diferenciadas que se piensa sean precursoras de otras células más abundantes y diferenciadas, las células del epitelio del lumen (Verhagen y col., 1988). Las células del epitelio basal permanecen en animales castrados y retienen cierta capacidad proliferativa, mientras que las células del epitelio del lumen mueren después de la castración. En las células del epitelio basal, el isoenzima tipo 1 de la 5 $\alpha$ -Reductasa es responsable de sintetizar DHT que, actuando a través de un mecanismo autocrino es capaz de estimular la diferenciación de estas células hacia células del lumen. Además. La DHT puede

actuar mediante mecanismos paracrinós para estabilizar o estimular la división del epitelio del lumen dependiente de hormonas androgénicas (Berman y col., 1993).

La expresión del isoenzima tipo 2 en las células estromales de la próstata está de acuerdo con el papel fisiológico desempeñado por estas células en el desarrollo de esta glándula. Algunos estudios indican que las células del estroma proporcionan una señal requerida por las células del epitelio para diferenciarse en una próstata funcional (Cunha y col., 1987). Esta señal procede en parte de la DHT como demuestra el hecho de que los individuos que presentan deficiencia en  $5\alpha$ -Reductasa no son capaces de desarrollar una próstata normal (Imperato-McGinley y col., 1992b). Esto sugiere que la señal que ejerce la DHT en la diferenciación lo hace mayoritariamente en el estroma y no en el epitelio (Berman y col., 1993). La acción combinada de la DHT junto con factores de crecimiento o la activación de factores de crecimiento por acción de la DHT puede producir el desarrollo de la glándula prostática. En este sentido, algunos autores han demostrado que la administración de DHT incrementa los niveles de IGF-1 e IGFBP-3 en próstata de rata (Huynh y col., 2001; Boyle y col., 2000)

En contraste con el patrón de expresión presente en la próstata de rata en la que cada tipo celular expresa un tipo de isoenzima, las células epiteliales del epidídimo de rata expresan ambas isoenzimas (Berman y col., 1993). Estas células exhiben además un gradiente de expresión en el que las células epiteliales próximas al testículo expresan una gran cantidad de actividad enzimática y mRNA, mientras que las células distales al testículo presentan

bajos niveles de expresión. Este gradiente de expresión fue estudiado por primera vez por Viger y Robaire (Viger y col., 1991;1992) para la  $5\alpha$ -Reductasa tipo 1 y se demostró posteriormente para el isoenzima tipo 2 (Normington y col., 1992). Se desconoce el significado biológico de este gradiente de expresión de los distintos isoenzimas. Podría simplemente reflejar proximidad al testículo como fuente secretora de andrógenos o bien podría estar jugando un papel en la maduración del esperma.

En los hepatocitos se detecta también un gradiente de expresión del isoenzima tipo 1, encontrando niveles muy altos de actividad enzimática y mRNA del isoenzima tipo 1 en los hepatocitos que circundan el tracto portal (vena porta, arteria hepática y conducto biliar), y esta expresión disminuye hasta niveles casi indetectables en los hepatocitos que rodean las venas centrales (Berman y col., 1993). Este patrón de expresión refleja la maduración de los hepatocitos y es similar al patrón de expresión de algunos de los enzimas que forman parte del complejo citocromo P-450. Una vez más se pone de manifiesto que el significado fisiológico de este gradiente podría ser importante para el catabolismo de esteroides o la maduración de los hepatocitos en el hígado.

En humanos, los patrones de expresión específica en los distintos tipos celulares son similares a aquellos encontrados en rata, excepto en epidídimo y en hígado, donde no están presentes estos gradientes de expresión de  $5\alpha$ -Reductasa. Además, y como ya se mencionó con anterioridad, no se ha demostrado la expresión del isoenzima tipo 1 en próstata humana. Esta ausencia podría estar asociada bien a un problema de sensibilidad, es decir, los

métodos de detección disponibles no permitirían detectar los bajos niveles de expresión de este isoenzima en la próstata, o bien a una diferencia funcional ya que la próstata humana está compuesta por una proporción mucho mayor de células estromales que la próstata de rata. El elevado nivel de expresión del isoenzima tipo 2 en el estroma de la próstata humana proporcionaría la cantidad requerida de DHT para el crecimiento y mantenimiento de la próstata.

### *Regulación androgénica:*

La expresión de la  $5\alpha$ -Reductasa está regulada por andrógenos en un gran número de tejidos y especies. El tejido mejor estudiado ha sido la próstata de rata, un tejido dependiente de andrógenos con unas propiedades que la convierten en un tejido ideal desde el punto de vista de su objeto de estudio. La castración de ratas macho causa una regresión en el tamaño y peso de la próstata (Moore y col., 1930). La regresión está causada por la 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  $5\alpha$ -Reductasa (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  $5\alpha$ -Reductasa también conducía a la regresión de la próstata, y este efecto podía revertirse mediante la administración de DHT (Brooks y col., 1981).

La inducción de la actividad enzimática 5 $\alpha$ -Reductasa en la próstata de ratas castradas tras la administración de T va acompañada de un incremento importante en los niveles de mRNA de ambos isoenzimas de la 5 $\alpha$ -Reductasa (Andersson y col., 1989; Normington y col., 1992). Sin embargo, se desconoce si este incremento en los niveles del mRNA es consecuencia de la estabilización de dicho mRNA o si es debido al incremento en la transcripción de los genes de la 5 $\alpha$ -Reductasa. No obstante, la castración y posterior administración de andrógenos no cambia los patrones de expresión específicos de cada tipo celular de ambos isoenzimas (Berman y col., 1993).

De forma sorprendente, la DHT se presenta como el andrógeno activo que aumenta los niveles de mRNA y la actividad enzimática 5 $\alpha$ -Reductasa en la próstata (George y col., 1991). Esta conclusión se apoya en experimentos en los cuales se administraron inhibidores de la 5 $\alpha$ -Reductasa junto con T a animales castrados. Como era de esperar, este régimen bloqueó el crecimiento de la glándula prostática pero también suprimió la inducción de la actividad enzimática 5 $\alpha$ -Reductasa y atenuó de forma severa la inducción del mRNA (Normington y col., 1992; George y col., 1991).

El hecho de que DHT incremente los niveles de mRNA resulta en una situación inusual en la cual el producto del enzima es el responsable de la regulación de la expresión de los genes que codifican el enzima. Este mecanismo llamado regulación *feed-forward* (Normington y col., 1992) es exactamente opuesto al mecanismo usual de regulación *feedback* en la cual el producto del enzima regula de forma negativa la expresión del gen que codifica al enzima.

El mecanismo de regulación *feed-forward* o autorregulación, se ha descrito para varios genes que juegan papeles cruciales en el desarrollo, por ejemplo en *Drosophila fushi tarazu* (Ish-Horowicz y col., 1989) y en genes *Sex-lethal* (Bell y col., 1991) los cuales están involucrados en patrones de formación y en la determinación sexual en el embrión; el gen *cI* del bacteriofago lambda (Ptashne, 1986) el cual está involucrado en la decisión de lisis vs. lisogenia; los genes *CLN1* y *CLN2* de levadura (Cross y col., 1991) involucrados en el control del ciclo celular, y algunos factores de transcripción como *GATA-1* (Tsai y col., 1991) el cual está implicado en la diferenciación de ciertas células hematopoyéticas. El nexo común entre todos estos genes es que la célula requiere una gran cantidad del producto del gen en un corto periodo de tiempo, ya sea para activar un determinado cambio en el desarrollo o, como en el caso de la 5 $\alpha$ -Reductasa, sintetizar una hormona que actúa como un morfogen.

El hecho de que la DHT sea un andrógeno más eficaz en la inducción de la expresión del gen de la 5 $\alpha$ -Reductasa en la regeneración de la próstata que la T, podría tener implicaciones importantes en la acción del receptor de andrógenos. Así, parece ser que existen tres clases de genes respuesta para andrógenos: aquellos que ejercen su acción a través del receptor de andrógenos acoplado a T, aquellos que lo hacen a través del receptor de andrógenos acoplados a DHT y aquellos que responden independientemente del andrógeno acoplado al receptor. Está todavía por determinar si estas diferencias en la respuesta ligando-receptor son debidas a la secuencia del gen dependiente de andrógenos que se vaya a transcribir o bien si son debidas a la interacción del receptor con diferentes proteínas adaptadoras. De cualquier

forma, esta hipótesis podría explicar la existencia de dos andrógenos con distintas funciones fisiológicas.

#### *Ontogenia de la 5 $\alpha$ -Reductasa:*

La expresión de la 5 $\alpha$ -Reductasa durante el desarrollo ha sido ampliamente estudiada en humanos. Los primeros estudios indicaban que la expresión de 5 $\alpha$ -Reductasa en el seno urogenital y en el tubérculo urogenital del tracto urogenital embrionario precedía la formación de los genitales externos y de la próstata (Siiteri y col., 1974), sugiriendo una relación causa-efecto de la DHT en la diferenciación sexual fenotípica. Experimentos de inmunoblotting indicaban que la mayoría de la actividad enzimática 5 $\alpha$ -Reductasa en el embrión temprano podía atribuirse al isoenzima tipo 2 (Thigpen y col., 1993). A partir de estos resultados y teniendo en cuenta el fenotipo que aparece en la deficiencia para 5 $\alpha$ -Reductasa tipo 2, parece ser que es el isoenzima tipo 2 el responsable de la virilización embrionaria de los genitales externos y de la próstata en el hombre. Por el contrario, en el desarrollo embrionario temprano de la rata se expresan ambos isoenzimas de la 5 $\alpha$ -Reductasa, sugiriendo que en esta especie ambos isoenzimas podrían estar jugando un papel en la diferenciación sexual masculina.

El isoenzima tipo 1 se encuentra expresado en el momento del nacimiento tanto en hígado como en la piel (Thigpen y col., 1993). La expresión en hígado persiste durante toda la vida, mientras que la expresión en la piel disminuye a partir del segundo o tercer año de vida a niveles indetectables. Después de la pubertad el isoenzima tipo 1 es detectable de nuevo en la piel y continua

presente en estos tejidos durante el resto de la vida adulta. En el cuero cabelludo de los adultos, la mayoría de los niveles de  $5\alpha$ -Reductasa tipo 1 se localiza en la glándula sebácea. También aumenta la expresión de  $5\alpha$ -Reductasa tipo 2 en hígado y piel en el momento del nacimiento, y como ocurre con el isoenzima tipo 1, dicha expresión permanece en el hígado. La expresión del isoenzima tipo 2 en la piel disminuye hasta su desaparición a partir del segundo o tercer año de vida, y no parece restablecerse después de la pubertad. La expresión del isoenzima tipo 2 en los tejidos reproductores accesorios del varón como son la próstata, epidídimo y vesículas seminales, se mantiene durante toda la vida (Thigpen y col., 1993b).

El incremento en la expresión de  $5\alpha$ -Reductasa tipo 1 en la piel después de la pubertad y su continua presencia en el hígado, podría explicar una característica clínica curiosa en individuos que presentan deficiencia en  $5\alpha$ -Reductasa. En la mayoría de los afectados con esta enfermedad, su virilización varía a lo largo de la pubertad, siendo detectable DHT aunque en baja concentración, incluidos aquellos individuos que son incapaces de sintetizar un enzima tipo 2 funcional (Wilson y col., 1993). Ya que el hígado y la piel constituyen una gran proporción de la masa corporal (25% aprox.), y ya que estos dos órganos expresan una cantidad sustancial del isoenzima tipo 1, parece razonable pensar que esta virilización que se observa sea debida a la síntesis de DHT por el isoenzima tipo 1. Si esta hipótesis es cierta, la DHT puede actuar como una verdadera hormona circulante así como un mediador autocrino o paracrino de la acción androgénica.



Los patrones de expresión temporal de los isoenzimas de la 5 $\alpha$ -Reductasa en humanos plantea algunos aspectos importantes. Se desconocen los mecanismos de aumento y descenso de los niveles isoenzimáticos, así como el papel que este fenómeno juega en algunos desórdenes relacionados con la DHT como el hirsutismo, el acné o la calvicie. Los hombres que carecen de 5 $\alpha$ -Reductasa tipo 2 parecen presentar una menor caída del cabello, sugiriendo un papel importante de este isoenzima en la caída del cabello. Sin embargo, esta hipótesis no está de acuerdo con el hecho de que el isoenzima tipo 1 (que es normal en la deficiencia en 5 $\alpha$ -Reductasa) es el isoenzima predominante en el cuero cabelludo de hombres (y también mujeres) adultos. Parece como si la expresión de un isoenzima pudiera estar influenciando la expresión del otro en tejidos que expresen ambos tipos de isoenzimas. No obstante, están por demostrar estas interacciones binarias entre isoenzimas. Por último, debe existir un control hormonal de la expresión de ambos isoenzimas que permita una integración entre la síntesis de andrógenos con otros sistemas endocrinos. La elucidación de este control será de gran interés en el futuro.

#### *5 $\alpha$ -Reducción de otras hormonas esteroideas:*

Prácticamente todas las hormonas esteroideas con una estructura  $\Delta^{4,5}$ , 3-oxo, incluyendo glucocorticoides, progestágenos, mineralcorticoides y andrógenos, pueden ser reducidos en 5 $\alpha$  en homogenados de tejido, y pueden ser excretados al menos en parte, como metabolitos 5 $\alpha$ -Reducidos. Los trabajos de Tomkins y otros autores (Tomkins, 1957; McGuire y col., 1960a; McGuire y col., 1960b) sugerían de una forma indirecta que la 5 $\alpha$ -Reducción de cada uno de estos tipos de compuestos esteroideos era llevada a

cabo por otro enzima distinto de la  $5\alpha$ -Reductasa, pero posteriores evidencias genéticas Imperato-McGinley y col., 1974) y enzimológicas (Fisher y col., 1978) indicaron que era un único enzima el que tenía la capacidad de reducir en  $5\alpha$  la mayoría, si no todas las hormonas esteroideas.

Además, el hecho de que se encuentre dificultada la excreción de todos los metabolitos  $5\alpha$ -Reducidos en individuos que presentan deficiencia en  $5\alpha$ -Reductasa, suponía una evidencia clara de que el isoenzima tipo 2 presenta una amplia capacidad enzimática, y que los progestágenos progesterona y  $20\alpha$ -hidroxi-preg-4-en-3-ona se presentan como los mejores sustratos endógenos para el enzima (Fisher y col., 1978). Esta hipótesis se confirmó en estudios con las formas expresadas de la  $5\alpha$ -Reductasa tipo 1 y tipo 2, presentando cada una de ellas la capacidad de reducir en  $5\alpha$  una gran variedad de hormonas esteroideas (Andersson y col., 1990; Normington y col., 1992; Thigpen y col., 1993).

No está totalmente claro si la  $5\alpha$ -Reducción de otras hormonas esteroideas distintas a los andrógenos juega un papel fisiológico importante en la acción hormonal o si constituye solo un paso en el intercambio metabólico. La  $5\alpha$ -Dihidroprogesterona es la hormona principal en la circulación tanto de las mujeres gestantes (Milewich y col., 1975) como de las mujeres con ciclos normales (Milewich y col., 1977); por ello, se ha sugerido un papel fisiológico específico de la  $5\alpha$ -dihidroprogesterona en el control *feedback* de la secreción de gonadotropinas en la rata (Putnam-Roberts y col., 1992). El  $5\alpha$ -Dihidrocortisol está presente en el humor acuso del ojo, es sintetizado en el cristalino y podría jugar un papel en la regulación de la formación del humor

acuoso del ojo (Weinstein y col., 1991). La  $5\alpha$ -Dihidroaldosterona es un potente agente antinatriurético con algunos efectos fisiológicos diferentes a la aldosterona (Morris y col., 1987; Morris y col., 1989); su síntesis en el riñón (McDermott y col., 1983) se ve aumentada mediante restricciones en la ingesta de sodio (Gorsline y col., 1988). En resumen, la vía de la  $5\alpha$ -Reducción puede ser de especial importancia tanto en el metabolismo como en la acción de hormonas esteroideas de distintas clases.

En el sistema nervioso central también se conoce la existencia de la vía de la  $5\alpha$ -reducción (Melcangi y col., 1998). Los neuroesteroides son metabolitos  $3\alpha,5\alpha$ -reducidos sintetizados en el SNC a partir del colesterol u otros precursores esteroideos. Estos neuroesteroides desempeñan funciones importantes en el cerebro adulto y podrían tener un papel en el desarrollo del cerebro y en la diferenciación sexual del SNC.

En el cerebro, algunos neuroesteroides actúan directamente sobre receptores de membrana para neurotransmisores, por ejemplo receptores de acetilcolina y sobre todo de ácido gamma-aminobutírico (GABA) y están implicados en el mecanismo de neurotransmisión. El receptor tipo A del ácido gamma amino butírico ( $GABA_A$ -R) es un complejo receptor ligado al canal de  $Cl^-$ , responsable de la inhibición presináptica. El  $GABA_A$ -R permite el flujo selectivo de iones de  $Cl^-$ , regulando así la excitabilidad neuronal.

Los neurosteroides pueden participar en la diferenciación sexual del SNC ya que potencian la actividad de GABA modulando alostéricamente el receptor

de GABA<sub>A</sub>. Los neuroesteroides más importantes son los metabolitos 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ -reducidos de la progesterona (PROG) y la corticoesterona.

### **FARMACOLOGÍA DE LA 5 $\alpha$ -REDUCTASA:**

Con el reconocimiento de que la 5 $\alpha$ -Reductasa y la DHT juegan papeles importantes en la acción de los andrógenos surge la idea de que inhibidores del enzima podrían tener valor terapéutico (Wilson, 1972). Las situaciones clínicas en las que la aplicación de inhibidores del enzima podría tener utilidad terapéutica surgen con la demostración de la actividad 5 $\alpha$ -Reductasa en la piel y en próstata, junto con la caracterización de la deficiencia en 5 $\alpha$ -Reductasa (Walsh y col., 1974; Imperato-McGinley y col., 1974; Gloyna y col., 1969; Gloyna y col., 1970; Siiteri y col., 1979; Voigt, 1970). Así, la ausencia de una próstata normal en varones que presentan esta enfermedad y la demostración de que la DHT es el andrógeno activo en la próstata humana en todas las épocas de la vida sugieren que inhibidores de la 5 $\alpha$ -Reductasa podrían ser de utilidad en el tratamiento de la hipertrofia benigna de próstata (BPH). Este síndrome se caracteriza por una marcada obstrucción urinaria y se presenta en la mayoría de los varones por encima de los 55 años de edad (Walsh, 1992). Los hombres con deficiencia en 5 $\alpha$ -Reductasa presentan niveles inferiores de calvicie y apenas presentan acné, sugiriendo que los inhibidores podrían ser útiles en el tratamiento de estas afecciones comunes. El hirsutismo (anormal crecimiento de pelo en la cara y cuerpo de las mujeres) está mediado también por la DHT y, por último, al menos los estadios tempranos de algunos cánceres de próstata son andrógeno-dependientes (Stamey y col., 1992) y están asociados a alteraciones del gen SRD5A2 (Latil y col., 2001; Sibata, 2001).

El enzima  $5\alpha$ -Reductasa no es inhibido por el producto de la reacción; así, los primeros inhibidores que se desarrollaron consistían en esteroides análogos estructurales a la T, y que en muchos casos eran sustratos del enzima por si solos (Voigt y col., 1973; Hsia y col., 1974). Las posibilidades terapéuticas de la aplicación de inhibidores de la  $5\alpha$ -Reductasa no pasó desapercibida para la mayoría de las compañías farmacéuticas en los años 70, y condujeron al desarrollo de algunos inhibidores potentes de la actividad  $5\alpha$ -Reductasa. Los factores que definitivamente impulsaron el desarrollo de estos inhibidores fueron, la observación de ambas isoenzimas de la  $5\alpha$ -Reductasa en humanos, a finales de los años 80 (Andersson y col., 1990; Andersson y col., 1991), el hecho de que ambas isoenzimas de la  $5\alpha$ -Reductasa contribuyen a los niveles de DHT en suero (Wilson y col., 1993; Thigpen y col., 1993), la demostración de que muchos inhibidores exhiben selectividad por uno u otro isoenzima (Harris y col., 1992; Hirsch y col., 1993) y por último, la aprobación del inhibidor *Finasteride* en el tratamiento de la BPH (Gormley y col., 1992).

Además de sus efectos terapéuticos, estas drogas sirven como potentes herramientas para elucidar la biología de la  $5\alpha$ -Reductasa y el papel de la DHT en la acción de los andrógenos.

#### *Inhibidores de naturaleza esteroidea:*

La mayor clase de inhibidores de la  $5\alpha$ -Reductasa descrita hasta la fecha son derivados esteroideos. De estos, los más estudiados han sido los 4-azaesteroides como el 4-MA y el Finasteride. El compuesto 4-MA fue descubierto por Brooks y col. (Brooks y col., 1981) que demostró que esta

droga inhibe la actividad enzimática  $5\alpha$ -Reductasa en próstata de rata. El inhibidor 4-MA presenta una baja afinidad por el receptor de andrógenos y por ello no era de esperar que produjese efectos antiandrogénicos indeseables como impotencia, defectos en el crecimiento muscular o ginecomastia (Liang y col., 1984). Sin embargo, posteriormente se demostró que esta droga era también un inhibidor de otros enzimas del metabolismo de esteroides como el enzima  $3\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (Brandt y col., 1989) y que causaba hepatotoxicidad.

Posteriormente, Rasmusson y col. llevaron a cabo nuevos estudios de estructura-actividad que condujeron al desarrollo del inhibidor Finasteride (Rasmusson y col., 1984; Rasmusson y col., 1986), el cual difiere con el 4-MA en por la presencia de un doble enlace en el anillo A, la ausencia de una sustitución metilo en posición 4 y la presencia de un grupo t-butil amido en posición 17. El Finasteride es un potente inhibidor de la actividad  $5\alpha$ -Reductasa en próstata humana y de rata (Liang y col., 1985) y presenta un mecanismo de inhibición muy interesante.

Frye y col. (1993) sintetizaron una serie de compuesto 6-azaesteroides, algunos de los cuales son potentes inhibidores de ambos isoenzimas de la  $5\alpha$ -Reductasa en humanos (Ej. GI157669X). Una característica importante de estos compuestos es la presencia de un enlace  $\Delta^{4,5}$  en el anillo A, el cual mimetiza fielmente los sustratos esteroideos naturales de la  $5\alpha$ -Reductasa.

Recientemente se ha obtenido un extracto lipo-esteroideo de la planta *Serenoa repens* que parece ser un inhibidor de los isoenzimas tipo 1 y tipo 2 de

la  $5\alpha$ -R y que también podría ser efectivo en el tratamiento de la HBP (Bayne y col., 1999; Di Silverio y col., 1998; Boyle y col., 2000).

### *Inhibidores no esteroideos:*

Se han descrito algunos inhibidores no esteroideos de la  $5\alpha$ -Reductasa, como el ONO-3805. Este compuesto descubierto en 1988 es un potente inhibidor de la actividad  $5\alpha$ -Reductasa en próstata de rata (Nakai y col., 1988), aunque también inhibe la actividad  $5\alpha$ -Reductasa en humanos.

Una segunda clase de inhibidores no esteroideos son las benzoquinolinonas como el LY191704. Esta serie de compuestos tricíclicos se aisló como inhibidores selectivos del isoenzima tipo 1 de la  $5\alpha$ -Reductasa en humanos (Hirsch y col., 1993; Jones y col., 1993). Comparten características estructurales con los compuestos 4-azaesteroides, incluyendo la presencia de un anillo heterocíclico con grupos nitrógeno y 3-oxo, pero sin embargo carecen del cuarto anillo característico de los esteroides. El hecho de que tres clases de inhibidores de la  $5\alpha$ -Reductasa (4-azaesteroides, 6-azaesteroides y benzoquinolinonas) contengan anillos con heterociclos del nitrógeno podría explicar por qué la riboflavina es un inhibidor débil de la  $5\alpha$ -Reductasa (Nakayama y col., 1990).

Los ácidos grasos polinsaturados (PUFA) son también inhibidores moderadamente potentes de la actividad  $5\alpha$ -Reductasa (Liang y col., 1992). Por ejemplo, el ácido linoleico (9,12- $C_{18:2}$ ) inhibe la actividad de ambos isoenzimas de la  $5\alpha$ -Reductasa en rata y humanos a concentraciones entre 0.3 y 5  $\mu$ M.

Como se describió con anterioridad, la  $5\alpha$ -Reductasa es un enzima unido a membrana y cuyo único requerimiento para su actividad parece ser el ambiente de lípidos de la membrana. Se llevaron a cabo con éxito los intentos de solubilizar la proteína con detergentes iónicos y no iónicos; sin embargo, los resultados obtenidos en cromatografía revelaban una rápida pérdida de la actividad enzimática. La adición de fosfolípidos para solubilizar las preparaciones enzimáticas resultaban en una estimulación de la actividad (Ichihara y col., 1987; Sargent y col., 1991; Cooke y col., 1985), sugiriendo de nuevo un papel de los lípidos en la modulación de la actividad enzimática. Por tanto, la inhibición de la actividad  $5\alpha$ -Reductasa por los PUFA refleja otra forma de modulación.

#### *Selectividad isoenzimática de los inhibidores:*

Para caracterizar los inhibidores descritos anteriormente surgieron varias observaciones interesantes acerca de la posible existencia de isoenzimas de la  $5\alpha$ -Reductasa. Por ejemplo, existe una marcada especie-especificidad en la habilidad que presentan ciertos esteroides para inhibir la actividad enzimática  $5\alpha$ -Reductasa prostática (Liang y col., 1985; Levy y col., 1991). Además, se observó que un inhibidor mostraba una diferente habilidad de inhibir la actividad  $5\alpha$ -Reductasa en próstata de rata dependiendo de la edad del animal (Martini y col., 1986). En el pasado resultaba difícil la interpretación de estos y otros estudios debido al diferente pH óptimo de actividad de cada isoenzima junto con el hecho de que la próstata (u otros tejidos) de diferentes especies expresa diferentes formas isoenzimáticas. Así, si se utilizaban extractos de próstata humana en ensayos llevados a cabo a



pH ácido, era el isoenzima tipo 2 el que estaba participando en la actividad 5 $\alpha$ -Reductasa; sin embargo, si se utilizaban extractos de próstata de rata en ensayos a pH neutro, era el isoenzima tipo 1 el responsable mayoritario de la actividad 5 $\alpha$ -Reductasa.

Con el clonaje y expresión del cDNA correspondiente a 5 $\alpha$ -Reductasa tipo 1 (Andersson y col., 1989; Andersson y col., 1990) se hizo posible la comparación directa de la 5 $\alpha$ -Reductasa expresada por el clon de cDNA con aquella presente en varios extractos de tejidos. Estas comparaciones revelaron claras evidencias acerca de diferencias farmacológicas entre los isoenzimas de la 5 $\alpha$ -Reductasa (Jenkins y col., 1992) e hicieron que se pusiera un mayor ímpetu en la caracterización del segundo isoenzima.

Las bases estructurales para la especificidad isoenzimática se han estudiado con detalle con el inhibidor Finasteride. Algunos ensayos han demostrado que este 4-azasteroide es 100 veces más potente para el isoenzima tipo 2 de la 5 $\alpha$ -Reductasa de rata que frente al mismo isoenzima en humanos (Andersson y col., 1990). Se construyeron moléculas quiméricas compuestas por diferentes fragmentos de 5 $\alpha$ -Reductasa tipo 1 de rata y de humano y se llevaron a cabo ensayos de actividad en presencia del inhibidor Finasteride; estos resultados demostraron que la diferente especificidad del inhibidor radicaba en una secuencia de 4 aminoácidos localizada en el exon 1 (Thigpen y col., 1992). Ya que el Finasteride es una molécula pequeña (Pm=374) y que inhibe de forma competitiva con el sustrato la actividad del isoenzima tipo 1 de la 5 $\alpha$ -Reductasa de rata y humana así como a las moléculas

quiméricas, se pensó que estos 4 aminoácidos podían estar formando parte del dominio de unión del sustrato.

Teniendo en cuenta el elevado número de inhibidores de la 5 $\alpha$ -Reductasa descritos (y por describir), podemos pensar que casi con toda certeza existen compuestos que inhiben de forma selectiva cada uno de los isoenzimas de la 5 $\alpha$ -Reductasa en las distintas especies. En el futuro, el uso *in vivo* de estos inhibidores selectivos será muy útil para la asignación de papeles fisiológicos a los distintos isoenzimas de la 5 $\alpha$ -Reductasa.

#### ***CUANTIFICACIÓN DE LA CANTIDAD DE UN MENSAJERO MEDIANTE RT-PCR:***

Tradicionalmente, los niveles de un determinado RNA mensajero se han cuantificado mediante la técnica de *Northernblot* e hibridación con una sonda marcada, donde las unidades de magnitud de los resultados son arbitrarias, ya que son relativas a la expresión de un gen estructural, lo que impide comparaciones entre distintos tipos de tejidos (Dyson, 1991).

En la última década se ha desarrollado un nuevo método de cuantificación basado en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con dos ventajas claras frente al método clásico: la rapidez y la elevada sensibilidad. Las técnicas clásicas de hibridación con sondas marcadas requieren entre 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> copias por muestra (Boubaboula y col., 1992), mientras que una PCR puede detectar (teóricamente) una única molécula, ello permite la detección de especies de mensajeros extremadamente raros, o

mRNAs de expresión normal en un reducido número de células (Guiffre y col., 1993).

De todas las variantes de la técnica que se han desarrollado, la más sensible es la RT-PCR competitiva, donde se trabaja con unidades reales: *n° de moléculas del mRNA problema por ng de RNA total*. Existen referencias en las que se estima la concentración de mRNAs muy raros, de 0.003-0.1 copias por célula (Lyttelton y col., 1994; Nagano y col., 1994).

La técnica de RT-PCR se basa en dos reacciones enzimáticas acopladas: 1) Una retrotranscripción (RT) de la población de moléculas de RNA a cDNA, mediante una retrotranscriptasa y, 2) una amplificación (PCR) donde, mediante una DNA-polimerasa termoestable, se amplifica un determinado cDNA. Así, estimando la cantidad de producto amplificado y controlando ciertos parámetros puede deducirse la cantidad inicial del mRNA problema.

Como sustrato para la retrotranscripción se usa una población de RNA en la que se encuentra el mRNA problema en concentración desconocida. Este RNA puede ser de tres tipos, según el modo de extracción: RNA total, citoplasmático y mensajero. En eucariotas, el uso de RNA citoplasmático permite estudios más finos sobre la expresión genética pues elimina puntos de control que son englobados en el RNA total. El RNA mensajero es útil cuando se trabaja con genes de baja expresión, para conseguir un enriquecimiento del mRNA problema.

En una cuantificación mediante RT-PCR el diseño de los cebadores es muy importante, pues no deben producirse coamplificaciones con otras secuencias (se parte de una población de RNAs muy heterogénea) ni artefactos del tipo dímeros de cebadores. Un requisito importante es que han de ser totalmente homólogos con la secuencia a amplificar, no sirven cebadores heterólogos ni degenerados, pues la cuantificación mediante RT-PCR es muy sensible a pequeñas perturbaciones en la tasa de hibridación de los cebadores. De esto se deduce que es necesario conocer la secuencia, al menos de un fragmento, del mensajero a cuantificar. A diferencia de las técnicas clásicas de hibridación con sondas marcadas en las que, en determinadas circunstancias, podía usarse una sonda heteróloga procedente de una especie cercana.

#### *Tipos de cuantificación mediante RT-PCR:*

Debido a su naturaleza exponencial, la PCR es fácilmente alterable con pequeñas variaciones en las condiciones ambientales, partiendo incluso de alícuotas de una misma mezcla de reactivos, pueden darse variaciones importantes en la eficiencia de un tubo a otro. Simplemente conociendo la cantidad final de DNA amplificado es difícil estimar la concentración inicial del mRNA, por ello, la molécula *problema* se coamplifica junto a una molécula *patrón* de concentración conocida o constante.

En consecuencia, se obtienen como producto dos moléculas distintas de DNA, denominadas patrón y problema. Ambas moléculas se amplifican en el mismo tubo, con lo que se eliminan las perturbaciones de eficiencia de un tubo

a otro, y como resultado se refiere la cantidad final de problema a la de patrón. Ambas moléculas han de poder cuantificarse por separado tras la amplificación.

El patrón puede ser el mRNA de un gen estructural (denominado patrón interno), o una molécula sintética DNA o RNA (denominado patrón externo) que se añade en concentración conocida al inicio de la retrotranscripción.

Según el patrón de patrón utilizado se han desarrollado varios tipos de RT-PCR:

- RT-PCR semicuantitativa, con patrones internos.
- RT-PCR competitiva, con patrones internos competitivos.
- RT-PCR con patrones externos no competitivos.

#### 1. RT-PCR semicuantitativa:

Muy usada en la actualidad, es la primera variante de RT-PCR que se desarrolló y sigue una línea conceptual similar a las técnicas clásicas de hibridación: El mRNA problema se coamplifica junto al mRNA de un gen estructural de expresión constante (patrón interno), por lo que al referirse a la expresión de otro gen, este tipo de cuantificación es *semicuantitativa* y no son posibles comparaciones entre distintos tejidos u organismos.

Patrón y problema se coamplifican con cebadores distintos, preferiblemente en el mismo tubo, o en tubos distintos si existe algún tipo de

interferencia (Noonan y col., 1990). En general, han de cumplirse dos condiciones:

- 1) La eficiencia tiene que ser constante en el número de ciclos usado. Para ello es necesario fijar para problema y patrón el rango en el que se encuentra la fase exponencial (donde  $E$  es constante).
- 2) Dentro de la fase exponencial no debe haber demasiada diferencia entre las eficiencias de ambas moléculas.

Los genes estructurales más usados como patrones internos son la  $\beta$ -actina (Zhou y col., 1994), histona H3 (Chen y col., 1994), proteína ribosomal L19 (Futscher y col., 1993),  $\beta_2$ -microglobulina (Murphy y col., 1990), aldolasa A (Chelly y col., 1990), factor de elongación EF-1 $\alpha$  (Dostal y col., 1994) y el enzima gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) (Guyon y col., 1994).

Las unidades (arbitrarias) en las que se expresan los resultados son: cantidad de problema/cantidad de patrón. Al tratarse de una unidad relativa, se tiene la ventaja de que no es necesario un control estricto de la cantidad de RNA (total o citoplasmático) que se añade al inicio de la retrotranscripción.

Por otra parte, la dependencia de la expresión de un gen estructural puede conducir a error cuando el control se encuentra afectado por las condiciones ambientales o fisiológicas, como es el caso descrito para el gen de la  $\beta$ -actina para fibroblastos humanos (Wong y col., 1994).

Debido a la estricta dependencia de la fase exponencial surgen dos problemas:

- 1) Si el mRNA problema es varias veces menos abundante que el mRNA patrón, nos encontramos con que las fases exponenciales de las dos amplificaciones no son coincidentes. Algunos autores han solucionado este problema retrasando varios ciclos la adición de los cebadores para el patrón (Kinoshita y col., 1992)
- 2) En muchos casos la fase exponencial es muy pequeña o casi inexistente, lo que complicaría bastante la cuantificación.

## 2. RT-PCR competitiva:

La RT-PCR competitiva se basa en la siguiente característica: Cuando se coamplifican dos moléculas con el mismo par de cebadores, la relación entre sus concentraciones iniciales se mantiene durante todos los ciclos de la amplificación (e inclusive en la fase *plateau*) (Gilliland y col., 1990).

Del par de moléculas competidoras una es el *problema* (de concentración desconocida) y la otra es el *patrón* (de concentración conocida). Patrón y problema han de tener sitios de unión para el mismo par de cebadores y ambas moléculas han de poder separarse tras la amplificación, por diferencia de tamaño o por la posesión de un sitio de restricción exclusivo de una de ellas.

El patrón puede añadirse en forma de DNA al comienzo de la amplificación (Pannetier y col., 1993; Celi y col., 1993; Wadhvani y col., 1993), o en forma de cRNA al inicio de la retrotranscripción (Boubaboula y col., 1992; Wang y col., 1989; Zhou y col., 1994) para evitar la infraestimación provocada por la baja eficiencia de la RT, suponiendo que los RNAs patrón y problema se retrotranscriben con la misma eficiencia.

Algunos autores han descrito que, al acercarse la amplificación a la fase *plateau*, si las moléculas competidoras tienen distintos tamaños, la eficiencia desciende mucho más rápidamente en la de mayor longitud. Para evitar este falseamiento de los datos no se recomienda llevar la amplificación a la fase *plateau*. Existe una interesante discusión teórica de la evolución de la eficiencia de dos moléculas competidoras (Raeymaekers, 1993).

Los mejores patrones son aquellos que tienen el mismo tamaño que el problema y se distinguen mediante la inserción de un sitio exclusivo de restricción, pues al tener secuencias casi idénticas, la evolución de la eficiencia de las dos moléculas es prácticamente la misma. Sin embargo, se ha descrito que pueden formarse moléculas heterodúplex entre patrón y problema (Bolton y col., 1996). Puesto que estas moléculas migran más lentamente y no se digieren con la enzima de restricción, se puede estimar su cantidad y corregir el resultado final (la estequiometría del heterodúplex es 1 patrón:1 problema).

La RT-PCR competitiva tiene una desventaja clara frente a la semicuantitativa: debido a que los resultados se expresan en función de los ng de RNA (total o citoplasmático) añadidos al inicio de la retrotranscripción, ha



de calcularse de forma muy precisa la concentración del RNA, mientras que en la semicuantitativa los resultados se expresan en unidades relativas (cantidad de problema/cantidad de patrón) e independientes de la cantidad de RNA.

Por otra parte, la competitiva presenta dos importantes ventajas frente a la semicuantitativa, lo que explica la popularidad que esta técnica ha alcanzado:

- 1) A diferencia de todas las técnicas anteriores, las unidades en las que se expresan los resultados son totalmente cuantitativas: nº de moléculas/ng de RNA, y si se estima la cantidad media de RNA por célula, pueden darse en nº de moléculas/célula, lo que permite comparaciones entre tejidos, momentos fisiológicos y organismos distintos, cosa que antes, al depender de genes estructurales no era posible.
- 2) La RT-PCR competitiva es relativamente independiente de la fase en la que se encuentre la amplificación, pudiendo en la mayoría de los casos, cuantificar en fase *plateau*. Ello permite una mayor sensibilidad que la semicuantitativa, que depende totalmente de la fase exponencial.
3. RT-PCR con patrones externos no competitivos:

Es una tercera forma de cuantificación poco utilizada, en la que el patrón es una molécula que se añade en forma de DNA al inicio de la amplificación, o en forma de RNA al inicio de la retrotranscripción, y que usa distintos cebadores que la molécula problema.

Puede considerarse como una técnica intermedia entre la RT-PCR semicuantitativa y la RT-PCR competitiva, pues depende de la fase exponencial de la amplificación y los resultados pueden expresarse en unidades cuantitativas (aunque es mucho menos sensible que el competitivo) Köhler y col., 1995).

**RESUMÉN:**

La glándula prostática depende de la estimulación androgénica para su desarrollo y función (Steers, 2001). El andrógeno más importante tanto cuantitativa como cualitativamente es la testosterona (T). La T es reducida en muchos órganos andrógeno dependientes a dihidrotestosterona (DHT), una sustancia, que si bién durante muchos años se creyó que era un metabolito inactivo de la T, hoy se sabe es el metabolito o quizá la hormona activa, que media el crecimiento controlado por andrógenos de muchos de estos tejidos y órganos incluyendo la próstata (Russel, 1994). Ambos T y DHT se unen al receptor de andrógenos, aunque DHT se une con mucha más afinidad, precisamente la diferencia en la acción de estos dos andrógenos se ha explicado en base a la cinética del receptor. (Steers, 2001). Recientes estudios han demostrado diferencias en la vía de transducción de señales dependiendo de qué hormona T o DHT se une al receptor de andrógenos. En este sentido, cuando se comparan los efectos de T y DHT en ratas castradas se detectan mecanismos "upregulation" y "down regulation" en la expresión de varios genes dependiendo de la hormona administrada (Avila y col., 1998).

La transformación de T en DHT es muy evidente en la glándula prostática. En efecto, DHT es el andrógeno predominante en la prostata del hombre y del perro, y el principal andrógeno que actúa a nivel nuclear en este órgano, siendo muchos los experimentos que han demostrado que DHT juega un papel central en la diferenciación y crecimiento de la próstata humana y de varias especies (Mahendroo y col., 2001).

DHT es sintetizada a partir de T por el enzima  $5\alpha$ -Reductasa. Dos isoenzimas distintas de la  $5\alpha$ -Reductasa ( $5\alpha$ -R) denominadas Tipo 1 ( $5\alpha$ -R1) y Tipo 2 ( $5\alpha$ -R2), ambas unidas a membrana, se han identificado en el hombre y en otras especies incluyendo la rata, el ratón, el perro y el mono (Russel, 1994). Ambas isoenzimas son codificados por genes diferentes y su distribución en tejidos y expresión celular, así como sus características fisico-químicas y sus respuestas a agentes farmacológicos son también diferentes. El gen que codifica la  $5\alpha$ -R1, denominado SRD5A1, se encuentra localizado en el cromosoma 5. Dicha isoenzima ( $5\alpha$ -R1) tiene una actividad máxima a pH neutro o básico y se encuentra fundamentalmente en la piel y en el hígado. El gen SRDA2 que codifica la isoenzima  $5\alpha$ -R2 se encuentra localizado en el cromosoma 2. Dicha isoenzima  $5\alpha$ -R2 tiene una actividad máxima a pH ácido y se expresa en órganos andrógeno-dependientes tales como el pene, escroto, epidídimo y próstata (Andersson y col., 1991).

La existencia de la  $5\alpha$ -R2 en próstata humana se conocía desde hace mucho tiempo, y muchos autores consideraban que por las características específicas de la próstata humana esta isoenzima era suficiente para producir la DHT necesaria para el desarrollo y función prostática (Russell, 1994), por ello, la existencia de la  $5\alpha$ -R1 en próstata humana ha sido un tema muy debatido. Experimentos de inmunobloting identificaron solo la isoenzima tipo 2 en tejido de próstata humana normal e hiperplásica (Thigpen y col., 1993b). No obstante análisis de Northernblot y RT-PCR semicuantitativa han establecido más recientemente la presencia de ambos isoenzimas en próstata humana (Iehle, 1999).

DHT no solo juega un papel crucial en el desarrollo y maduración fisiológico de la próstata sino que también es el andrógeno principal responsable de patologías prostáticas como la hipertrofia benigna de próstata (HBP) (Kaplan, 2001). En este sentido se ha demostrado que la administración de DHT a perros castrados produce una hipertrofia prostática. En la próstata la isoenzima  $5\alpha$ -R2 es expresada por las células basales y estromales y la DHT producida, podía interaccionar con las células epiteliales. La acción combinada de DHT y factores de crecimiento o bien la acción de DHT activando factores de crecimiento, podría ocasionar el desarrollo de la HBP (Steers, 2001). A este respecto, cabe señalar los trabajos realizados por Di Silverio y col. (1998) y Boyle y col. (2000) determinando los niveles del factor de crecimiento epidérmico (EGF) o del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) en cultivos celulares de próstata humana y los realizados por Huynh H y col. (2001) que demostraron en próstata de rata el papel que juegan las hormonas DHT y estradiol sobre los parámetros de crecimiento Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) y la proteína transportadora de IGF1 (IGFBP3).

En la década de los 80 se sintetizaron una serie de azosteroides inhibidores de la  $5\alpha$ -R, considerándose al finasteride (un inhibidor de la  $5\alpha$ -R2) como prototipo de estos compuestos. Finasteride produce un 80%-90% de inhibición de la reductasa tipo 2 en próstata, reduce el tamaño de la próstata de los perros y de humanos y decrece los niveles de DHT en sangre y próstata (Steers, 2001; Kaplan, 2001). Además finasteride al disminuir por apoptosis el tejido glandular produce una reducción en el antígeno específico prostático (PSA) y mejora los síntomas del tracto urinario y la hematuria asociada a la HBP ya que parece que DHT juega un papel importante en la

proliferación de los vasos sanguíneos. Más recientemente se ha obtenido un extracto lipo-esteroideo de la planta *Serenoa repens* que parece ser un inhibidor de las isoenzimas tipo 1 y tipo 2 de la  $5\alpha$ -R y que también podría ser efectivo en el tratamiento de la HBP (Bayne y col., 1999; Di Silverio y col., 1998; Boyle y col., 2000). Como es sabido, la industria farmacéutica es cada vez más competitiva y la comercialización de un fármaco cada vez está más controlada y debe estar avalada por una investigación científica de calidad.

Ciertos cánceres de próstata (CaP) son dependientes de andrógenos, hecho que plantea la cuestión de si DHT se requiere para el comienzo, mantenimiento o progresión de dichos adenocarcinomas de próstata (Jaffe y col., 2000). Desgraciadamente el conocimiento que hoy tenemos sobre la etiología del cáncer de próstata es insuficiente. Muchos autores han encontrado cambios polimórficos en el gen SRD5A2 en individuos con cáncer de próstata (Latil y col., 2001; Sibata, 2001) sugiriendo que las modificaciones en este gen son un factor de riesgo en el CaP. Algunos autores han sugerido el uso de inhibidores de la  $5\alpha$ -R en el tratamiento de ciertos tipos de CaP (Brawley y col., 2001). Sin embargo, otros autores han especulado que la modificación de este gen no es un factor de riesgo de desarrollar CaP ya que el tratamiento con Finasteride no produce cambios histológicos en tejido canceroso, ni parece ser efectivo en pacientes con CaP (Steers, 2001). Recientemente usando técnicas de RT-PCR semicuantitativa no solo se ha demostrado la existencia de la  $5\alpha$ -1 en próstata humana, sino que se ha visto que dicho isoenzima está incrementado en individuos con CaP, que curiosamente no tienen alterados los niveles de la isoenzima  $5\alpha$ -R2 (Iehlé y col., 1999).

En el sistema nervioso central también se conoce la existencia de la vía de la  $5\alpha$ -reducción, que podría estar implicada en la síntesis de neuroesteroides (Melcangi y col., 1998). Los neuroesteroides son sintetizados en el SNC a partir del colesterol u otros precursores esteroideos. Neuroesteroides muy potentes son metabolitos  $3\alpha5\alpha$ -reducidos de la progesterona y la corticoesterona. Estos neuroesteroides desempeñan funciones importantes en el cerebro adulto y podrían tener un papel en el desarrollo del cerebro y en la diferenciación sexual del SNC.

En el cerebro, algunos neuroesteroides actúan directamente sobre receptores de membrana para neurotransmisores, por ejemplo receptores de acetilcolina y ácido gamma-aminobutírico (GABA) y están implicados en el mecanismo de neurotransmisión. Los neurosteroides pueden participar en la diferenciación sexual del SNC ya que potencian la actividad de GABA modulando alostéricamente el receptor de  $GABA_A$ . Por ello es de gran importancia no sólo conocer si en cerebro se expresan una o ambas isoenzimas de la  $5\alpha$ -R, sino también conocer la regulación ejercida por los andrógenos T y DHT.

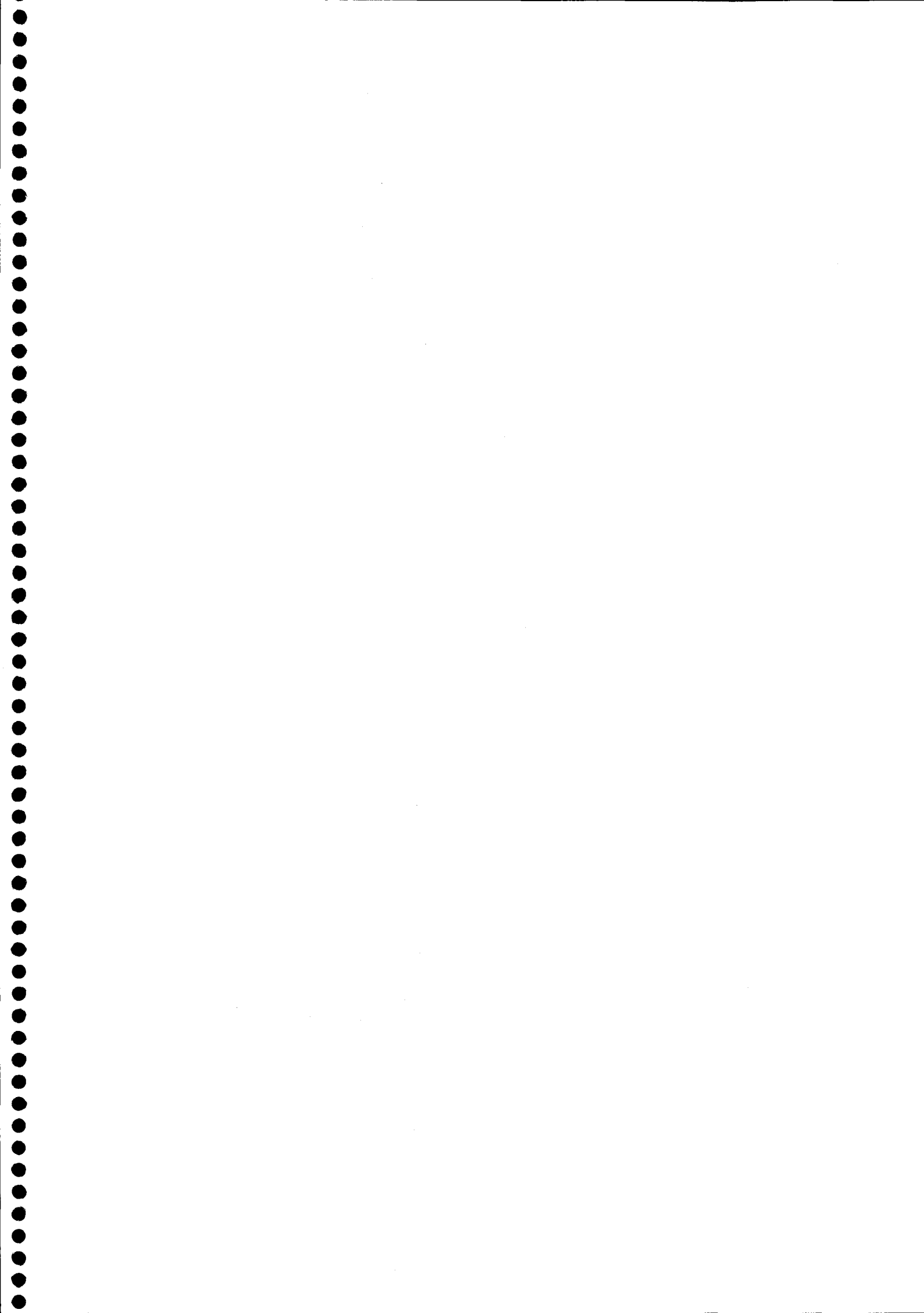
El clonaje de distintos cDNAs que codifican para los distintos isoenzimas de la  $5\alpha$ -Reductasa ha proporcionado un gran número de herramientas que nos permiten profundizar en las funciones principales que desempeña este enzima y sus productos en la acción de andrógenos y hormonas esteroideas. Estas herramientas han sido empleadas para comprender algo mejor la bioquímica, genética, regulación y farmacología de la  $5\alpha$ -Reductasa. En el futuro habrá que disponer de estas herramientas para contestar un gran número de preguntas interesantes acerca del papel fisiológico de los distintos

isoenzimas de la 5 $\alpha$ -Reductasa y elucidar aspectos tan importantes como determinar la estructura terciaria de la proteína y una nueva definición de los dominios funcionales en la molécula, profundizar en los conocimientos que existen acerca de las proteínas reguladoras que controlan los patrones de expresión temporal y célula-específica de los genes de la 5 $\alpha$ -Reductasa, las consecuencias de las mutaciones en los genes tipo 1 y tipo 2, una definición más completa de las funciones fisiológicas de ambas isoenzimas, el papel de la 5 $\alpha$ -Reducción en la fisiología de otras hormonas esteroideas y, por último, el desarrollo y aplicación clínica de nuevos inhibidores de la 5 $\alpha$ -Reductasa.

Por todo lo expuesto anteriormente, es necesario disponer de una metodología precisa y fiable que nos permita poder cuantificar los efectos que ejercen los andrógenos T y DHT sobre los niveles de mRNA de las isoenzimas de la 5 $\alpha$ -R y conocer algo más acerca de su papel en la fisiología del mamífero.

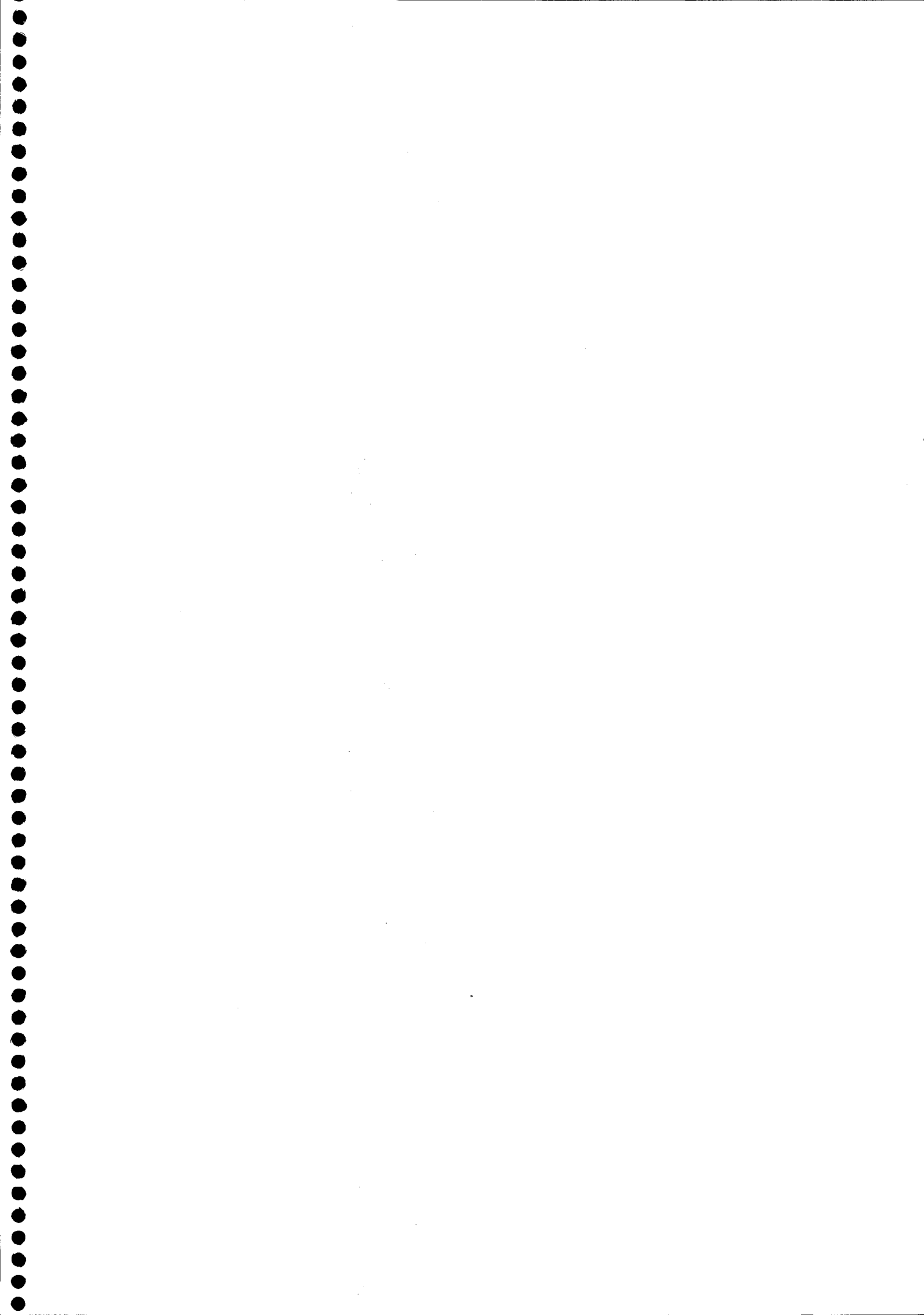


***II. OBJETIVOS***



- 1) Estudiar la variación en los niveles de mRNA de los isoenzimas tipo 1 y tipo 2 de la 5 $\alpha$ -R mediante una técnica de RT-PCR semicuantitativa acoplada a EC en distintos tejidos y situaciones experimentales.
- 2) Diseñar un nuevo método rápido, fiable y preciso de RT-PCR competitiva acoplada a EC para el análisis de los niveles de mRNA de los isoenzimas tipo 1 y tipo 2 de la 5 $\alpha$ -R.
- 3) Cuantificar mediante "two sep" RT-PCR competitiva los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 en hígado de rata y su regulación por los andrógenos T y DHT.
- 4) Cuantificar mediante "two sep" RT-PCR competitiva los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R 2 en próstata de rata y su regulación por los andrógenos T y DHT.
- 5) Detectar y cuantificar mediante "one-step" RT-PCR competitiva los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en corteza prefrontal de cerebro de rata y su regulación por T y DHT.

### *III. MATERIAL Y MÉTODOS*



***Material fungible.***

- Puntas de pipeta automática de 200-1000  $\mu$ l Daslab (azules).
- Puntas de pipeta automática de 20-200  $\mu$ l Daslab (amarillas).
- Puntas de pipeta automática de 0.1-10  $\mu$ l Gilson (blancas).
- Tubos eppendorf de 2 ml. Daslab.
- Tubos eppendorf de 1.5 ml. Daslab.
- Tubos eppendorf de 0.5 ml. Daslab.
- Tubos de PCR 0.2 ml. MicroAmp® PCR tubes Perkin-Elmer
- Todos los reactivos utilizados de alto grado de pureza, fueron suministrados por Sigma-Aldrich, Panreac, Merck y Scharlau, salvo que se indique lo contrario.

***Material inventariable.***

- Pipeta automática 200-1000  $\mu$ l Boeco.
- Pipeta automática 50-200  $\mu$ l Boeco.
- Pipeta automática 5-50  $\mu$ l Boeco.
- Pipeta automática 0.5-10  $\mu$ l Boeco.
- Pipeta automática 0.1-2.5  $\mu$ l Eppendorf.
- Guillotina
- Homogenizador Polytron
- Agitador de tubos IKA minishaker 2.
- Centrífuga Beckman TJ-6.
- Microcentrífuga de mesa Eppendorf 5410.
- Microondas Samsung M1713

- Autoclave P-Selecta.
- Balanza de precisión AND ER-60<sup>a</sup>.
- Sistema Elecsys 2010.
- Sistema Immulite 2000.
- Lector de placas de ELISA, Bio-Rad.
- Tanques de N<sub>2</sub> líquido.
- Frigorífico 4 °C
- Congelador -20 °C
- Congelador -80 °C
- Máquina de hielo Difri.
- Termobloque P-Selecta ®
- Sistema de electroforesis horizontal, Bio-Rad MiniSub Cell GT.
- Transiluminador UV Bio-Rad *Mini-transiluminator*.
- Fuente de alimentación Bio-Rad 3000
- Cámara Polaroid Bio-Rad
- Espectrofotómetro Shimadzu UV-VIS 1600
- Termociclador PE-Applied Biosystem 2400
- Analizador genético ABIPRISM 310 Genetic Analyzer y software asociado.

#### *Animales de experimentación.*

Ratas adultas macho Wistar de 260-280 g. mantenidas en animalario con dieta estándar de mantenimiento AO4 (Panlab) y agua *ad lib*. El ciclo de iluminación se controló mediante un temporizador programado para mantener ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La renovación del aire se mantuvo mediante un extractor automático.

Los grupos experimentales que se han establecido para el desarrollo de este trabajo son los siguientes:

- Ratas intactas (I).
- Ratas intactas mas Testosterona (I+T).
- Ratas intactas mas Dihidrotestosterona (I+DHT).
- Ratas castradas (C).
- Ratas castradas mas Testosterona (C+T).
- Ratas castradas mas Dihidrotestosterona (C+DHT).

La castración de los animales ocurre mediante orquidectomía bilateral bajo anestesia. Los animales permanecen castrados durante 7 días y después comienza el tratamiento hormonal sustitutivo en los grupos pertinentes. El tratamiento hormonal consiste en inyecciones subcutáneas de vehículo oleoso (20% etanol en aceite de sésamo) (grupos I y C), o bien de vehículo oleoso que contiene Propionato de Testosterona ( $T_p$ , 1 mg/Kg de peso y día) (grupos I+T y C+T) con una frecuencia de tres días por un periodo de dos semanas. Otro grupo de animales intactos y castrados se tratan con inyecciones subcutáneas de vehículo oleoso o bien de vehículo oleoso que contiene Dihidrotestosterona (DHT, 1mg/Kg de peso y día) todos los días por un periodo de dos semanas.

Transcurrido este tiempo los animales se sacrifican mediante decapitación y se extrae la próstata, el hígado y el cerebro por procedimientos quirúrgicos. Las muestras de tejido se pesan, se congelan en  $N_2$  líquido y se almacenan a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su análisis. La sangre de los animales decapitados se



recoge en tubos heparinizados, se centrifuga a 2000 rpm durante 10 minutos y el suero se almacena hasta que se realice el análisis hormonal.

Para la determinación de neuroesteroides se utilizan ratas adultas macho y hembra Wistar de 150-200 g. de peso. Tanto los animales macho como las hembras se dividen en tres grupos: Un grupo se inyectó con CRH (CRH 1-41, Sigma-Aldrich) según Rivier y col. (1985), otro grupos se inyectó con ACTH (ACTH 1-24, Novartis Pharma) y un tercer grupo sin tratamiento se utilizó como control.

Transcurridos 30 minutos desde la inyección del CRH o el ACTH, los animales se sacrifican por decapitación bajo anestesia. Se extrae el cerebro por procedimientos quirúrgicos y se congela en N<sub>2</sub> líquido. Se recoge la sangre en tubos heparinizados, se centrifuga a 2000 r.p.m. durante 10 minutos y las muestras de suero se congelan a -80 °C hasta que se realice la extracción de neuroesteroides.

#### *Análisis hormonal.*

Las concentraciones plasmáticas de testosterona (T) se midieron por radioinmunoensayo (RIA) en el sistema Immulite 2000 utilizando un kit comercial de DiaSorin (Vercelli, Italia). Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron 7.6% y 12.0%, respectivamente, y la sensibilidad de 0.05 ng/ml.

Las concentraciones plasmáticas de DHT se midieron por ELISA directo (Diagnostic Biochem Canada Inc., Ontario, Canada). Los coeficientes de

variación intra- e inter-ensayo fueron 5.9% y 7.5%, respectivamente, y la sensibilidad fue de 6.0 pg/ml.

Para la determinación de neuroesteroides en suero, las muestras se extraen con éter según Purdy y col. (1990). Los extractos se separan por cromatografía en columnas de Celite y se purifica dihidroprogesterona (DHP) y progesterona (PROG) por elución con isooctano, seguido de elución con isooctano:benzeno (85:15) para purificar la alopregnenolona. Para la determinación de neuroesteroides en cerebro, éste se homogeniza a 4 °C. La fracción esteroidea purificada se lleva a sequedad bajo corriente de nitrógeno según Corpechot y col. (1993).

La determinación de DHP y PROG se hizo por RIA utilizando el antisuero RU-1093 frente a PROG 3-CMO BSA (cedido por Roussel-Uclaf, París). Para la determinación de alopregnenolona se utilizó un anticuerpo frente a alopregnenolona 20-CMO BSA (cedido por Roussel-Uclaf, París).

#### *Extracción de RNA y cuantificación.*

1.- Extracción de RNA mediante el kit *High Pure™ RNA Tissue kit* (Boehringer-Mannheim):

- Añadir 400 µl de Lysis/Binding Buffer y homogeneizar con Polytron.
- Transferir a un eppendorf de 1.5 ml estéril y centrifugar el lisado durante 2 min. en una microcentrífuga.

- Transferir el sobrenadante (SN) a otro tubo de 1.5 ml y añadir 200  $\mu$ l de etanol libre de RNasas.
- Ensamblar la columna y el tubo colector y pipetear la muestra en el reservorio superior.
- Centrifugar 30 seg. a 13.000 x g.
- Descargar el tubo colector y reensamblar la columna.
- Preparar la Dnasa mezclando 90  $\mu$ l de Dnase Incubation Buffer y 10  $\mu$ l de DNasa I.
- Pipetear la solución sobre la membrana de la columna e incubar 15 min a RT.
- Añadir 500  $\mu$ l de Wash Buffer I y centrifugar 15 seg. a 8.000 x g
- Descargar el tubo colector y reensamblar de nuevo la columna.
- Añadir 500  $\mu$ l de Wash Buffer II y centrifugar 15 seg. a 8.000 x g
- Descargar el tubo colector y reensamblar de nuevo la columna.
- Añadir 300  $\mu$ l de Wash Buffer II y centrifugar 2 min. a 13.000 x g
- Con cuidado, separar la columna del tubo colector y descargar.
- Insertar la columna en un tubo de 1.5 ml estéril.
- Añadir 100  $\mu$ l de Ellution Buffer.
- Centrifugar 1 min. a 8.000 x g
- El tubo de 1.5 ml contiene el RNA.
- Congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2.- Extracción de RNA mediante Tiocianato de guanidina-Fenol-Cloroformo:

- Añadir 500  $\mu$ l de solución desnaturizante D y homogeneizar con Polytron evitando la formación de espuma. (Sol. D: Tiocianato de

guanidina 4M, N-lauril-sarcosina 0.5%,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.1 M en tampón citrato sódico 25 mM, pH 7.0).

- Transferir el homogeneizado a un eppendorf de 1.5 ml y centrifugar 2 min. a 13000 rpm.
- Transferir el SN a un tubo de 1.5 ml nuevo.
- Añadir 100  $\mu$ l de Acetato sódico 3M, pH 5.0. Mezclar mediante inversion.
- Añadir 500  $\mu$ l de Fenol equilibrado en tampón citrato 0.1M, pH 4.2 y 100  $\mu$ l de Cloroformo-Isoamílico (24:1). Es muy importante mantener la proporción 50% fase acuosa-50% fase orgánica.
- Agitar mediante vortex un mínimo de 30".
- Centrifugar durante 5' a 13000 rpm.
- Recoger con mucho cuidado la fase acuosa y ponerla en otro tubo de 1.5 ml limpio.
- Repetir la extracción orgánica para eliminar la interfase correspondiente a las proteínas.
- Agitar mediante vortex y centrifugar 5' a 13000 rpm.
- Recoger con cuidado la fase acuosa en otro tubo limpio y extraer ahora solamente con cloroformo-isoamílico (24:1) para eliminar los restos de fenol.
- Agitar mediante vortex y centrifugar 5' a 13000 rpm.
- Transferir la fase acuosa a un tubo de 1.5 ml. limpio.
- Precipitar el RNA en 60% de isopropanol durante 60' a  $-80^{\circ}\text{C}$  o toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Centrifugar 30' a 13000 rpm. y decantar el isopropanol.
- Lavar el pellet de RNA con 1 ml de etanol 75% frio.

- Centrifugar 5' a 13000 rpm.
- Repetir el lavado con etanol 75%.
- Eliminar el etanol y resuspender el pellet en un volumen adecuado de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC.
- Evaporar los restos de etanol a 70 °C en termobloque.
- Congelar a -80 °C.

Una vez extraído el RNA se comprueba su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

#### Cuantificación de RNA:

Mediante espectrofotometría, según:

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )=  $A_{260}$  \* coeficiente de extinción \* factor de dilución.

El coeficiente de extinción es de 44,19 para el RNA y de 50 para el DNA.

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

La medida de la absorbancia se realiza en cubetas de cuarzo. Medidas inferiores a 0,1 no son válidas.

Las medidas se hacen por duplicado o triplicado y se toma el valor medio.

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 (el principal). 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 con 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 proteínas en este rango). Una muestra de RNA pura tiene una relación  $A_{260}/A_{280}$  de  $2 \pm 0,05$ . Una muestra de DNA pura tiene una relación  $A_{260}/A_{280}$  de  $1,8 \pm 0,05$ .

#### *Diseño racional de oligonucleótidos para PCR.*

En primer lugar se obtienen de GeneBank® las secuencias de nucleótidos correspondientes a los isoenzimas tipo 1 y tipo 2 de la  $5\alpha$ -Reductasa de rata, así como la secuencia del gen de la GAPDH que se utilizará en los ensayos de RT-PCR semicuantitativa, utilizando el motor de búsqueda SRS 5.0 (Sequence Retrieval System).

A continuación se diseñan los oligonucleótidos para amplificar cada uno de los dos isoenzimas de la  $5\alpha$ -Reductasa así como la GAPDH de acuerdo con las siguientes características: 20 nucleótidos de longitud, 60% de contenido en GC, producto amplificado en torno a 200 p.b. y que el último nucleótido en 3' sea G o C. El diseño de los oligonucleótidos se hizo utilizando el programa Prophet®. De todas las combinaciones posibles se escogió aquella más próxima al extremo 3' de la secuencia de mRNA.

Por último, las secuencias de los oligonucleótidos seleccionados se someten a una búsqueda de homología de secuencia mediante el algoritmo BLAST para evitar ampliaciones inespecíficas.

Así, las secuencias de los oligonucleótidos seleccionados son:

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño (p.b.)
R1-F	GAGATATTCAGCTGAGACCC*(TET)	185
R1-R	TTAGTATGTGGGCAGCTTGG	
R2-F	ATTTGTGTGGCAGAGAGAGG*(HEX)	192
R2-R	TTGATTGACTGCCTGGATGG	
GAPDH-F	TGCCAAGGCTGTGGGCAAGG*(6-FAM)	199
GAPDH-R	GCTTCACCACCTTCTTGATG	

Los diferentes oligonucleótidos *sentido* se sintetizan marcados con distintos fluoróforos en posición 5':

- R1-F marcado con TET (4,7,2',7'-tetracloro-6-carboxifluoresceina).
- R2-F marcado con HEX (4,7,2',4',5',7'-hexacloro-6-carboxifluoresceina).
- GAPDH-F marcado con 6-FAM (6-carboxi-fluoresceina).

Los distintos productos amplificados se separarán mediante electroforesis capilar y se cuantificarán mediante análisis de la fluorescencia emitida.

Como se explicará en la sección de *Resultados* de esta Tesis, en un segundo grupo de experimentos fue necesario encargar la síntesis de estos oligonucleótidos marcados todos ellos con el mismo fluoróforo, en este caso el fluoróforo de elección fue el 6-FAM.

#### *Construcción de los estándares internos para RT-PCR competitiva.*

Un caso especial en el diseño de oligonucleótidos lo constituye el diseño de los cebadores empleados para la construcción de los diferentes estándares internos (IS) utilizados en los experimentos de RT-PCR competitiva.

La construcción de estas moléculas sintéticas de DNA (fig. 37) se hace a partir del plásmido pEGFP-C1, cuya secuencia de nucleótidos se obtuvo de la página web de Clontech (Palo Alto, CA). Se construye un estándar interno para cada isoenzima de la  $5\alpha$ -Reductasa que se pretende estudiar, IS-1 (competidor de  $5\alpha$ -R1) e IS-2 (competidor de  $5\alpha$ -R2). Para ello se diseñan unos oligonucleótidos de 40 nucleótidos de longitud de manera que los 20 primeros nucleótidos en 5' coinciden con la secuencia de los cebadores diseñados para amplificar respectivamente cada isoenzima de la  $5\alpha$ -Reductasa y los 20 nucleótidos restantes en 3' anillan con la secuencia de nucleótidos del plásmido pEGFP-C1. Estos cebadores se diseñan para amplificar un fragmento de 260 p.b. del plásmido pEGFP-C1 y sus secuencias son:



Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño (p.b.)
IS1-F	GAGATATTCAGCT <b>GAG</b> ACCCACGTAAACGCCACAAGTTC	300
IS1-R	TTAGTATGT <b>GGG</b> CAGCTT <b>GG</b> TCTTGTAGTTGCCGTCGTCC	
IS2-F	ATTTGTGT <b>GGC</b> AGAGAGAG <b>GG</b> ACGTAAACGGCCACAAGTTC	300
IS2-R	TTGATT <b>GACT</b> GCCT <b>GG</b> AT <b>GG</b> TCTTGTAGTTGCCGTCGTCC	

(\*) En negrita se señala la región correspondiente a las secuencias de los cebadores que amplifican ambos isoenzimas de la 5 $\alpha$ -Reductasa.

Como puede verse en la figura, después de una primera PCR con estos cebadores se consigue integrar la secuencia complementaria a los 20 primeros nucleótidos en 5' en una 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 los isoenzimas de la 5 $\alpha$ -Reductasa, es decir, tanto el estándar interno como el cDNA correspondiente a cada isoenzima de la 5 $\alpha$ -Reductasa van a compartir idénticas regiones de unión de los cebadores.

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

El producto de PCR correspondiente a cada estándar interno se precipita con etanol, se purifica y se cuantifica por espectrofotometría a  $A_{260}/A_{280}$  nm. Por último, ya que conocemos la secuencia de nucleótidos de cada fragmento sintético de DNA, se estima 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 calcula el número de moléculas de cada estándar interno.

Ya que se conoce el número de copias de estándar interno que se añaden al comienzo de la amplificación, se puede calcular el número de copias de mRNA problema. El número de copias de cDNA problema se calcula 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 añadida al comienzo de cada amplificación, de manera que los resultados representan niveles de expresión real.

#### *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 la amplificación. Matemáticamente puede comprobarse que dos moléculas competidoras se amplifican con la misma eficiencia según la ecuación 1 descrita en el apartado *Cuantificación de la cantidad de un mensajero mediante RT-PCR*, así:

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

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

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.

$E_{\text{prob}}$ : eficiencia de amplificación del cDNA problema.

$E_{\text{st}}$ : 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  $n$ :

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

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 la representamos en forma logarítmica:

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

Y en analogía a la ecuación de una recta:

$$y=b-x$$

Donde:

y:  $\log (N_{f\text{-prob}}/N_{f\text{-st}})$

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

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

Con al menos dos RT-PCRs paralelas, en los que se mantiene fija la cantidad inicial 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).

En la bibliografía se han descrito varias formas de analizar los datos de una RT-PCR competitiva, todas ellas igualmente correctas. En todos los casos, se conoce el número de moléculas de patrón inicial añadidas al inicio de la coamplificación. Para cuantificar con más precisión se realizan varias amplificaciones paralelas (habitualmente entre tres y cinco), manteniendo constante uno de los competidores y variando el otro.

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

$$N_{0\text{-mRNA}} = k \times N_{0\text{-prob}} \quad \text{Ec. 4}$$

El parámetro  $k$  depende de las características de la RT-PCR competitiva, y es producto de tres componentes:

$$k = k_1 \times k_2 \times k_3 \quad \text{Ec. 5}$$

El factor  $k_1$  representa la corrección debida al diferente tamaño entre patrón y problema. Todos los métodos usados para cuantificar los productos de PCR estiman la cantidad global de DNA y no el número de moléculas. Por ejemplo, 100 ng de un DNA de 150 pb tienen el doble de moléculas que la misma cantidad de un DNA de 300 pb, por tanto,

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

Donde:

$L_{\text{prob}}$ : Longitud, en pares de bases, de la molécula final de problema.

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

Si ambas moléculas tienen el mismo tamaño,  $k_1 \cong 1$ .

El factor  $k_2$  se introduce cuando el patrón se añade en forma de DNA. Puesto que el producto de la retrotranscripción es una molécula mixta DNA/RNA, durante el primer ciclo se crea el cDNA problema como doble hélice de DNA, que empezará a amplificarse a partir del segundo ciclo. En consecuencia, el patrón tiene un ciclo mas 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. Suponiendo que  $E_1 \cong 1$ ,  $k_2 \cong 0.5$ .

Cuando el patrón se añade en forma de cRNA, al inicio de la RT, ambas moléculas comienzan a amplificarse a partir del segundo ciclo, perdiendo la necesidad del factor  $k_2$ , en estos casos:  $k_2 = 1$ .

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.

Si el patrón se añade en forma de cRNA, al inicio de la RT, y suponiendo que ambas moléculas competidoras se retrotranscriben con la misma eficiencia, se pierde la necesidad del factor:  $k_3 \cong 1$ .

Por otra parte, si la enzima utilizada es la Tth DNA Polimerasa, la eficiencia de retrotranscripción es cercana a uno (Bolton y col., 1996; Myers y col., 1991), y  $k_3 \cong 1$ .

El análisis más sencillo de los datos consiste en fijar el número de ciclos y representar la razón  $N_{f-prob}/N_{f-st}$  ( $y$ ) frente a la cantidad de competidor variado  $N_{o-st}$  ( $x$ ), donde aparece una recta en la que interpolando el punto  $y=1$ , puede estimarse la cantidad de mRNA problema por  $\mu\text{g}$  de RNA total (Gilliland y col., 1990; Dufva y col., 1995; Zanhg, 1997).

En el punto  $(x_1, 1)$  de la recta, en el que:

$y=1 \Rightarrow N_{f\text{-prob}}/N_{f\text{-st}} \Rightarrow N_{f\text{-prob}}=N_{f\text{-st}}$ , y según la ecuación 2  $\Rightarrow N_{0\text{-prob}}=N_{0\text{-st}} \Rightarrow x_1 \Rightarrow N_{0\text{-mRNA}}=k \cdot x_1$  (según la ecuación 4).

Otra forma de analizar los datos deriva de la ecuación 3 (Raeymaekers, 1993; Bolton y col., 1996), donde al 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 interpolando el punto  $(x_0,0)$  en el que  $y=0$ .

$y=0 \Rightarrow \log(N_{f\text{-prob}}/N_{f\text{-st}})=0 \Rightarrow N_{f\text{-prob}}=N_{f\text{-st}} \Rightarrow N_{0\text{-prob}}=N_{0\text{-st}}$  (según la ecuación 2)

$$\text{Si } x_0=\log(N_{0\text{-st}}) \Rightarrow N_{0\text{-prob}}=N_{0\text{-st}}=10^{x_0}$$

$$\text{Y combinando con la ecuación 4: } N_{0\text{-mRNA}}=k \cdot 10^{x_0} \text{ (Ec. 6)}$$

### *Métodos de RT-PCR.*

#### **1.- RT-PCR semicuantitativa.**

Como se indicó anteriormente, el mRNA problema se coamplifica junto al mRNA de un gen estructural de expresión constante (patrón interno). Patrón y problema se coamplifican con cebadores distintos en el mismo tubo. En este caso hemos elegido el gen de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Para los experimentos de RT-PCR semicuantitativa se utilizó el kit *SUPERSCRIPT™ Rnase H Reverse Transcriptase* (GibcoBRL) para llevar a

cabo la reacción de retrotranscripción. Este kit de RT utiliza para la síntesis de cDNA a partir del mRNA correspondiente el enzima M-MLV RTasa. Para la reacción de PCR se utilizó el kit *Ampli Taq Gold™* (Perkin-Elmer).

RT: (vol. final 20  $\mu$ l)

1  $\mu$ l Oligo (dT)<sub>12-18</sub>

1  $\mu$ g RNA

ddH<sub>2</sub>O hasta 11  $\mu$ l

Calentar a 70 °C durante 10 min. y rápidamente enfriar en hielo.

4  $\mu$ l 5X First Strand Buffer

2  $\mu$ l 0.1 M DTT

1  $\mu$ l dNTP (10 mM ATP, GTP, CTP y TTP).

1  $\mu$ l (200 U) *SUPERSCRIPT RT*

Incubar a 37 °C durante una hora.

Terminar la reacción de RT calentando a 70 °C durante 15 min.

Seguir con la reacción de PCR o congelar a -20 °C.

PCR: (vol. final 50  $\mu$ l)

Uno de los factores limitantes en una reacción de PCR es la concentración de Cl<sub>2</sub>Mg que varía dependiendo de los cebadores y de la muestra, por tanto debe ser determinada empíricamente para cada caso concreto. En nuestro caso, la concentración óptima de Cl<sub>2</sub>Mg resultó ser 2 mM.

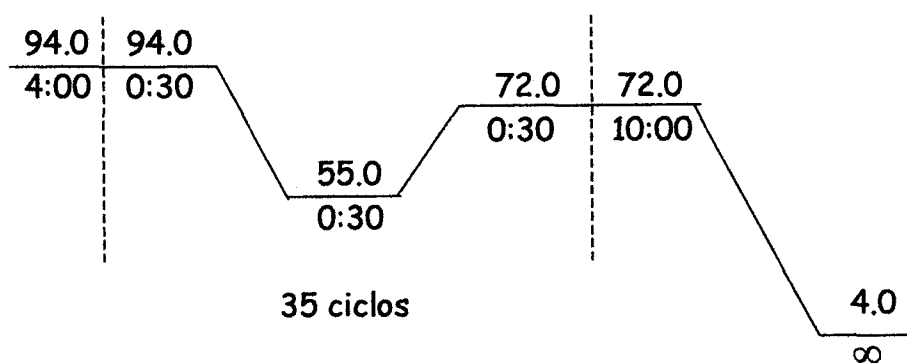


	<u>Volumen</u>	<u>Concentración final</u>
10X PCR Buffer	5 $\mu$ l	1X
Cl <sub>2</sub> Mg	4 $\mu$ l	2mM
dNTP	4 $\mu$ l	0.2 mM
cDNA (RT)	5 $\mu$ l	
Primer Mix (*)	6 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M cada oligo.
AmpliTa <sub>q</sub> Gold DNA Pol	0.25 $\mu$ l	1.25 U/reacción
ddH <sub>2</sub> O	hasta 50 $\mu$ l	

(\*) La mezcla de cebadores contiene:

R1-F (TET)	1 $\mu$ l
R1-R	1 $\mu$ l
R2-F (HEX)	1 $\mu$ l
R2-R	1 $\mu$ l
GAPDH-F (6-FAM)	1 $\mu$ l
GAPDH-R	1 $\mu$ l

El programa de PCR fue:



Una segunda serie de experimentos se realizaron con todos los cebadores F marcados con el mismo fluoróforo, 6-FAM.

## 2.- RT-PCR competitiva.

Como se mencionó anteriormente, la RT-PCR competitiva se basa en que cuando se coamplifican dos moléculas con el mismo par de cebadores, la relación entre sus concentraciones iniciales se mantiene durante todos los ciclos de la amplificación (e inclusive en la fase *plateau*).

Esta técnica permite cuantificar de forma rápida, fiable y precisa los niveles de mRNA de los isoenzimas 1 y 2 de la 5 $\alpha$ -R en las distintas situaciones experimentales. Para ello vamos a utilizar como patrones internos competitivos las moléculas sintéticas (estándar internos, IS) construidas a partir de la secuencia del plásmido pEGFP-C1, cuyo diseño se describió con detalle anteriormente.

En el desarrollo experimental de esta tesis se han utilizado dos variantes de la técnica de RT-PCR competitiva:

a) "Two step" RT-PCR.

b) "One step" RT-PCR.

a) "Two step" RT-PCR.

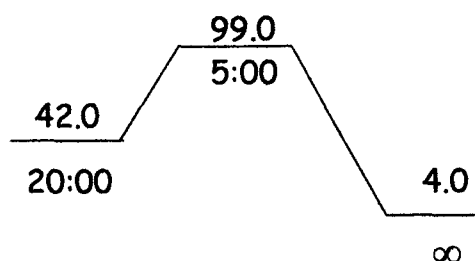
Tanto la reacción de RT como la de PCR se llevan a cabo en tubos distintos y por enzimas diferentes. Así, la reacción de RT tiene lugar mediante el kit *GeneAmp RNA PCR Kit* (Perkin-Elmer), que utiliza el enzima MLV-RTasa,

mientras que la reacción de PCR, al igual que en los experimentos de RT-PCR semicuantitativa, se lleva a cabo con el kit *Ampli Taq Gold<sup>TM</sup>* (Perkin-Elmer).

RT: (vol. final 20  $\mu$ l)

	<u>Volumen</u>	<u>Concentración final</u>
Cl <sub>2</sub> Mg	4 $\mu$ l	5 mM
10X PCR Buffer	2 $\mu$ l	1X
dNTP	8 $\mu$ l	1 mM
RNase Inhibitor	1 $\mu$ l	1 U/ $\mu$ l
RNA	*	1 $\mu$ g RNA
Oligo dT	1 $\mu$ l	2.5 $\mu$ M
RTasa	1 $\mu$ l	2.5 U/ $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	hasta 20 $\mu$ l	

Incubar los tubos 10' a temperatura ambiente y a continuación introducir en el termociclador con el siguiente programa:



Normalmente, el porcentaje de eficiencia de RT para un método "two step" RT-PCR está alrededor del 20-35%. El porcentaje de eficiencia para la reacción de RT se calcula según la fórmula: %RT=ng cDNA sintetizado/ng RNA,

llevando a cabo la reacción de RT en presencia de 10  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ] dCTP (3000 Ci/mmol; 10 mCi/ml). Así, los porcentajes de eficiencia de RT calculados en los distintos métodos de RT-PCR vistos hasta ahora son:

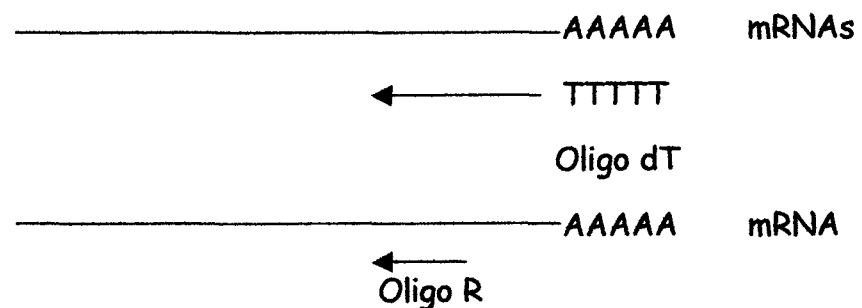
1.- RT-PCR semicuantitativa (*Superscript Rnase H RTasa*).

$$\%RT=27\pm 1.9 \text{ (media}\pm\text{SE para } n=7\text{)}$$

2.- RT-PCR competitiva (*GeneAmp RNA PCR kit*).

$$\%RT=32\pm 1.6$$

Una mejora adicional en la eficiencia de RT la supone realizar la reacción de RT con el oligo *reverse* (R1-R o R2-R) en lugar de con Oligo dT, ya que de esta forma se consigue que toda la maquinaria biosintética se concentre en retrotranscribir sólo y exclusivamente el mRNA de interés.



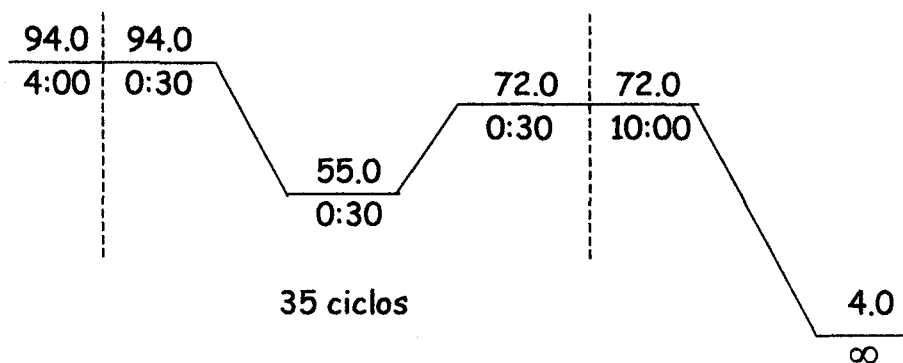
El porcentaje de eficiencia de RT calculado en este caso será:

$$\%RT=67\pm 1.2$$

PCR: (vol. final 50  $\mu$ l)

	<u>Volumen</u>	<u>Concentración final</u>
10X PCR Buffer	5 $\mu$ l	1X
Cl <sub>2</sub> Mg	4 $\mu$ l	2mM
dNTP	4 $\mu$ l	0.2 mM
cDNA (RT)	10 $\mu$ l	
Oligo F	1 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
Oligo R	1 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
IS (*)	10 $\mu$ l	
AmpliTaq Gold DNA Pol	0.25 $\mu$ l	1.25 U/reacción
ddH <sub>2</sub> O	hasta 50 $\mu$ l	

(\*) La concentración del DNA competidor interno (IS) añadida a cada tubo varía según una dilución seriada desde  $64 \times 10^6$  moléculas hasta  $0.5 \times 10^6$  moléculas.



b) "One step" RT-PCR.

En esta modalidad de RT-PCR, tanto la reacción de RT como la amplificación por PCR son llevadas a cabo en el mismo tubo por el enzima Tth DNA polimerasa. Esta polimerasa termoestable presenta dos actividades: 1)

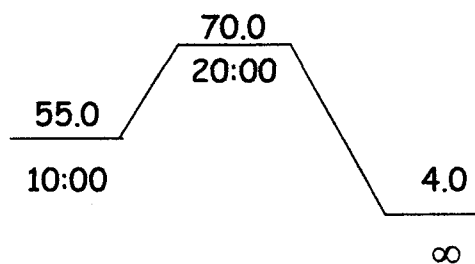
actividad retrotranscriptasa, catalizando la formación de cDNA a partir de un mRNA molde en presencia de iones  $Mn^{2+}$  y 2) actividad DNA polimerasa en presencia de iones  $Mg^{2+}$ .

Esta variante de RT-PCR presenta varias ventajas:

- Reduce el tiempo requerido. El menor número de pipeteos necesarios reduce significativamente el tiempo para llevar a cabo la reacción de RT-PCR, eliminando además el error producido en el pipeteo.
- Reduce el riesgo de contaminación. Todo el proceso tiene lugar en el mismo tubo, evitando transferencias de volumen de un tubo a otro.
- Mejora la sensibilidad y especificidad del proceso de síntesis de cDNA. La reacción de RT ocurre a alta temperatura, por lo que se eliminan problemas debidos a la estructura secundaria del RNA y se evitan falsos positivos.

RT: (vol. final 20  $\mu$ l)

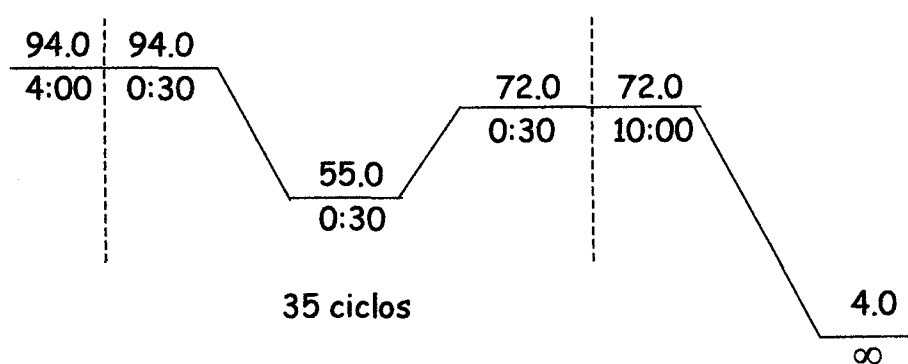
	<u>Volumen</u>	<u>Concentración final</u>
10X RT Buffer	2 $\mu$ l	1X
$Cl_2Mn$	0.8 $\mu$ l	1 mM
dNTP	4 $\mu$ l	0.2 mM
RNA	*	100 ng. RNA
Oligo-R	1 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
Tth DNA Pol	0.4 $\mu$ l	5 U/ $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	hasta 20 $\mu$ l	



La eficiencia de RT que se consigue con este método se calcula en  $95 \pm 1.1$

PCR: (vol. final 50  $\mu$ l)

	<u>Volumen</u>	<u>Concentración final</u>
5X PCR Buffer	10 $\mu$ l	1X
Cl <sub>2</sub> Mg	1.5 $\mu$ l	2 mM
Oligo-F	1 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
IS	10 $\mu$ l	
cDNA (RT)	20 $\mu$ l	
ddH <sub>2</sub> O	7.5 $\mu$ l	



### ***Técnicas electroforéticas.***

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

El gel de agarosa se prepara en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2mM) conteniendo 0.5 µg/ml de Bromuro de Etidio. La electroforesis ocurre durante 45 minutos a un voltaje de 90 Volts. 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).

#### **2. Electroforesis capilar.**

Los productos de PCR se cuantifican mediante análisis fluorescente en un equipo ABIPRISM™ 310 Genetic Analyzer (PE-Applied Biosystem, UK).

Después de la amplificación por PCR, una alícuota de cada muestra (1 µl) se diluye 1/20 con 18.5 µl de formamida y 0.5 µl de GeneScan™-500 TAMRA™ Size Standard (Applied Biosystem, Warrington, UK). Se desnaturalizan durante 3 minutos a 95 °C y se inyectan en el analizador genético.

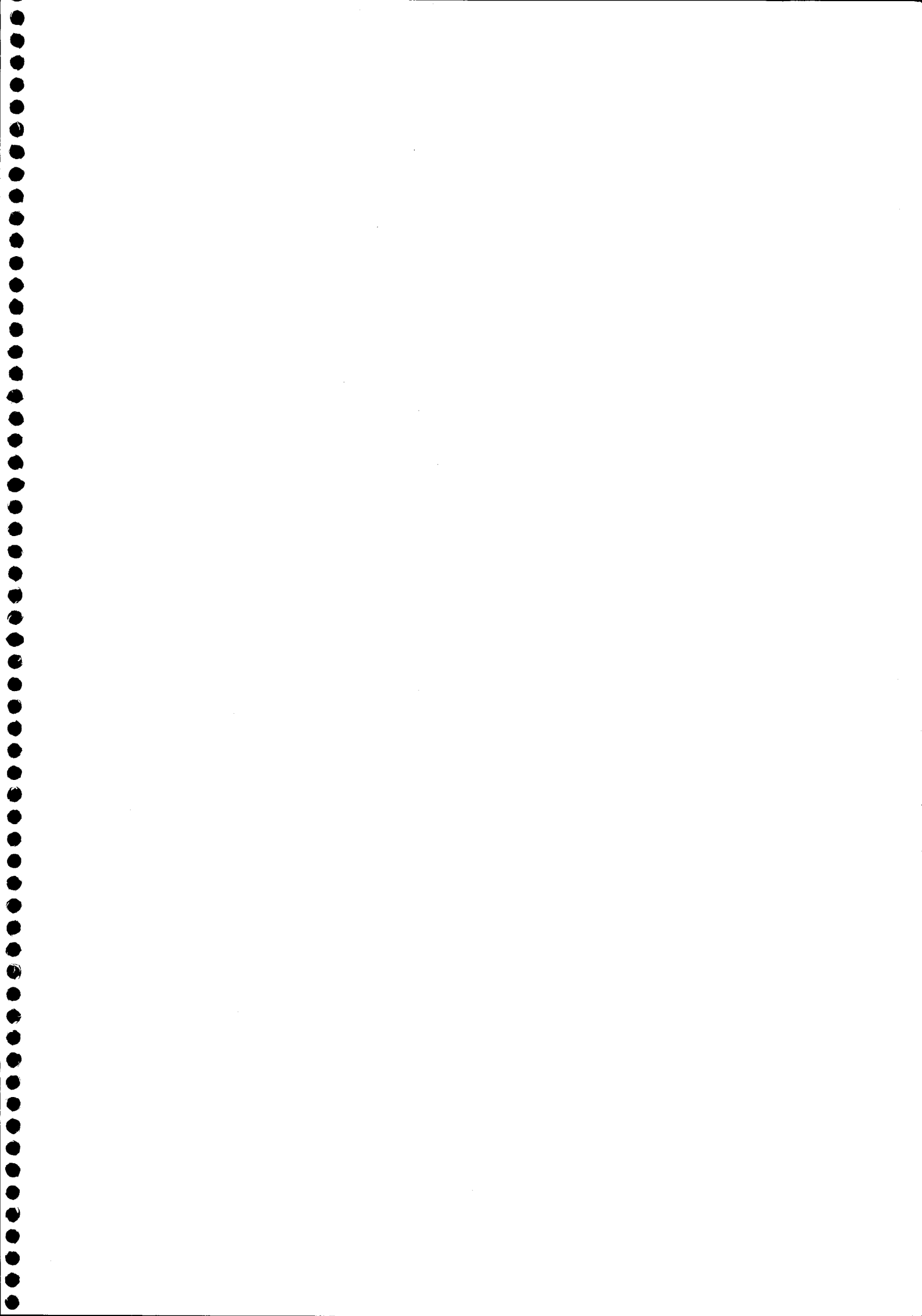
La electroforesis capilar tiene lugar en un capilar de sílice de 47 cm de longitud y 50 µm de diámetro que contiene como fase estacionaria el polímero



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).

#### *IV. RESULTADOS*



En este trabajo experimental nos hemos centrado en cuantificar mediante distintos métodos de RT-PCR los niveles de mRNA de los isoenzimas 1 y 2 de la 5 $\alpha$ -Reductasa, en distintos tejidos y en diferentes situaciones experimentales. Para ello hemos utilizado 1) técnicas de RT-PCR semicuantitativa, en las que referimos la expresión de un mRNA problema a un gen de expresión constitutiva como es el gen de la GAPDH, y 2) técnicas de RT-PCR cuantitativa, en sus dos modalidades de "two step" y "one step" RT-PCR, en las que se utiliza un patrón interno en forma de DNA competidor, de concentración conocida, y que se amplifica con los mismos cebadores que lo hace el cDNA problema.

#### *Diseño racional de oligonucleótidos para PCR.*

En primer lugar, se hizo una búsqueda en GeneBank® de las secuencias de nucleótidos correspondientes a los isoenzimas tipo 1 y tipo 2 de la 5 $\alpha$ -Reductasa de rata, así como la secuencia del gen de la GAPDH que se utilizará en los ensayos de RT-PCR semicuantitativa, utilizando el motor de búsqueda SRS 5.0 (Sequence Retrieval System).

Se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar cada uno de los dos isoenzimas de la 5 $\alpha$ -Reductasa así como un fragmento del gen de la GAPDH de acuerdo con las características descritas en la sección *Material y Métodos* de esta tesis. El diseño de los oligonucleótidos se hizo utilizando el programa Prophet®.

Las secuencias de los oligonucleótidos seleccionados se someten a una búsqueda de homología de secuencia mediante el algoritmo BLAST para evitar ampliaciones inespecíficas.

Así, las secuencias de los oligonucleótidos seleccionados son:

<i>Nombre</i>	<i>Secuencia (5'-3')</i>	<i>Tamaño (p.b.)</i>
R1-F	GAGATATTCAGCTGAGACCC *(TET)	185
R1-R	TTAGTATGTGGGCAGCTTGG	
R2-F	ATTTGTGTGGCAGAGAGAGG *(HEX)	192
R2-R	TTGATTGACTGCCTGGATGG	
GAPDH-F	TGCCAAGGCTGTGGGCAAGG *(6-FAM)	199
GAPDH-R	GCTTCACCACCTTCTTGATG	

***Amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados.***

Se realizaron los primeros ensayos de amplificación con los oligonucleótidos diseñados para comprobar su especificidad. El tejido de elección para realizar estos primeros ensayos fue la próstata ya que expresa ambos tipos de isoenzimas de la 5 $\alpha$ -Reductasa. Los resultados de la amplificación de los distintos cDNAs, así como la co-amplificación de los tres cDNAs se muestran en las figuras 1-4.

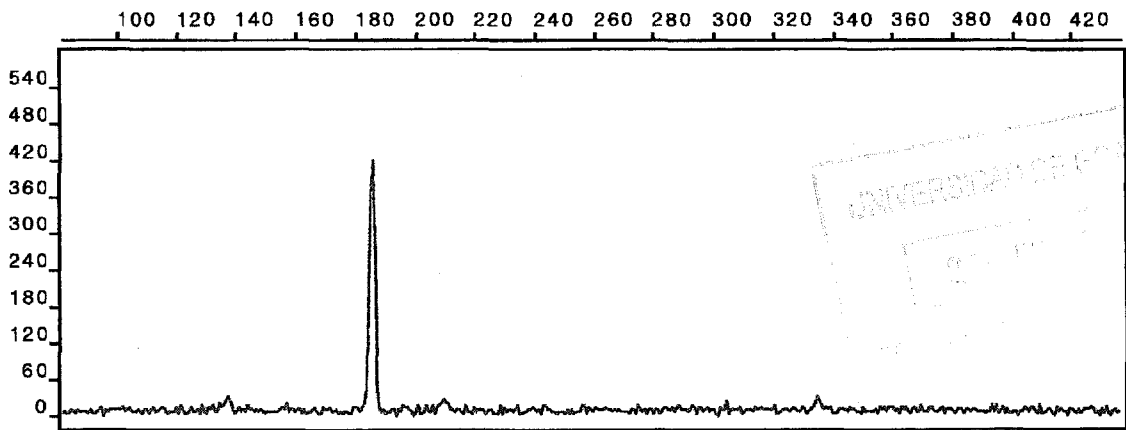


Fig. 1. Amplificación del cDNA de la 5 $\alpha$ -R1

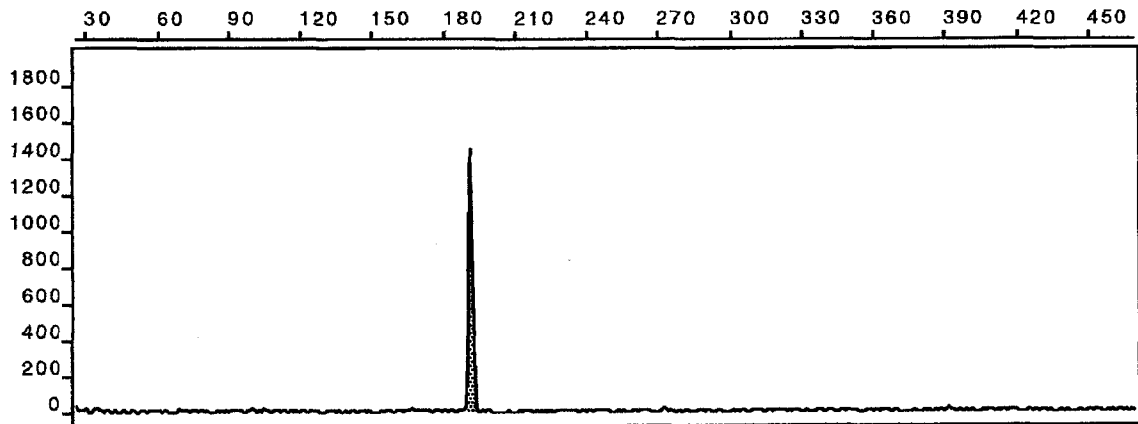


Fig. 2. Amplificación del cDNA de la 5 $\alpha$ -R2

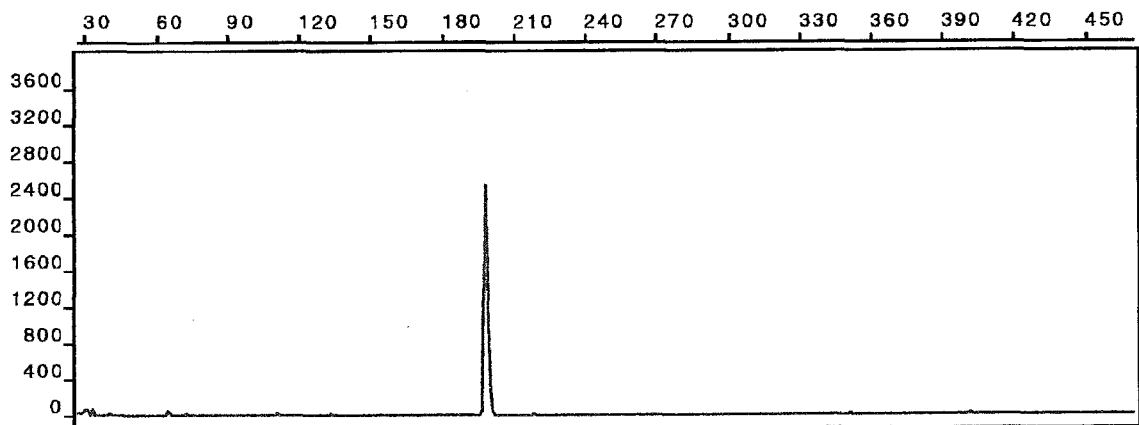


Fig. 3. Amplificación del cDNA de la GAPDH

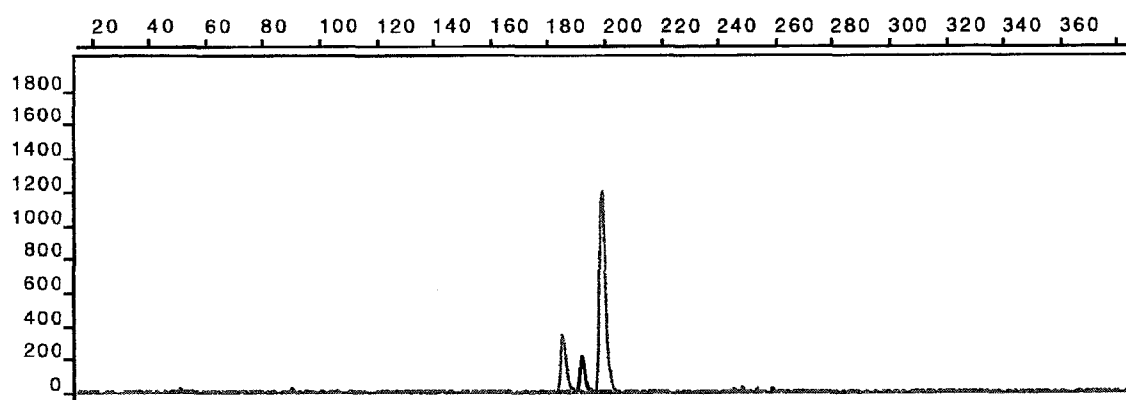


Fig. 4. Co-amplificación de los distintos cDNAs

Una vez comprobada la especificidad de los distintos cebadores se procedió a optimizar las condiciones de PCR, concentración óptima de  $Cl_2Mg$ , cDNA, oligonucleótidos, temperatura óptima de anillamiento de los cebadores ( $T_m$ ) tiempo de elongación, hasta establecer las condiciones descritas en la sección de *Material y Métodos*.

Como ya se mencionó con anterioridad, en las técnicas de RT-PCR semicuantitativa es muy importante establecer la fase exponencial de amplificación para cada mRNA que se estudie ya que es ésta fase exponencial la que hay que considerar para realizar la cuantificación. Así, determinamos la fase exponencial de amplificación de los distintos cDNAs y el resultado se muestra en las figuras 12-14.

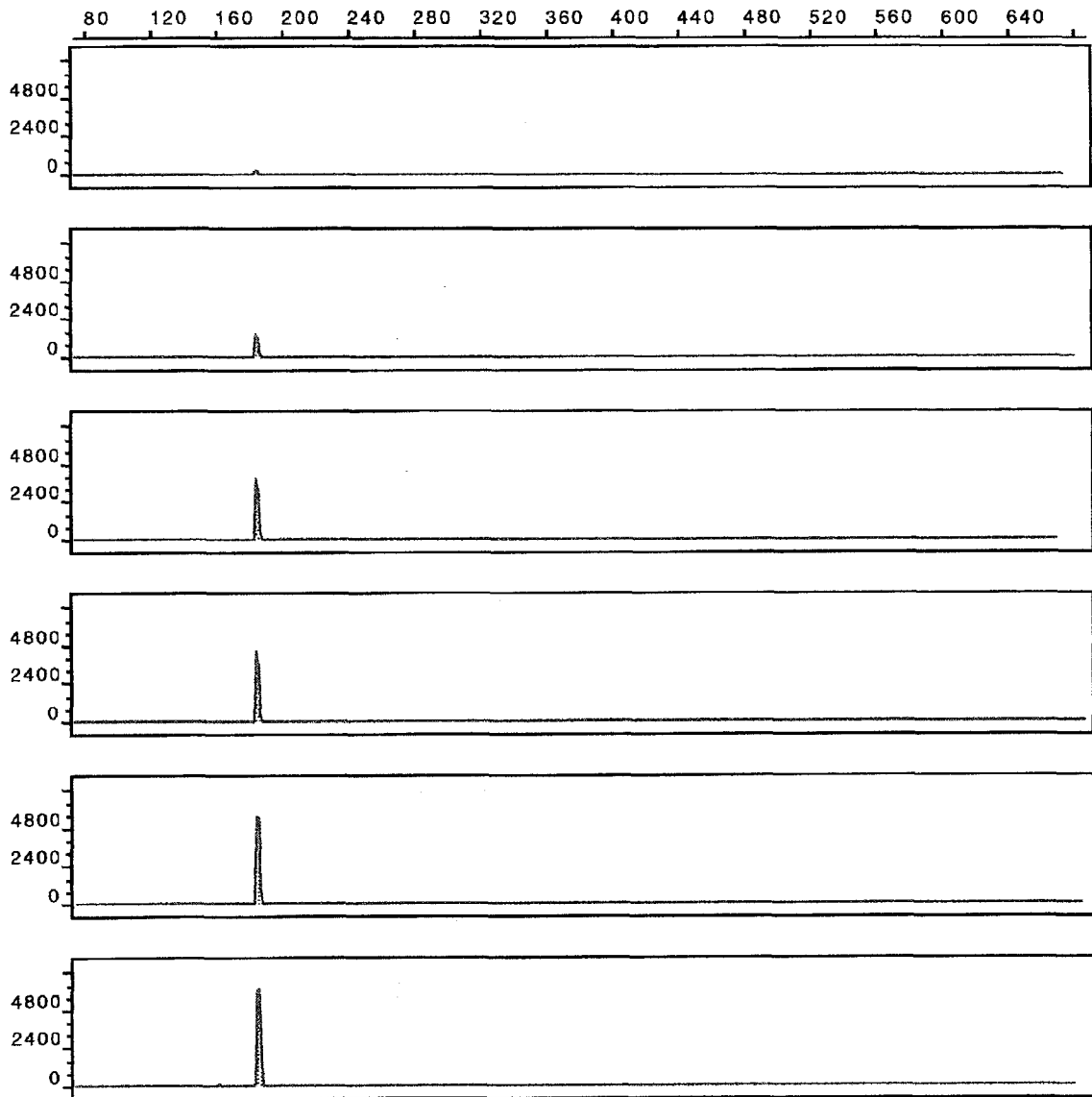


Fig. 5. Determinación de la fase exponencial de amplificación de  $5\alpha$ -R1 en los ciclos 28, 30, 32, 34, 36 y

38.



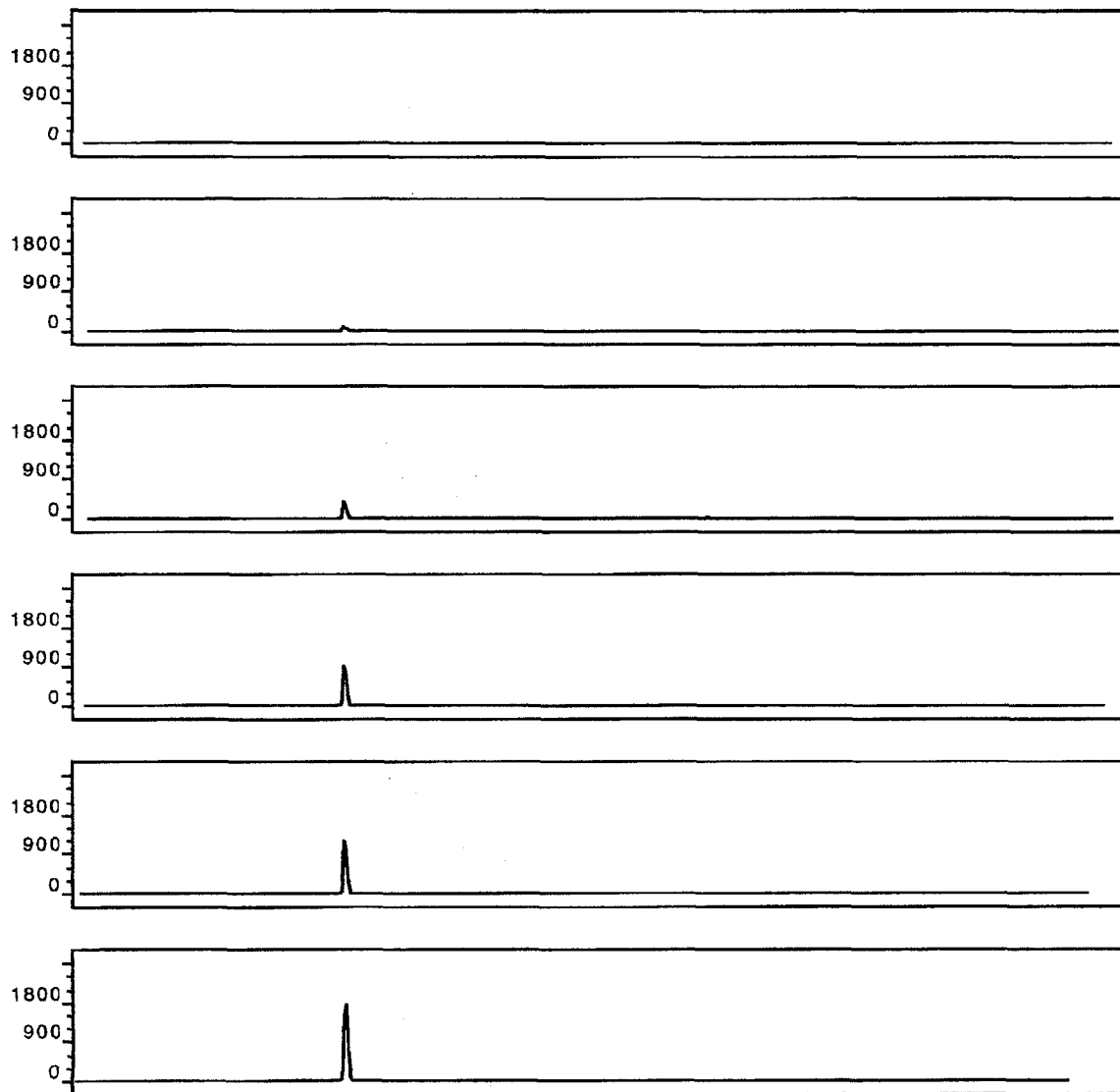


Fig. 6. Determinación de la fase exponencial de amplificación de  $5\alpha$ -R2 en los ciclos 26, 28, 30, 32, 34 y

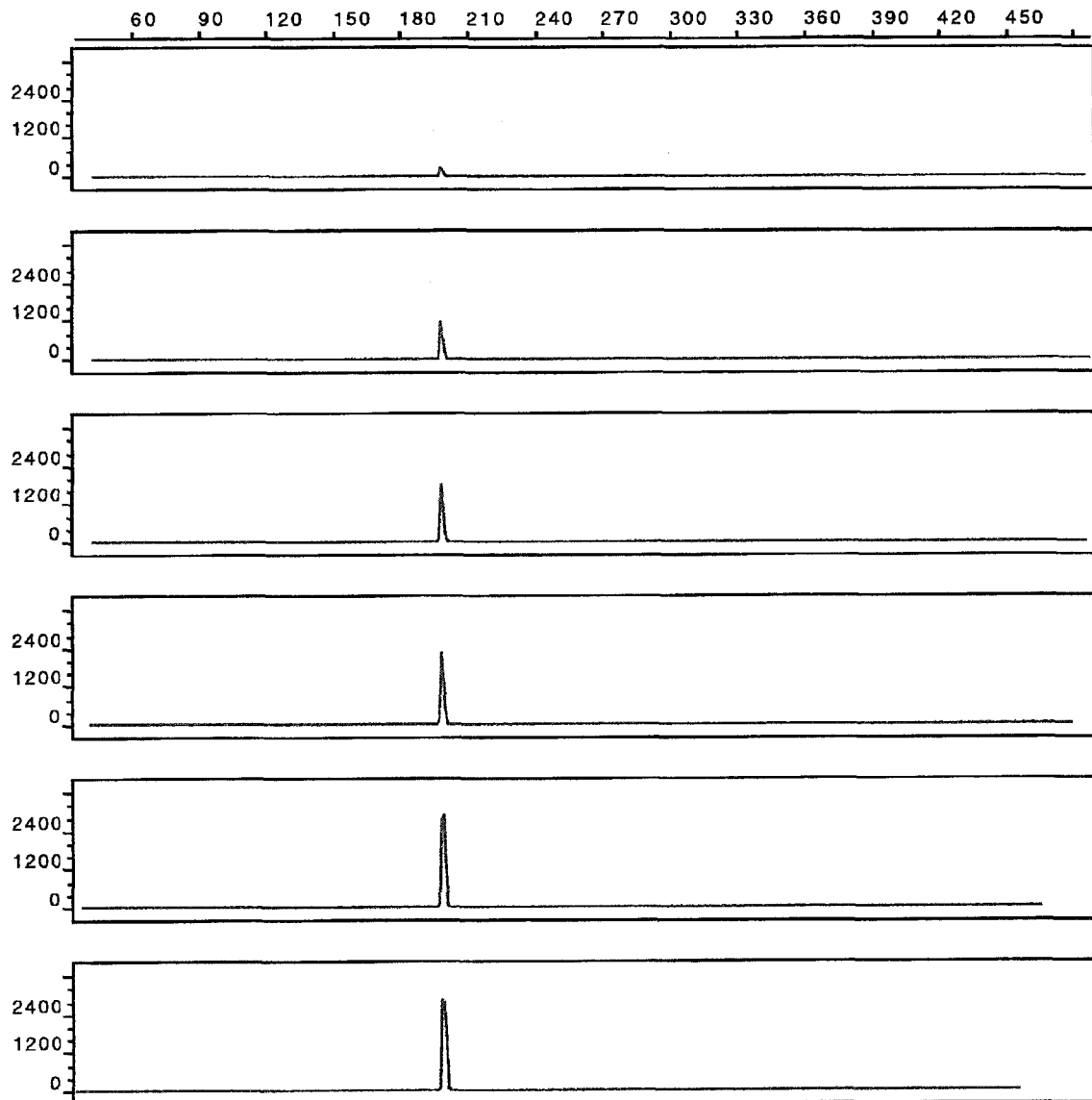


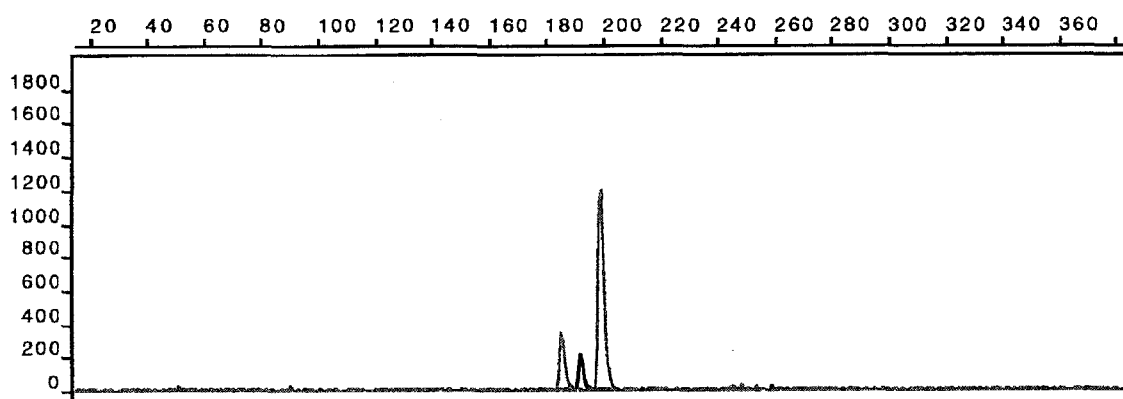
Fig. 7. Determinación de la fase exponencial de amplificación de GAPDH en los ciclos 28, 30, 32, 34, 36 y

38

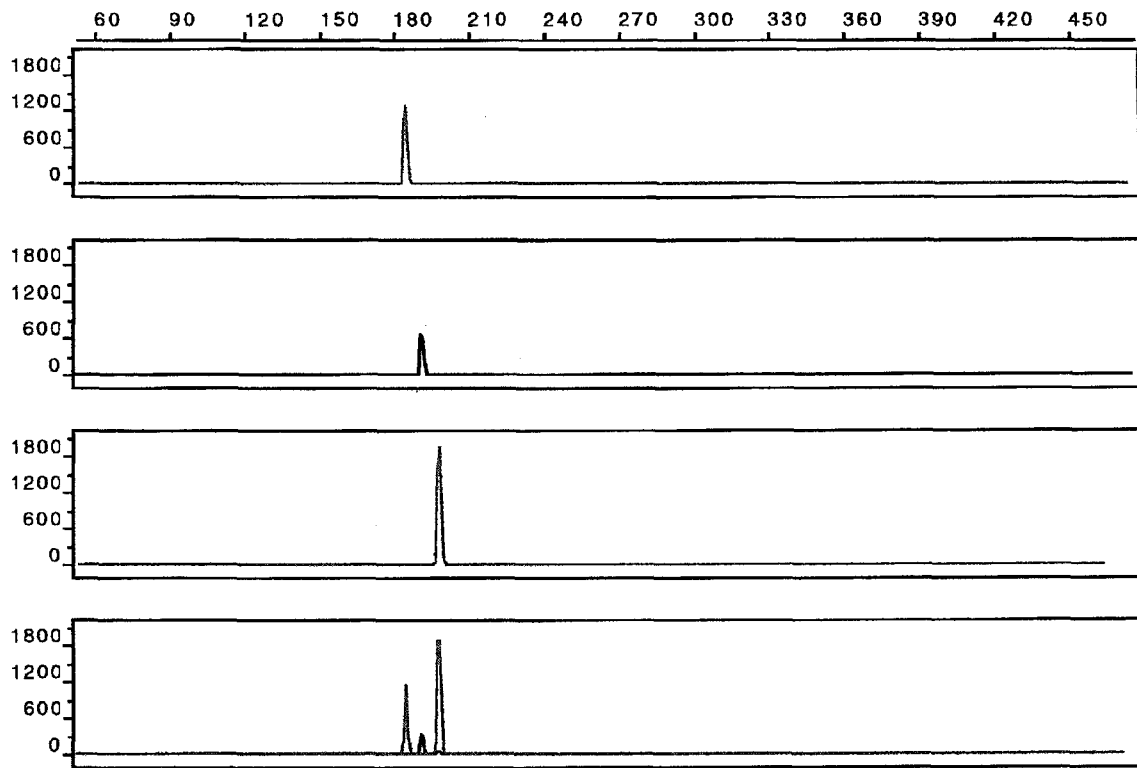
A la vista de estos resultados se establece la fase exponencial de amplificación común para los tres cDNA en 32 ciclos.

*Determinación de los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en próstata de rata mediante RT-PCR semicuantitativa con distintos fluoróforos.*

Los distintos grupos experimentales que se estudiaron fueron: Ratas intactas (I), ratas castradas (C), ratas intactas tratadas con testosterona (I+T) y ratas castradas tratadas con testosterona (C+T). La determinación de los niveles de mRNA en los distintos grupos experimentales se muestra en las figuras 8-11.



*Fig. 8. RT-PCR semicuantitativa de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en próstata de rata I*



*Fig. 9. RT-PCR semicuantitativa de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en próstata de rata C*

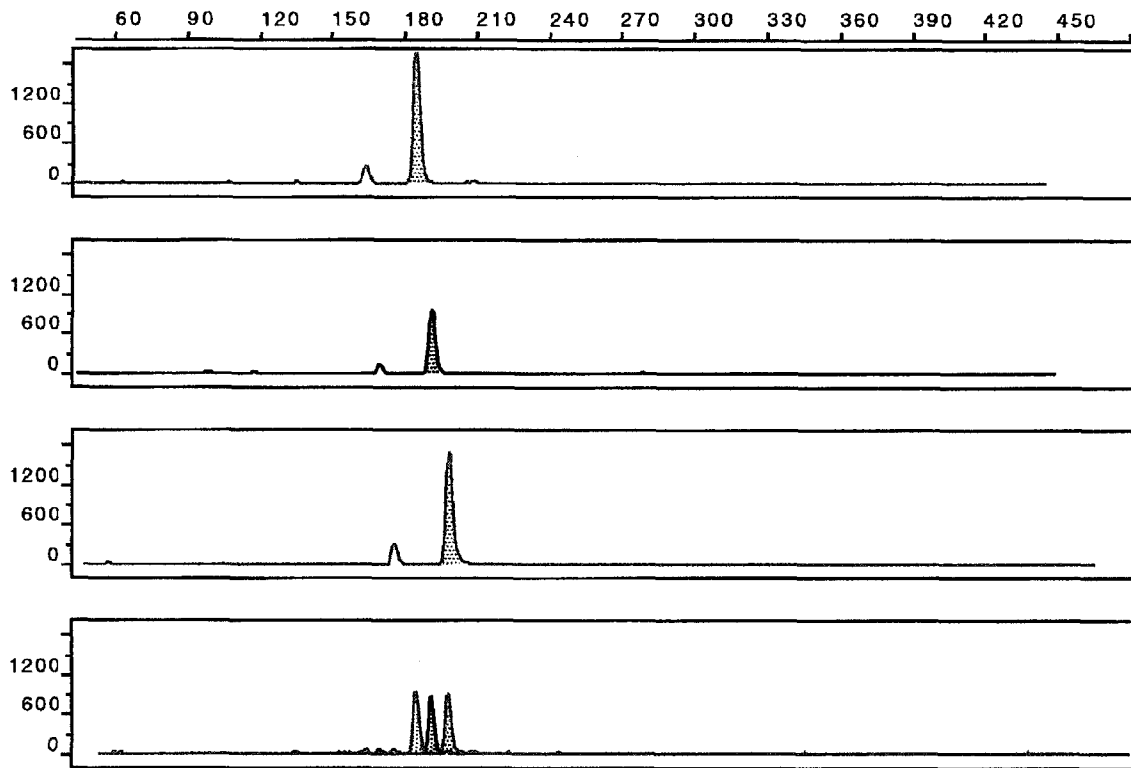


Fig. 10. RT-PCR semicuantitativa de  $5\alpha$ -R1 y  $5\alpha$ -R2 en próstata de rata I+T

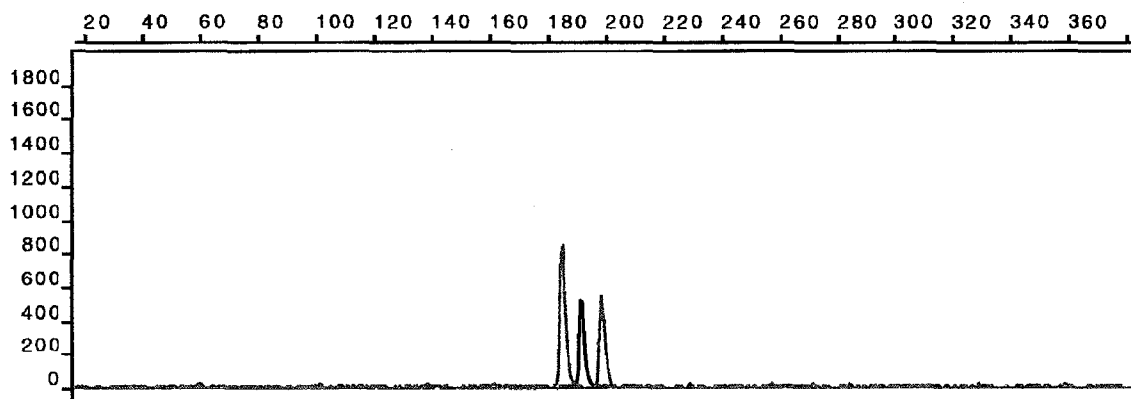


Fig. 11. RT-PCR semicuantitativa de  $5\alpha$ -R1 y  $5\alpha$ -R2 en próstata de rata C+T

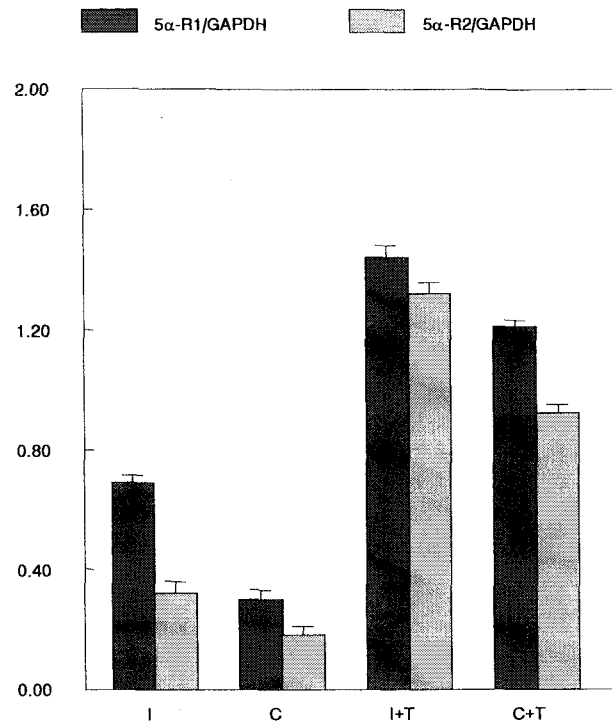


Fig. 12. Niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 y  $5\alpha$ -R2 en próstata de rata.

Como cabría esperar, los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 disminuyeron en ratas castradas (C) con respecto a intactas (I). Después del tratamiento con testosterona, los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 aumentaron tanto en animales intactos (I+T) como en castrados (C+T), siendo este efecto más marcado en los animales I+T. De igual modo, los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R2 disminuyeron en animales C con respecto a animales I, y aumentaron significativamente después del tratamiento con T. Sin embargo, a la vista de los resultados de la fig. 12 es importante señalar que si bien el perfil de expresión de ambos isoenzimas es el esperado en los distintos grupos experimentales, en todos los casos el mRNA que aparece en mayor proporción es el de  $5\alpha$ -R1, cuando es bien conocido que el isoenzima más abundante en tejido prostático es el de  $5\alpha$ -R2.

La explicación a este fenómeno hay que buscarla en la distinta emisión de fluorescencia producida por la excitación de los fluoróforos con los que se encuentran marcados los oligonucleótidos *sentido*. Así la mayor intensidad de fluorescencia la presenta el fluoróforo 6-FAM (azul), seguido por el TET (verde) y por último el HEX (negro). Esta diferencia en la intensidad de fluorescencia está produciendo el falseamiento en los resultados que se observa en la figura 12.

Puesto que la técnica de electroforesis capilar permite diferenciar perfectamente entre dos productos de PCR que difieran en apenas un par de pares de bases (pb), y nuestros cDNAs problema se separan perfectamente por tamaño, la solución a este problema es marcar todos los cebadores *sentido* con el mismo fluoróforo, siendo el fluoróforo de elección el de mayor intensidad de fluorescencia, el 6-FAM (azul).

#### *Ensayo de comparación de cebadores.*

En las figuras 13 y 14 se muestran los resultados de dos ensayos paralelos de RT-PCR semicuantitativa en próstata de rata intacta (I) llevados en cabo en idénticas condiciones diferenciándose únicamente en el marcaje de los distintos cebadores *sentido*. Como puede verse en las figuras, la intensidad de fluorescencia del fluoróforo HEX (negro) es notablemente menor a la de los otros dos fluoróforos.

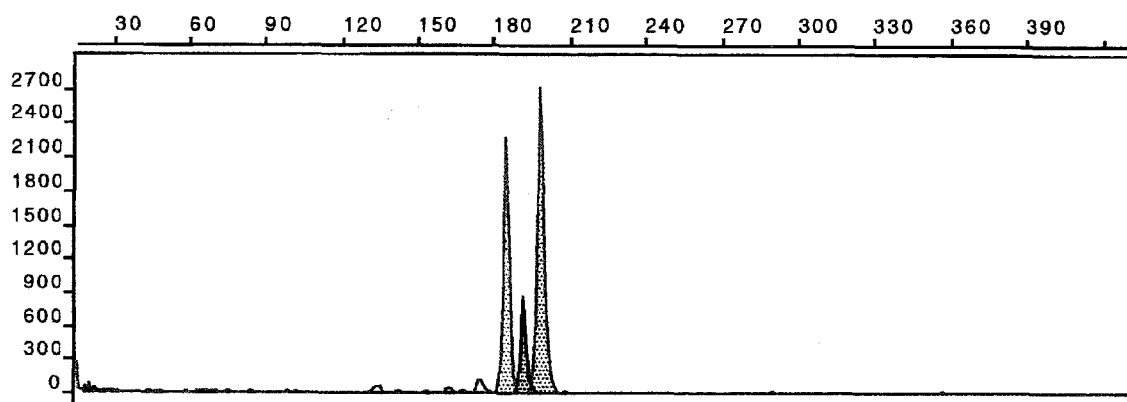


Fig. 13. RT-PCR semicuantitativa en próstata de rata I con los cebadores marcados con distintos fluoróforos

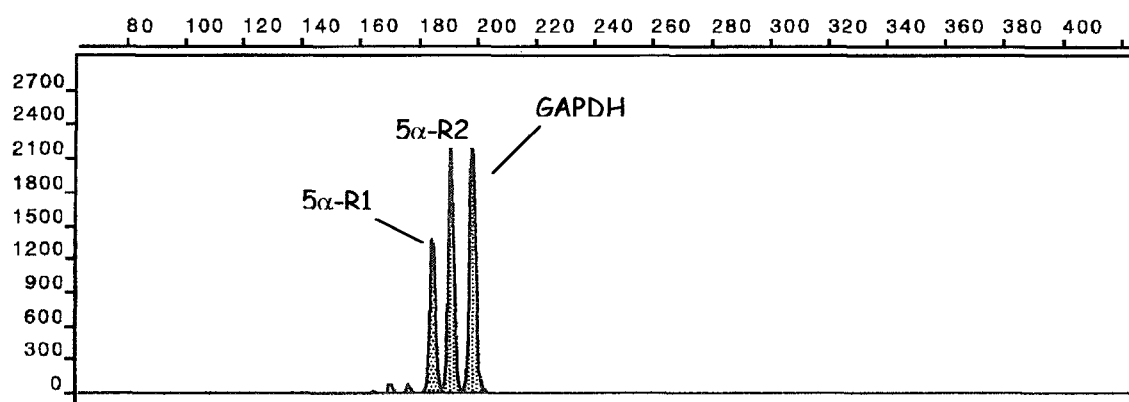


Fig. 14. RT-PCR semicuantitativa en próstata de rata I con los cebadores marcados con el fluoróforo 6-FAM

**Determinación de la fase exponencial de amplificación de  $5\alpha$ -R tipo 1, tipo 2 y GAPDH con los cebadores 6-FAM.**

En las figuras 15-17 se muestran los electroforegramas correspondientes a la determinación de la fase exponencial de amplificación para cada uno de los cDNAs objeto de estudio.



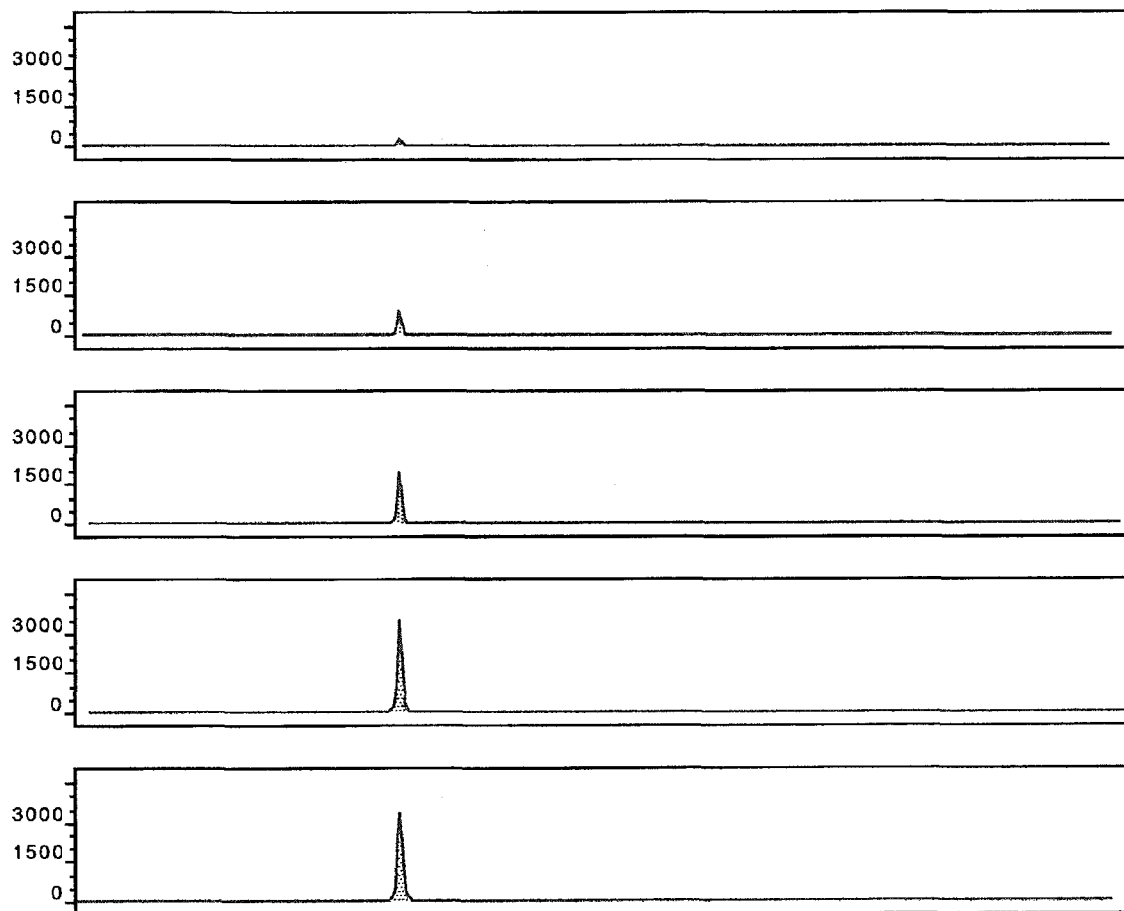


Fig. 15. Determinación de la fase exponencial de amplificación de  $5\alpha$ -R1 en los ciclos 30, 32, 34, 36 y 38

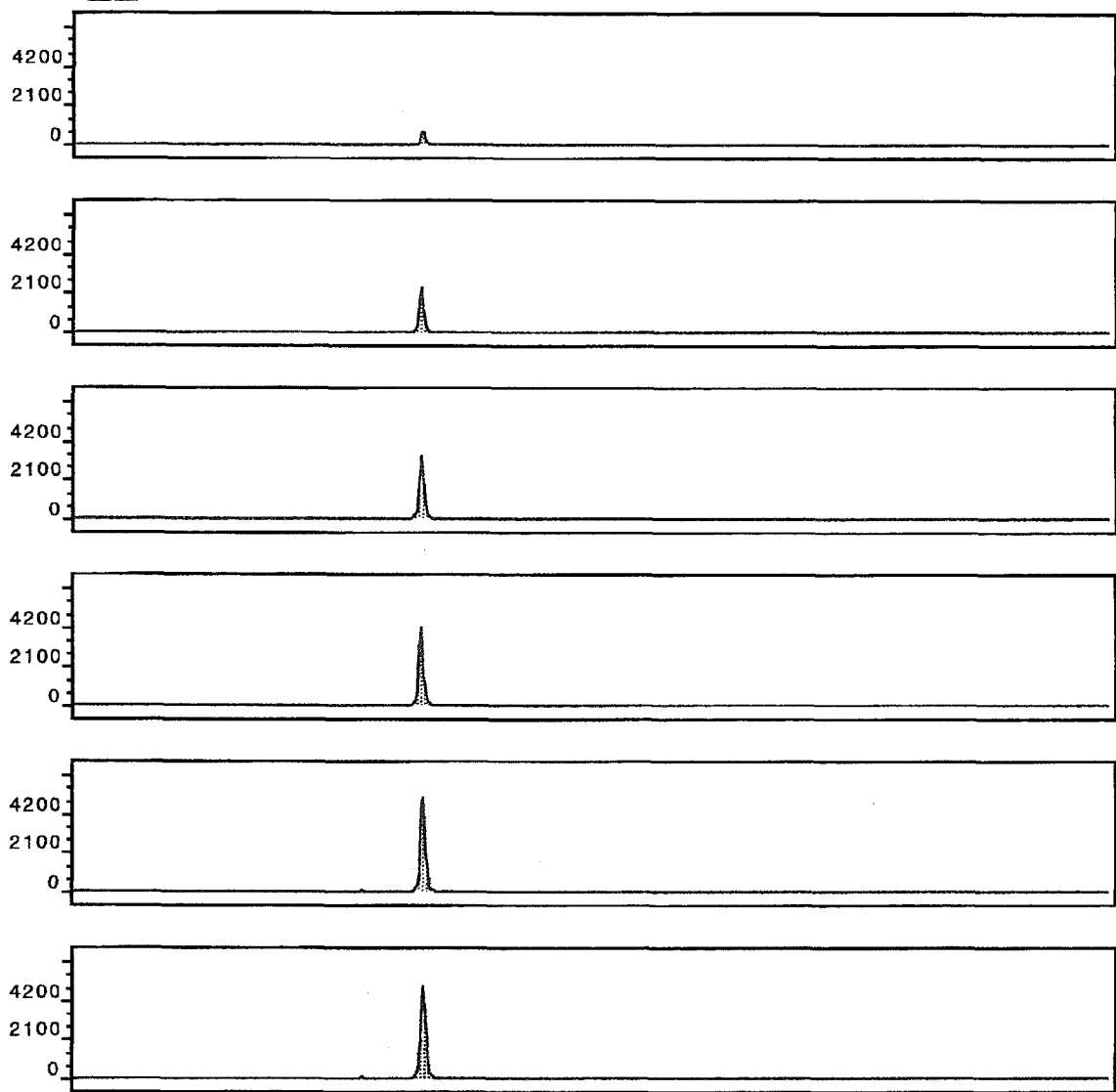


Fig. 16. Determinación de la fase exponencial de amplificación de 5a-R2 en los ciclos 28, 30, 32, 34, 36 y

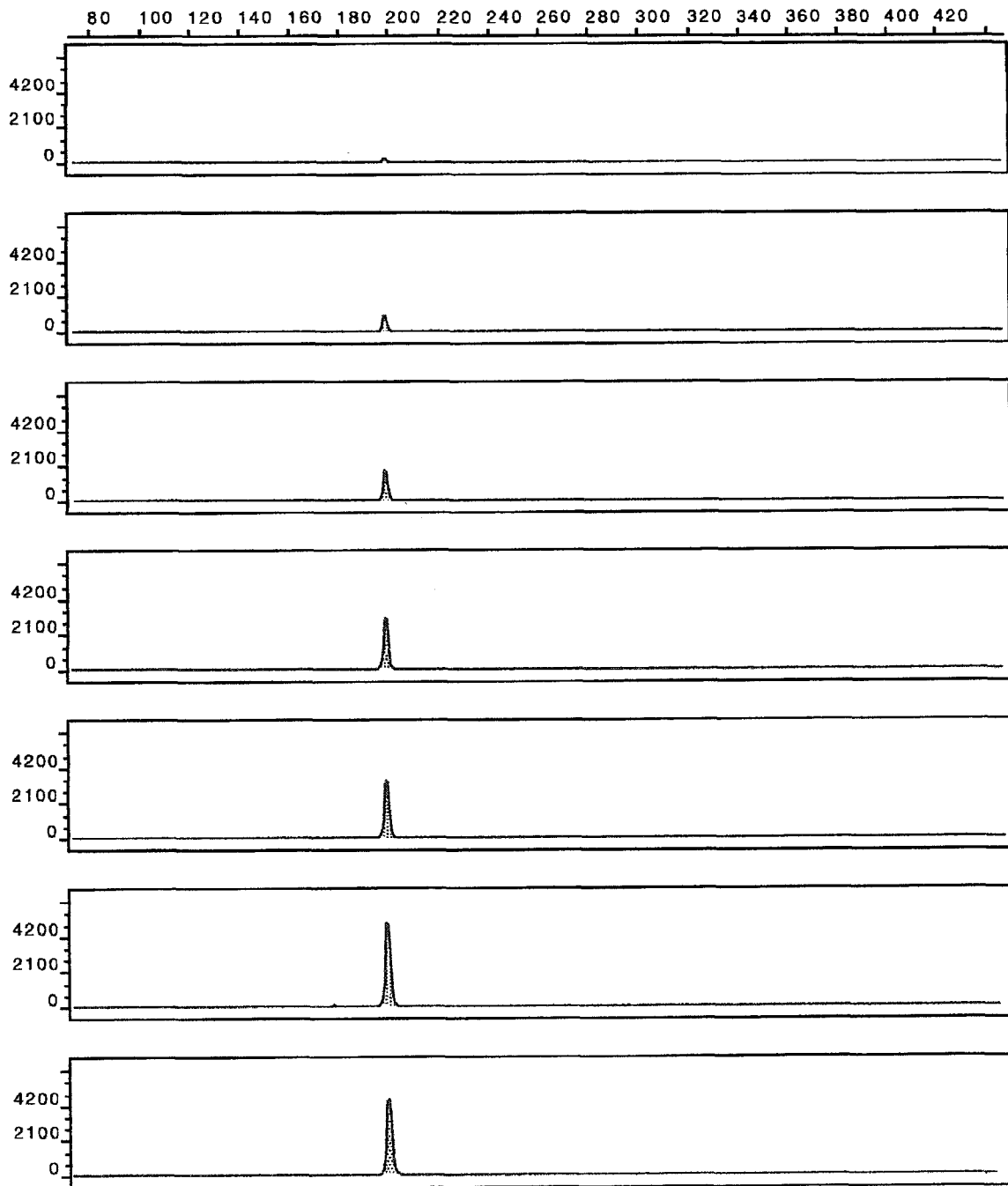
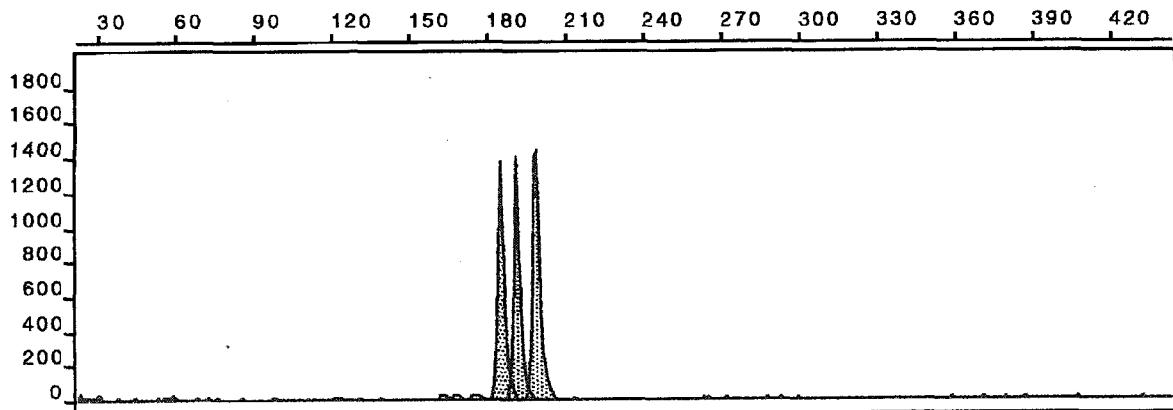


Fig. 17. Determinación de la fase exponencial de amplificación de GAPDH en los ciclos 28, 30, 32, 34, 36 y 38

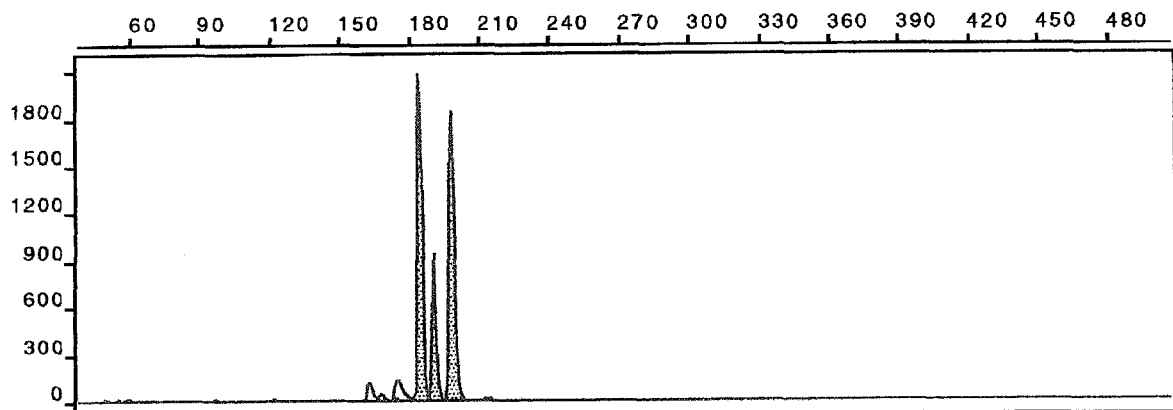
De nuevo, la fase exponencial común para los tres cDNAs en la cual hay que realizar la cuantificación es 32 ciclos.

***Determinación de los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en próstata de rata mediante RT-PCR semicuantitativa con el fluoróforo 6-FAM.***

Los grupos experimentales que se establecen son los siguientes: Ratas intactas (I), ratas castradas (C), ratas intactas tratadas con testosterona (I+T) y ratas castradas tratadas con testosterona (C+T) y ratas intactas tratadas con dihidrotestosterona (I+DHT). La determinación de los niveles de mRNA en los distintos grupos experimentales se muestra en las figuras 18-22.



*Fig. 18. RT-PCR semicuantitativa de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en próstata de rata I*



*Fig. 19. RT-PCR semicuantitativa de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en próstata de rata C*

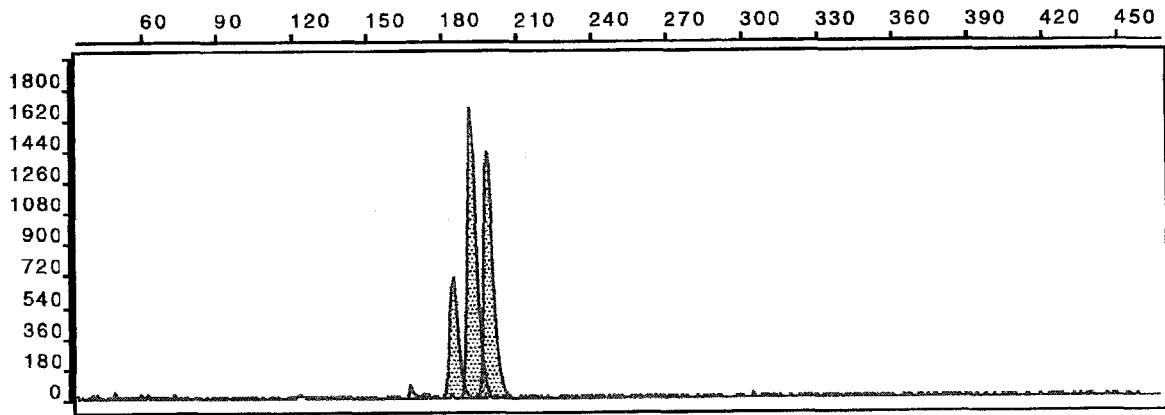


Fig. 20. RT-PCR semicuantitativa de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en próstata de rata I+T

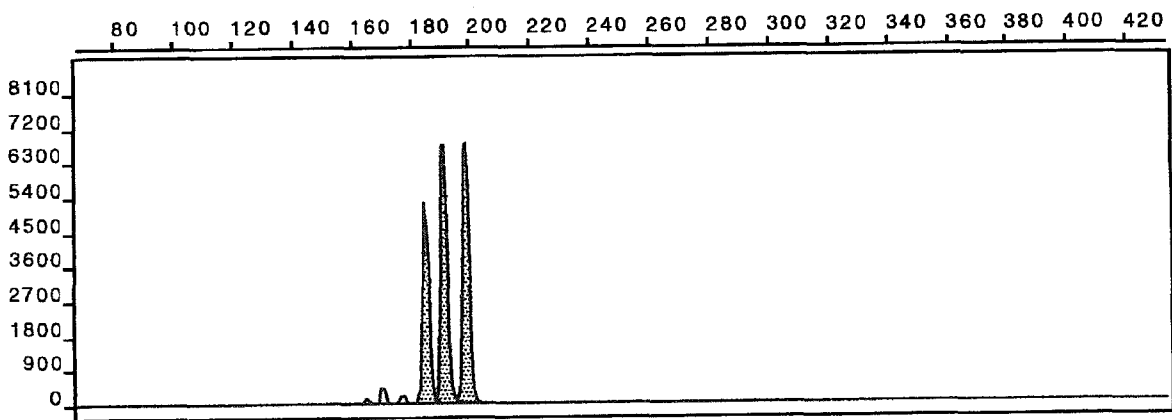


Fig. 21. RT-PCR semicuantitativa de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en próstata de rata C+T

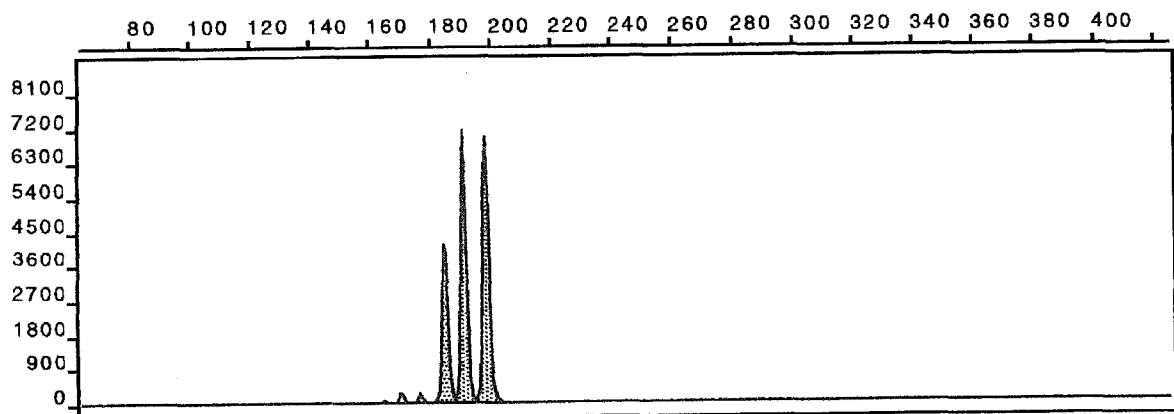


Fig. 22. RT-PCR semicuantitativa de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en próstata de rata I+DHT

En la figura 23 se representan los niveles de mRNA de ambos isoenzimas de la  $5\alpha$ -Reductasa en próstata de rata en las distintas situaciones experimentales estudiadas.

Los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1, en contra de lo que cabría esperar en un principio, se encuentran aumentados en animales castrados aunque de forma no significativa con respecto a animales intactos. Sorprendentemente, los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 se encuentran disminuidos en animales intactos y castrados tratados con T así como en los animales intactos tratados con DHT, en comparación con animales intactos. Como cabría esperar, los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R2 disminuyen significativamente en animales castrados con respecto a animales intactos. En animales intactos y castrados tratados con T los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R2 aumentan significativamente con respecto a sus correspondientes grupos sin tratamiento. Sin embargo, es llamativo que los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R2 en animales intactos tratados con DHT fueron ligeramente menores que en animales intactos, siendo éste un andrógeno mucho más potente que la T.

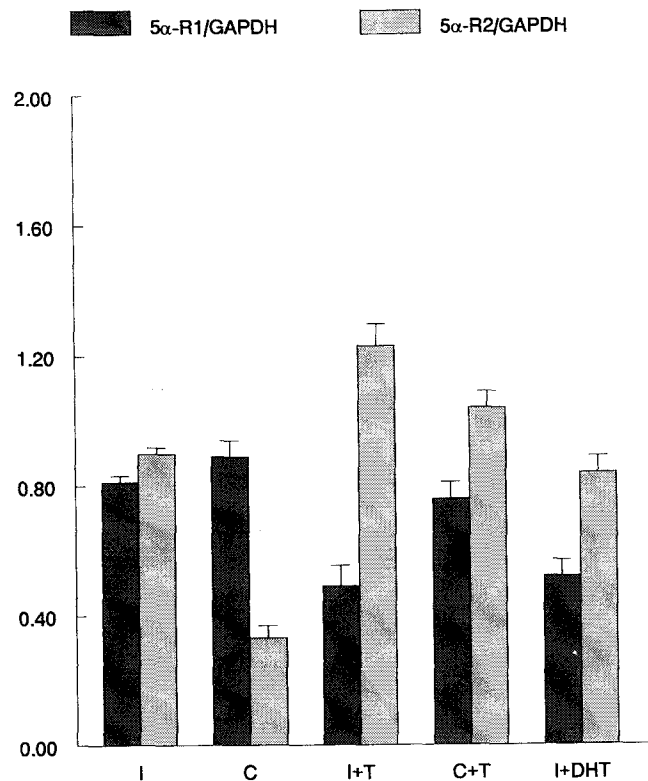


Fig. 23. Niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en próstata de rata en distintos estados androgénicos mediante RT-PCR semicuantitativa.

**Determinación de los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 en hígado de rata mediante RT-PCR semicuantitativa con el fluoróforo 6-FAM.**

Los grupos experimentales que se establecen son los siguientes: Ratas intactas (I), ratas castradas (C), ratas intactas tratadas con testosterona (I+T) y ratas castradas tratadas con testosterona (C+T) y ratas intactas tratadas con dihidrotestosterona (I+DHT). La determinación de los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 en los distintos grupos experimentales se muestra en las figuras 24-28. En todos los casos la amplificación del fragmento de 192 pb. correspondientes a 5 $\alpha$ -R2 fue negativa.

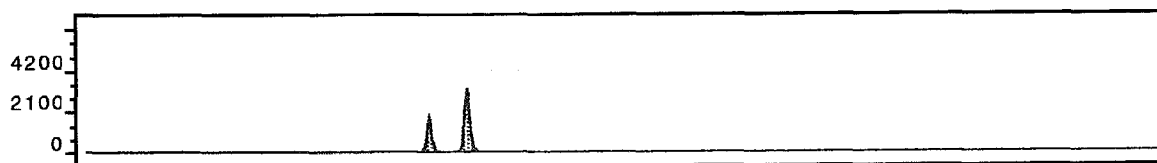


Fig. 24. RT-PCR semicuantitativa de 5 $\alpha$ -R1 en hígado de rata I

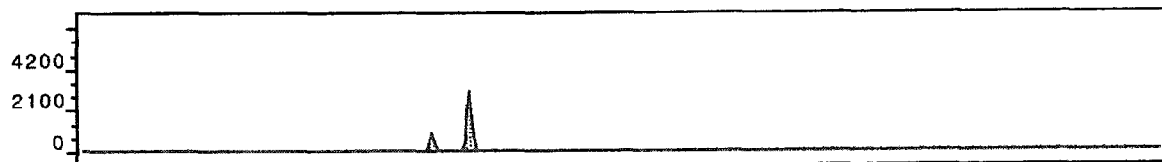


Fig. 25. RT-PCR semicuantitativa de 5 $\alpha$ -R1 en hígado de rata C

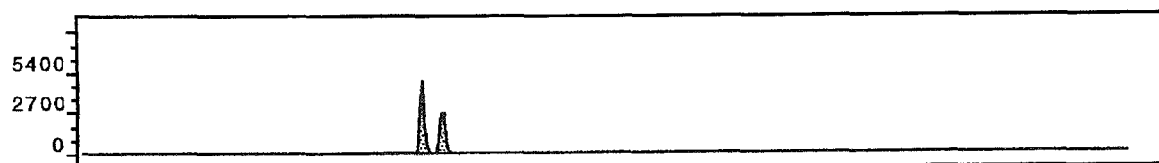


Fig. 26. RT-PCR semicuantitativa de 5 $\alpha$ -R1 en hígado de rata I+T

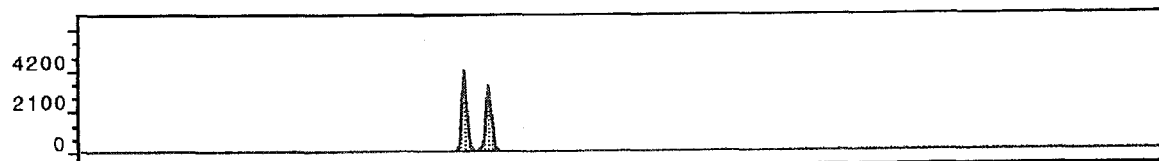


Fig. 27. RT-PCR semicuantitativa de 5 $\alpha$ -R1 en hígado de rata C+T



Fig. 28. RT-PCR semicuantitativa de 5 $\alpha$ -R1 en hígado de rata I+DHT

En la figura 29 se representan los niveles de mRNA del isoenzima tipo 1 de la 5 $\alpha$ -Reductasa en hígado de rata en las distintas situaciones experimentales estudiadas.



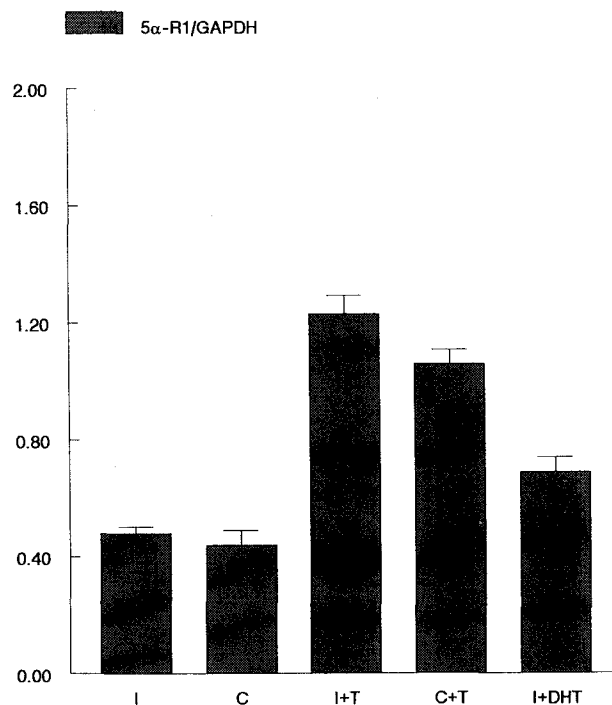


Fig. 29. Niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 en hígado de rata en distintos estados androgénicos mediante RT-PCR semicuantitativa

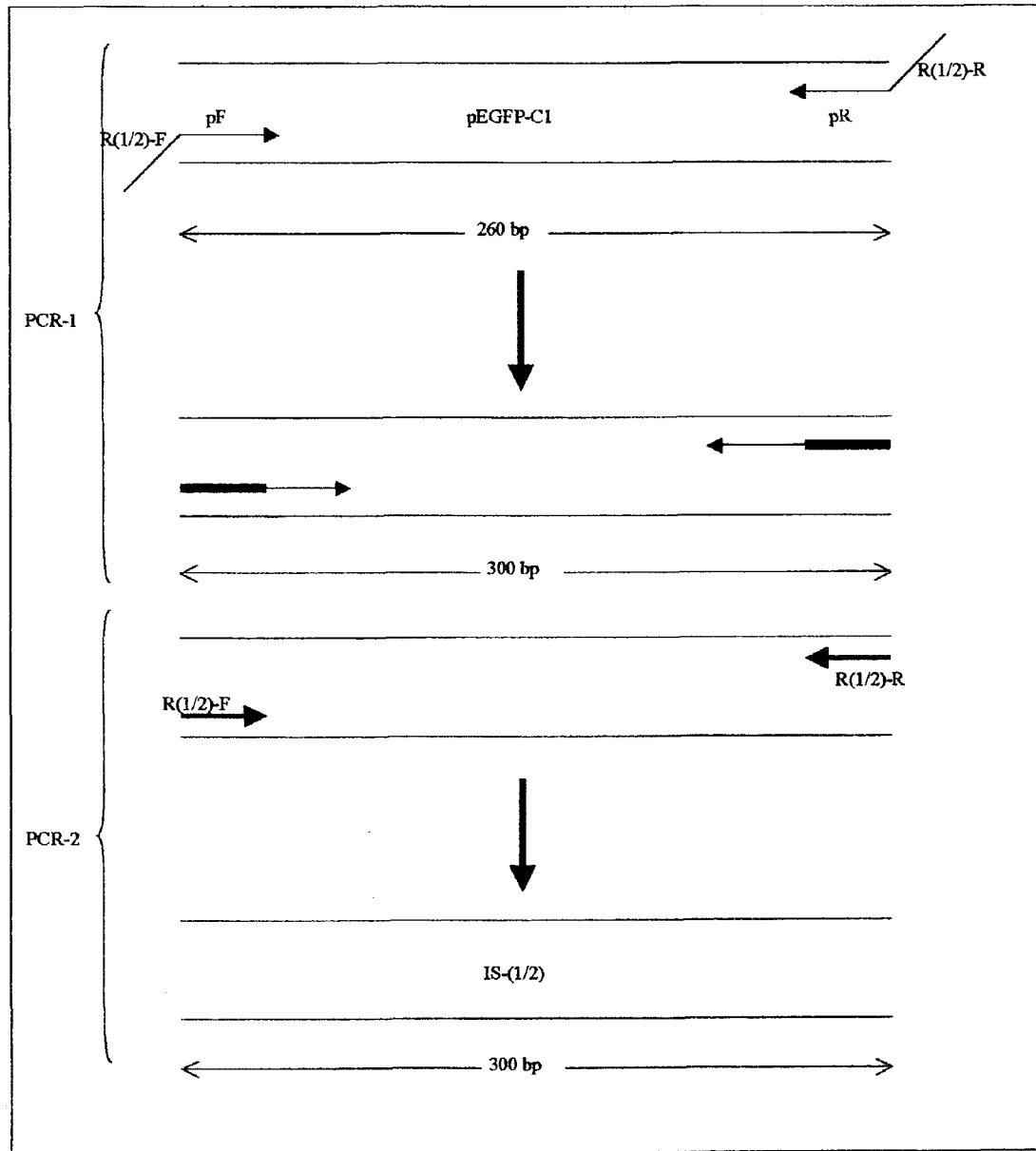
Los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 disminuyen aunque de forma no significativa en animales castrados con respecto a animales intactos. En animales intactos y castrados tratados con T, los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 aumentan significativamente con respecto a sus correspondientes grupos sin tratamiento, siendo este aumento mayor para los animales I+T. Por último, en animales intactos tratados con DHT, los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 aumentaron significativamente con respecto a animales intactos.

**Construcción de los estándar internos (IS) para RT-PCR competitiva.**

Como ya se indicó en la sección de *Material y Métodos* de esta tesis, la construcción de estas moléculas sintéticas de DNA se hace a partir de la secuencia del plásmido pEGFP-C1 mediante dos reacciones de PCR consecutivas, tal y como se muestra en la figura 30. Los cebadores diseñados para la construcción de ambos IS aparecen en la siguiente tabla:

<i>Nombre</i>	<i>Secuencia (5'-3')</i>	<i>Tamaño (p.b.)</i>
IS1-F	<b>GAGATATT</b> CAGCTGAGACCCACGTAAACGCCCAAGTTC	300
IS1-R	TTAGTATGTGGGCAGCTTGGTCTTGTAGTTGCCGTCGTCC	
IS2-F	<b>ATTTGTGTGGCAGAGAGAGG</b> ACGTAAACGGCCACAAGTTC	300
IS2-R	TTGATTGACTGCCTGGATGGTCTTGTAGTTGCCGTCGTCC	

(\*) En negrita se señala la región correspondiente a las secuencias de los cebadores que amplifican selectivamente cada uno de los isoenzimas de la 5 $\alpha$ -Reductasa.



*Fig. 30. Esquema de construcción de las moléculas de DNA competidoras. Se siguió el mismo esquema para la construcción de ambos IS.*

En la figura 31 se muestra el resultado de la primera PCR en el esquema de construcción de ambos IS. Como puede observarse, la amplificación con los cebadores de la tabla anterior produce dos fragmentos de 260 y 300 p.b. respectivamente.

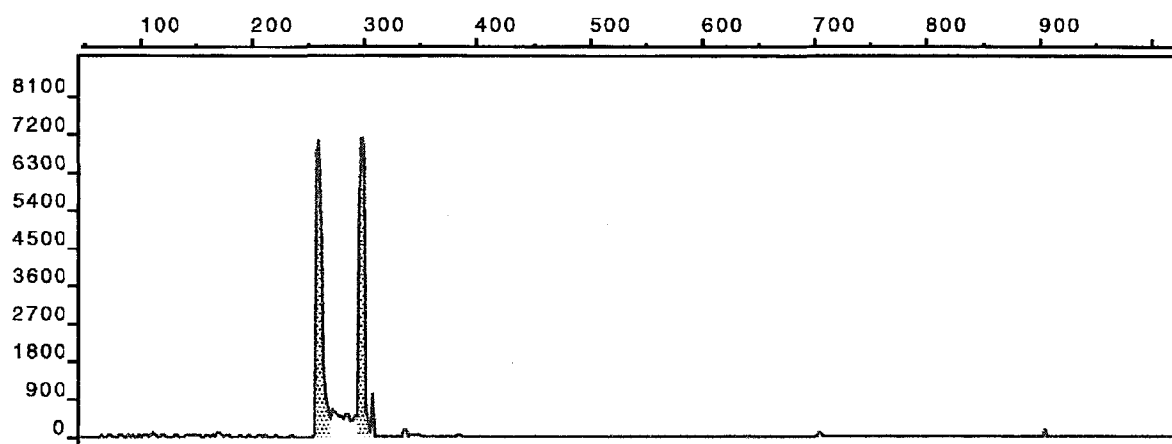


Fig. 31. Resultado de la 1ª PCR en el esquema de construcción de ambos IS.

A continuación se realiza una segunda PCR, en esta ocasión con los oligos específicos para cada isoenzima de la 5 $\alpha$ -Reductasa (R1-F/R1-R para el IS-1 y R2-F/R2-R para el IS-2). De esta forma se consigue amplificar selectivamente el fragmento de 300 p.b. que aparecía en la primera PCR (fig. 32).

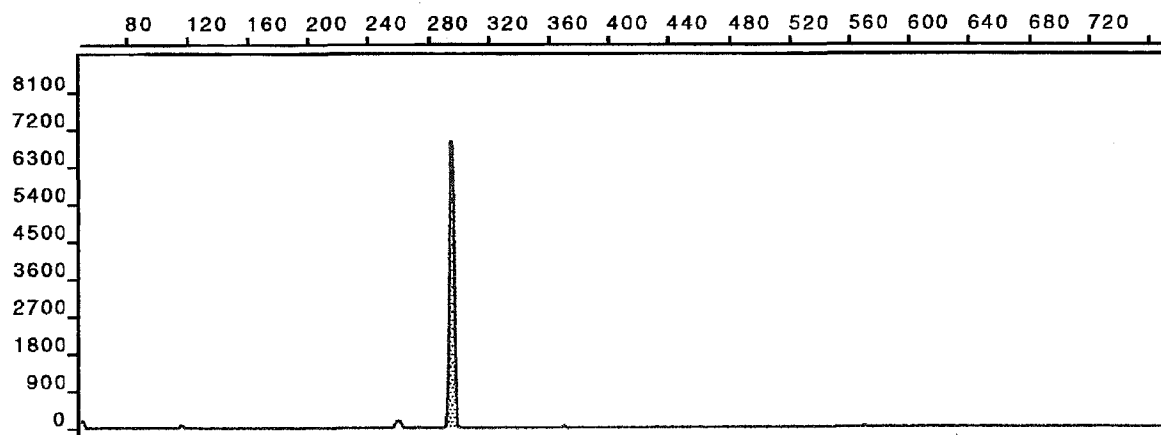
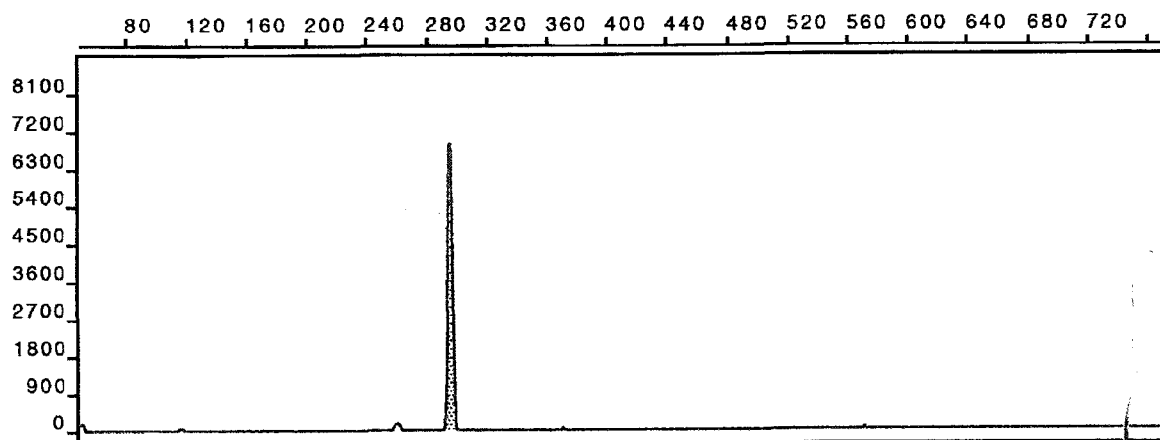


Fig. 32. Resultado de la 2ª PCR en el esquema de construcción de ambos IS.

Por último, el producto de PCR correspondiente a cada estándar interno se precipita con etanol, se purifica y se cuantifica por espectrofotometría a  $A_{260}/A_{280}$  nm. El resultado de esta purificación aparece en la figura 33.

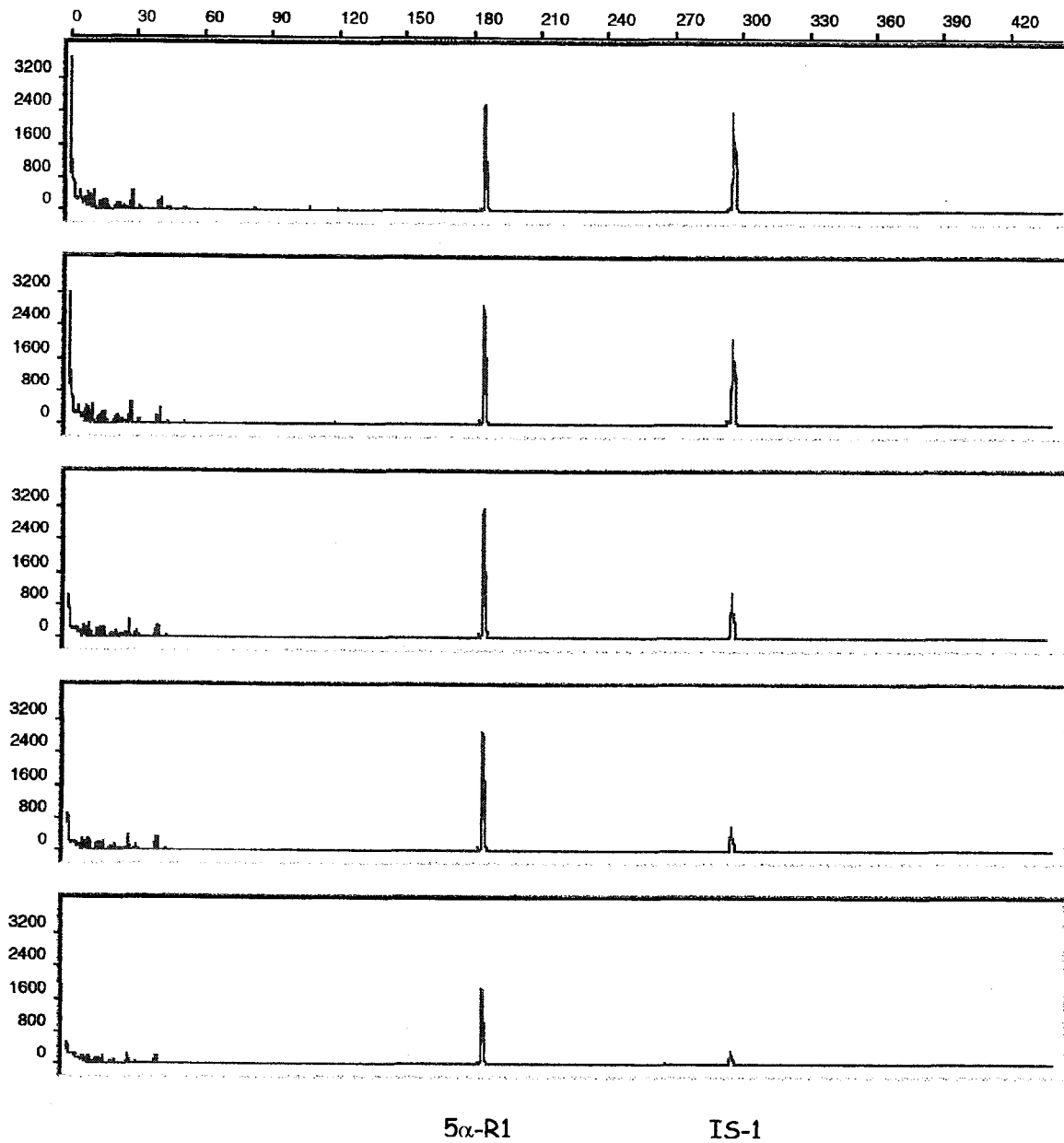


*Fig. 33. Purificación de las moléculas sintéticas (IS).*

***Cuantificación de los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 y  $5\alpha$ -R2 en próstata de rata mediante "two step" RT-PCR competitiva.***

Los grupos experimentales que se establecen son los siguientes: Ratas intactas (I), ratas castradas (C), ratas intactas tratadas con testosterona (I+T) y ratas castradas tratadas con testosterona (C+T), ratas intactas tratadas con dihidrotestosterona (I+DHT) y ratas castradas tratadas con DHT (C+DHT).

Para cada uno de los grupos experimentales, el cDNA generado a partir del RNA total mediante la reacción de retrotranscripción, se co-amplifica en presencia de cantidades decrecientes del DNA competidor. Co-amplificamos el cDNA correspondiente a  $5\alpha$ -R1 y el DNA competidor IS-1 utilizando el mismo par de cebadores (fig. 34). Como puede observarse en la figura, con cantidades decrecientes del estándar interno (300 p.b.), aumenta la intensidad relativa del producto amplificado de 185 p.b.



*Fig. 34. RT-PCR cuantitativa de 5 $\alpha$ -R1/IS-1 en próstata de rata I.*

De igual modo, co-amplificamos el cDNA correspondiente a 5 $\alpha$ -R2 y el DNA competidor IS-2 utilizando el mismo par de cebadores (fig. 35). Como puede observarse en la figura, con cantidades decrecientes del estándar interno (300 p.b.), aumenta la intensidad relativa del producto amplificado de 192 p.b.

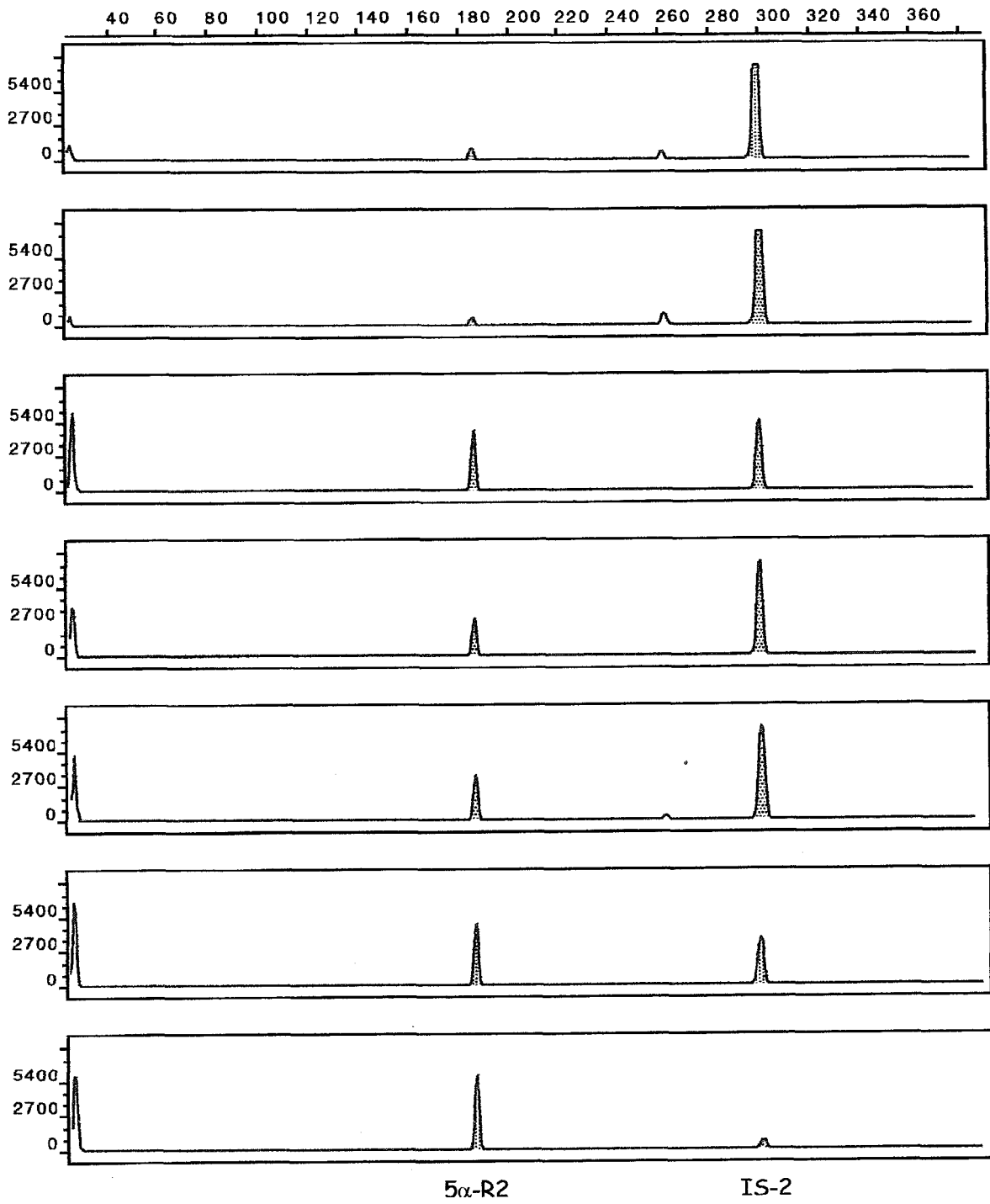


Fig. 35. RT-PCR cuantitativa de 5α-R2/IS-2 en próstata de rata I.

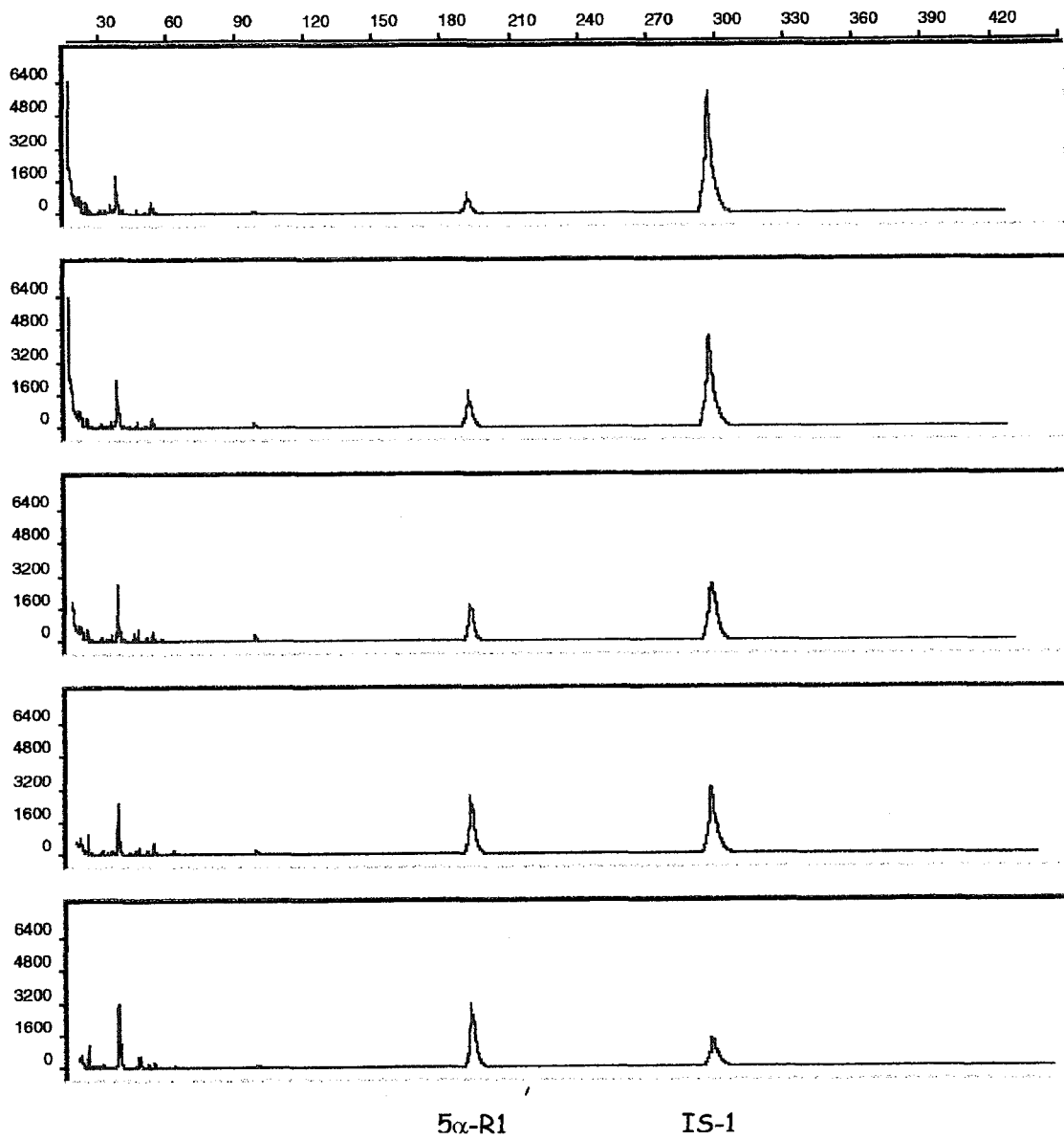


Fig. 36. RT-PCR cuantitativa de 5α-R1/IS-1 en próstata de rata C.



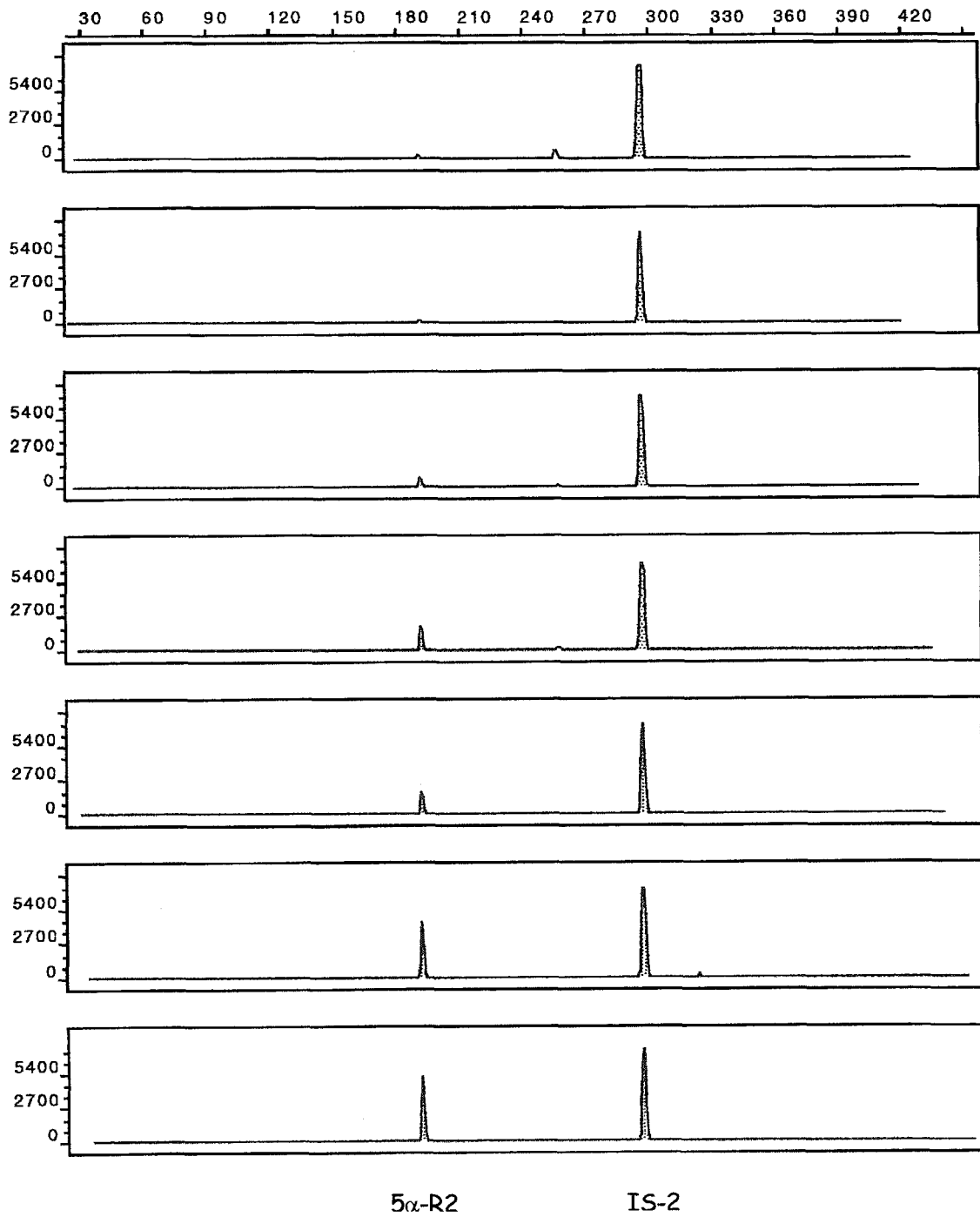
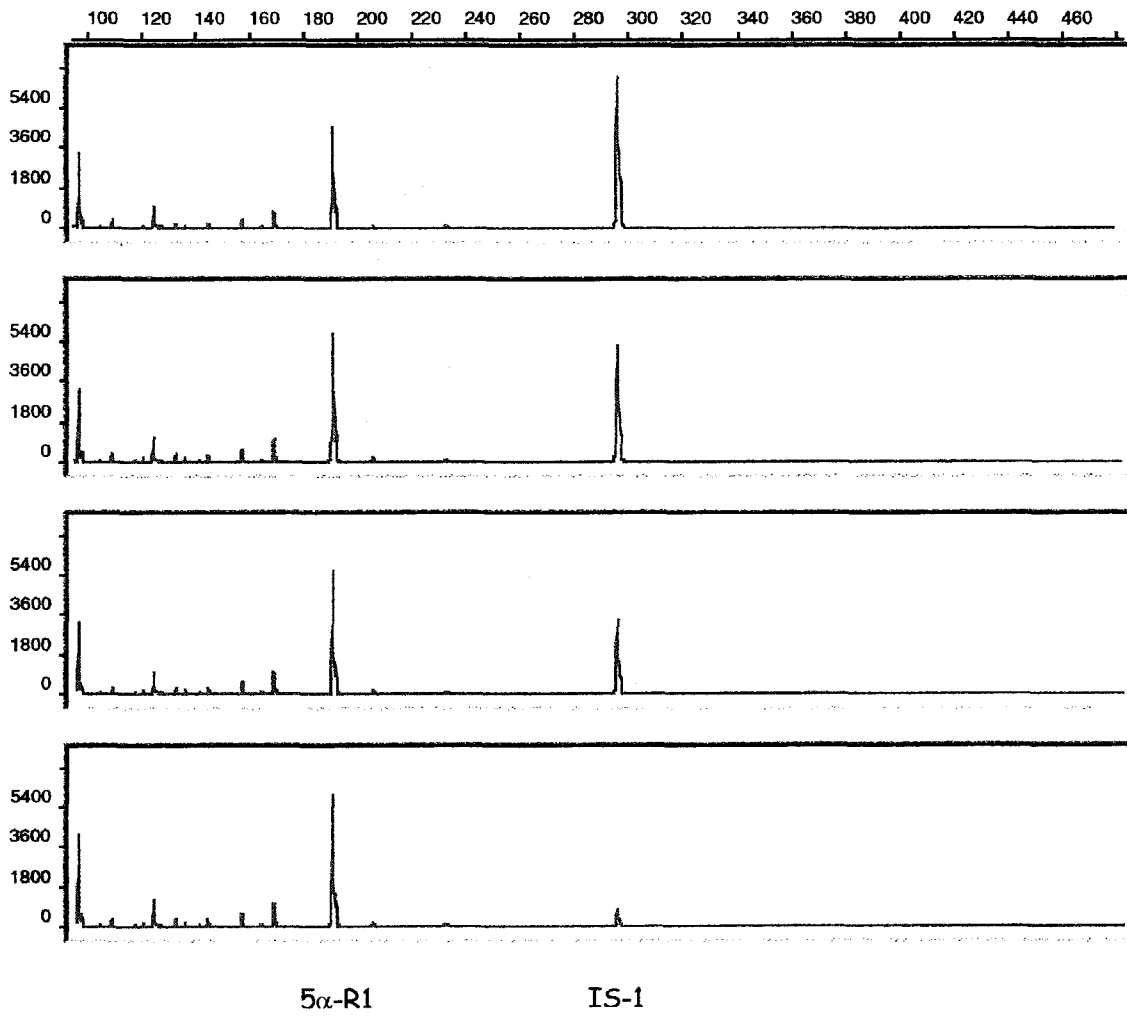


Fig. 37. RT-PCR cuantitativa de 5α-R2/IS-2 en próstata de rata C.



*Fig. 38. RT-PCR cuantitativa de 5α-R1/IS-1 en próstata de rata I+T.*

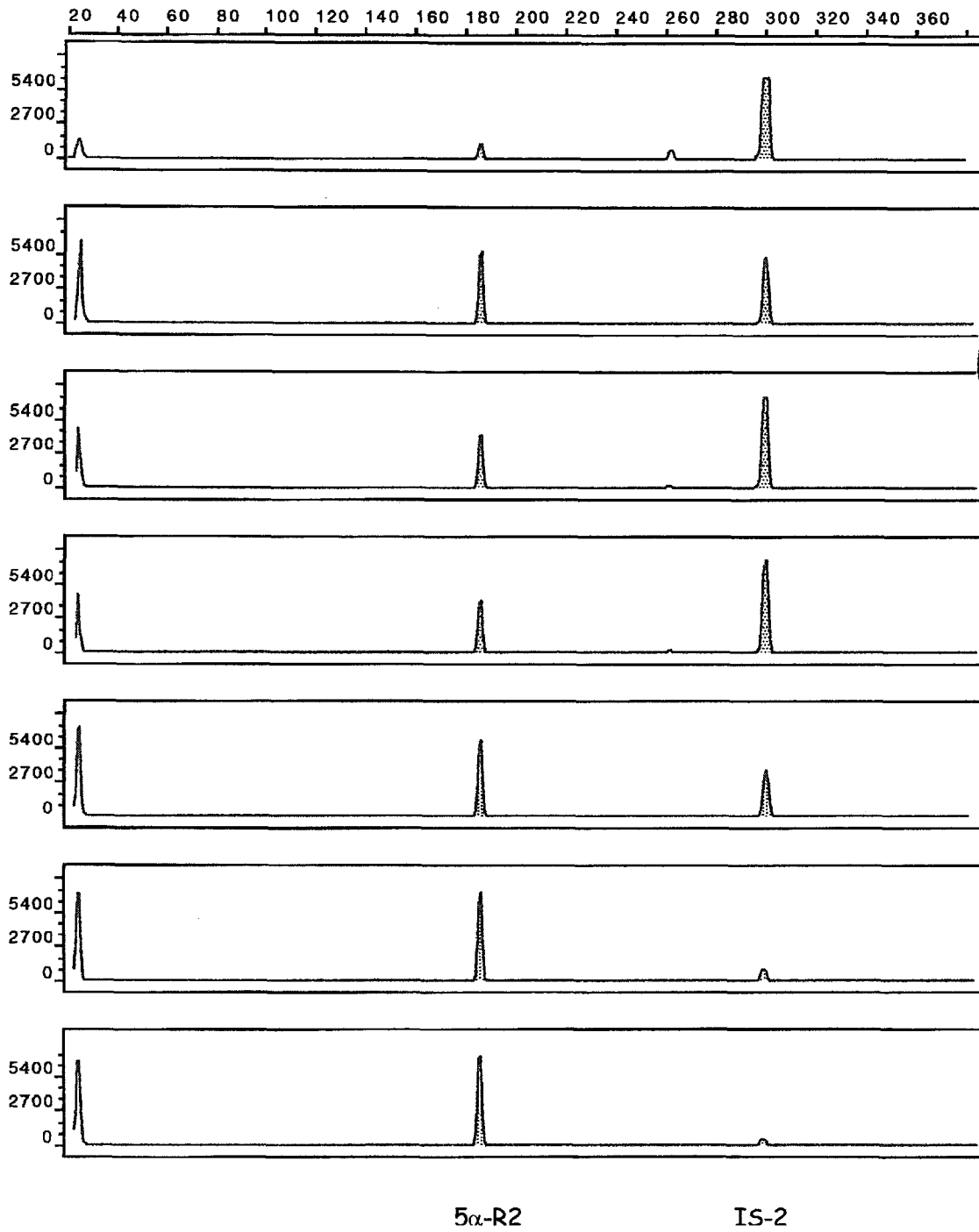


Fig. 39. RT-PCR cuantitativa de 5α-R2/IS-2 en próstata de rata I+T.

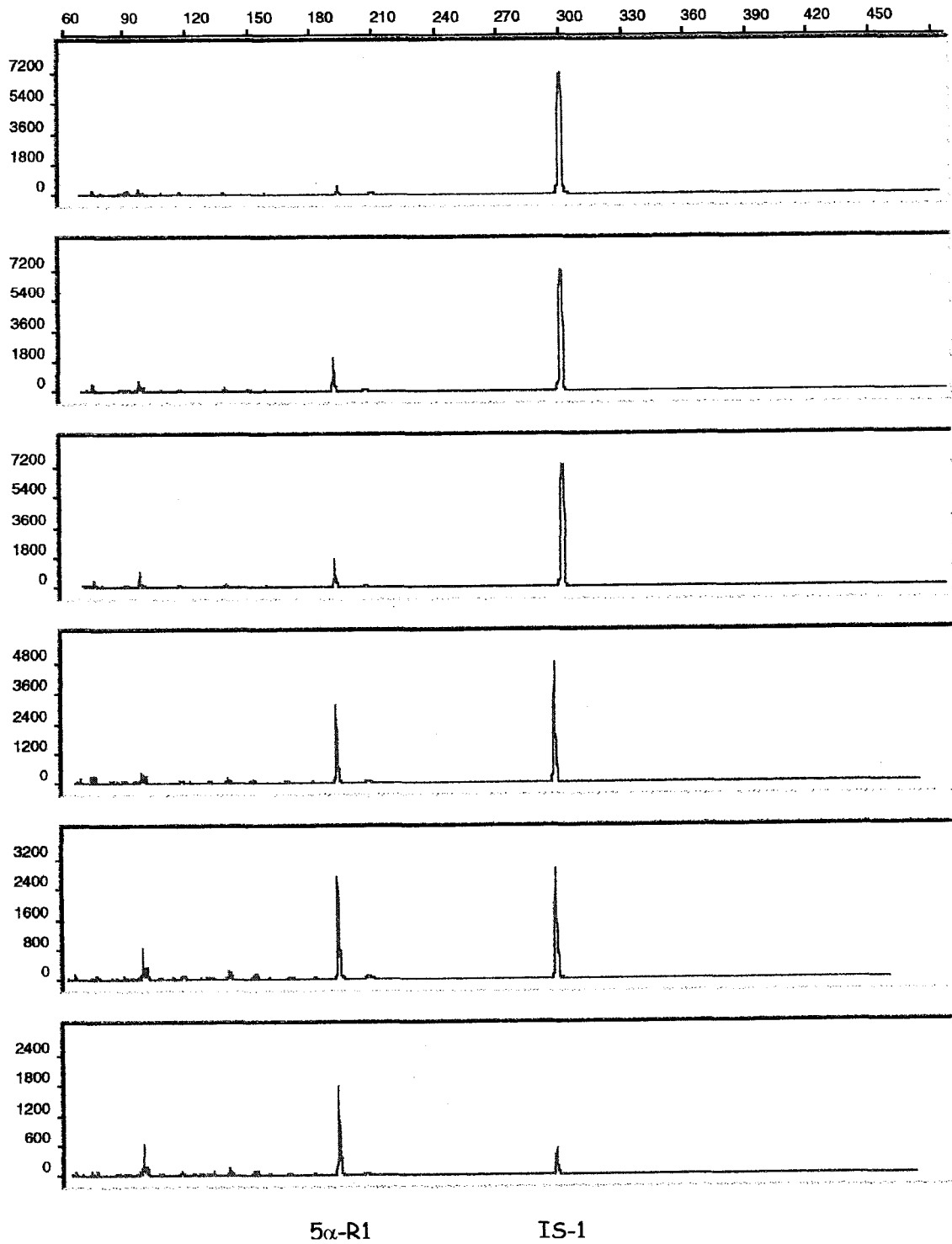


Fig. 40. RT-PCR cuantitativa de 5α-R1/IS-1 en próstata de rata C+T.

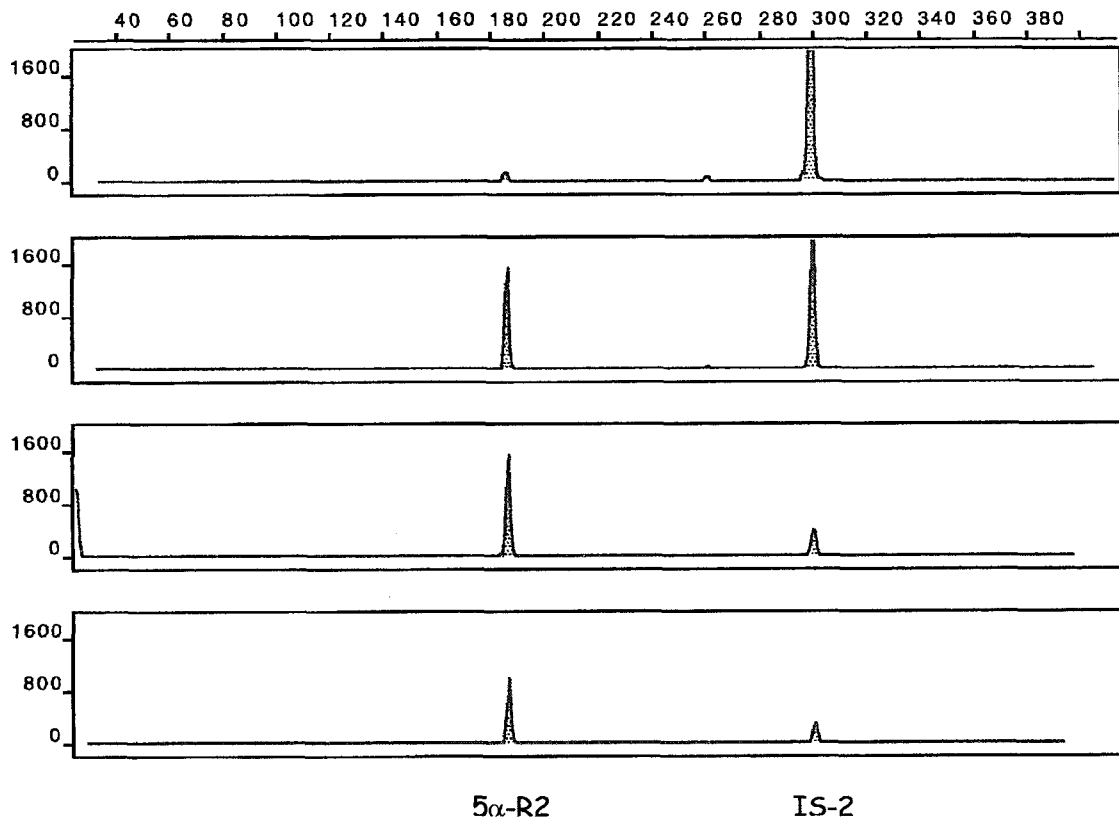


Fig. 41. RT-PCR cuantitativa de 5 $\alpha$ -R2/IS-2 en próstata de rata C+T.

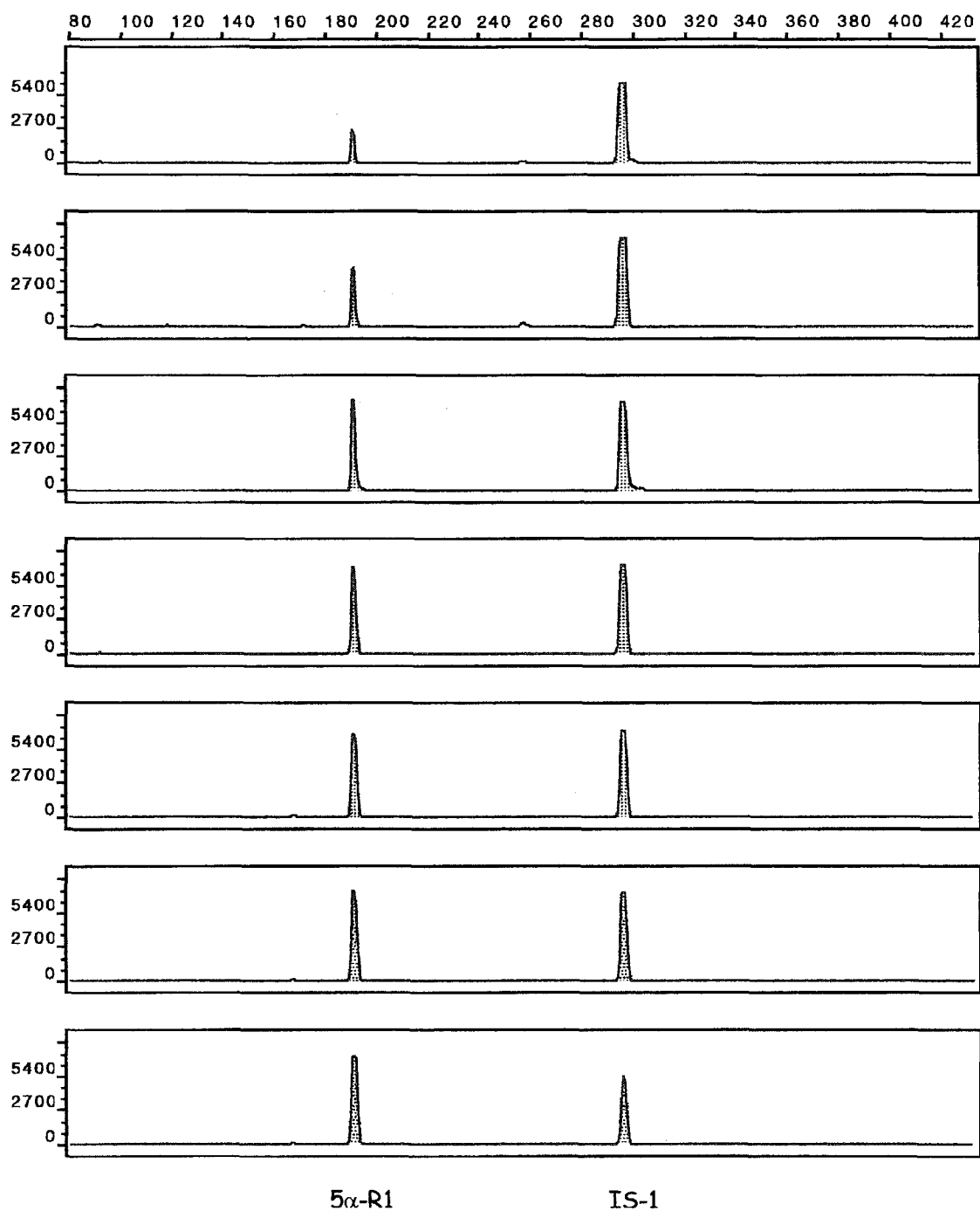


Fig. 42. RT-PCR cuantitativa de 5α-R1/IS-1 en próstata de rata I+DHT.

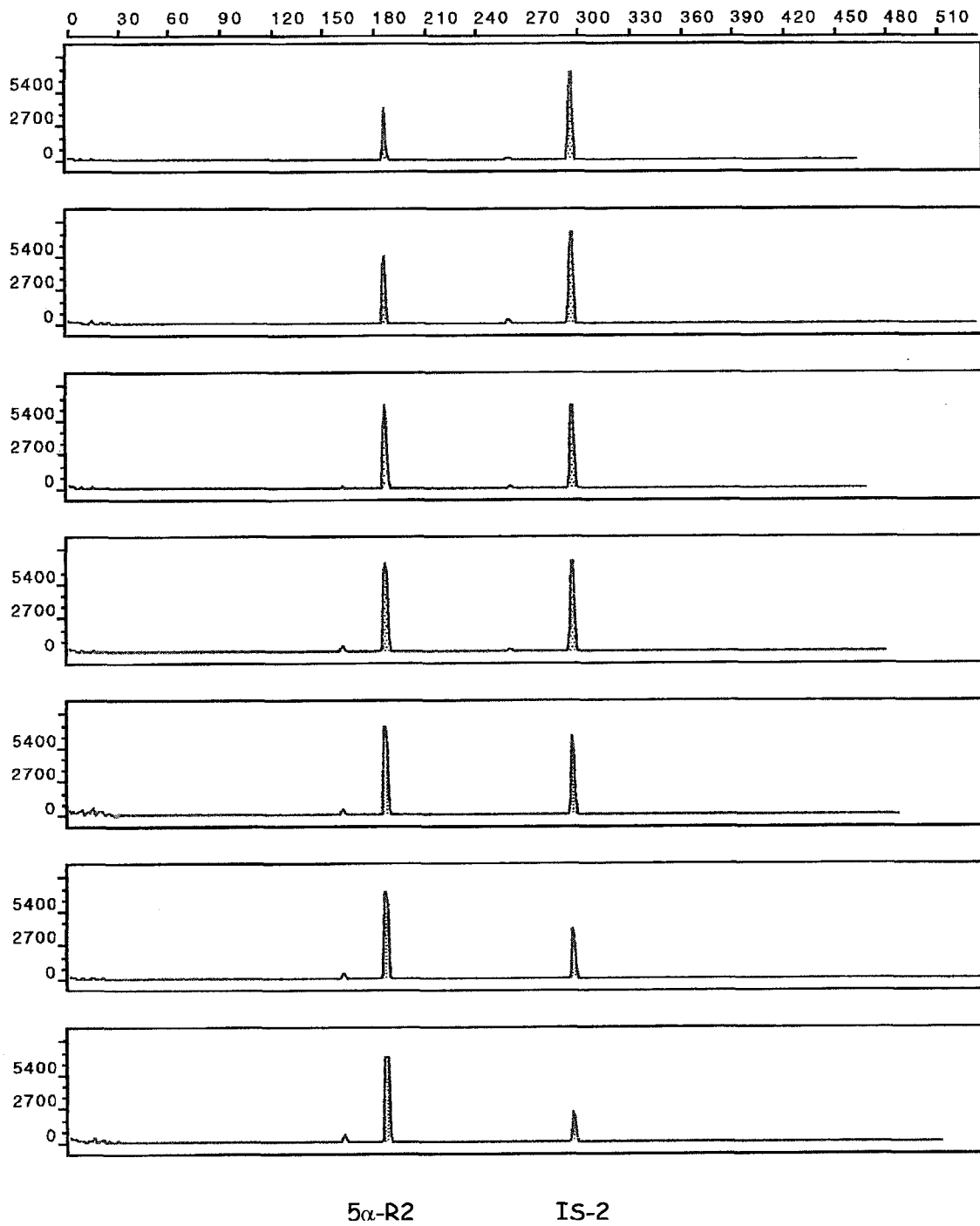


Fig. 43. RT-PCR cuantitativa de 5α-R2/IS-2 en próstata de rata I+DHT.

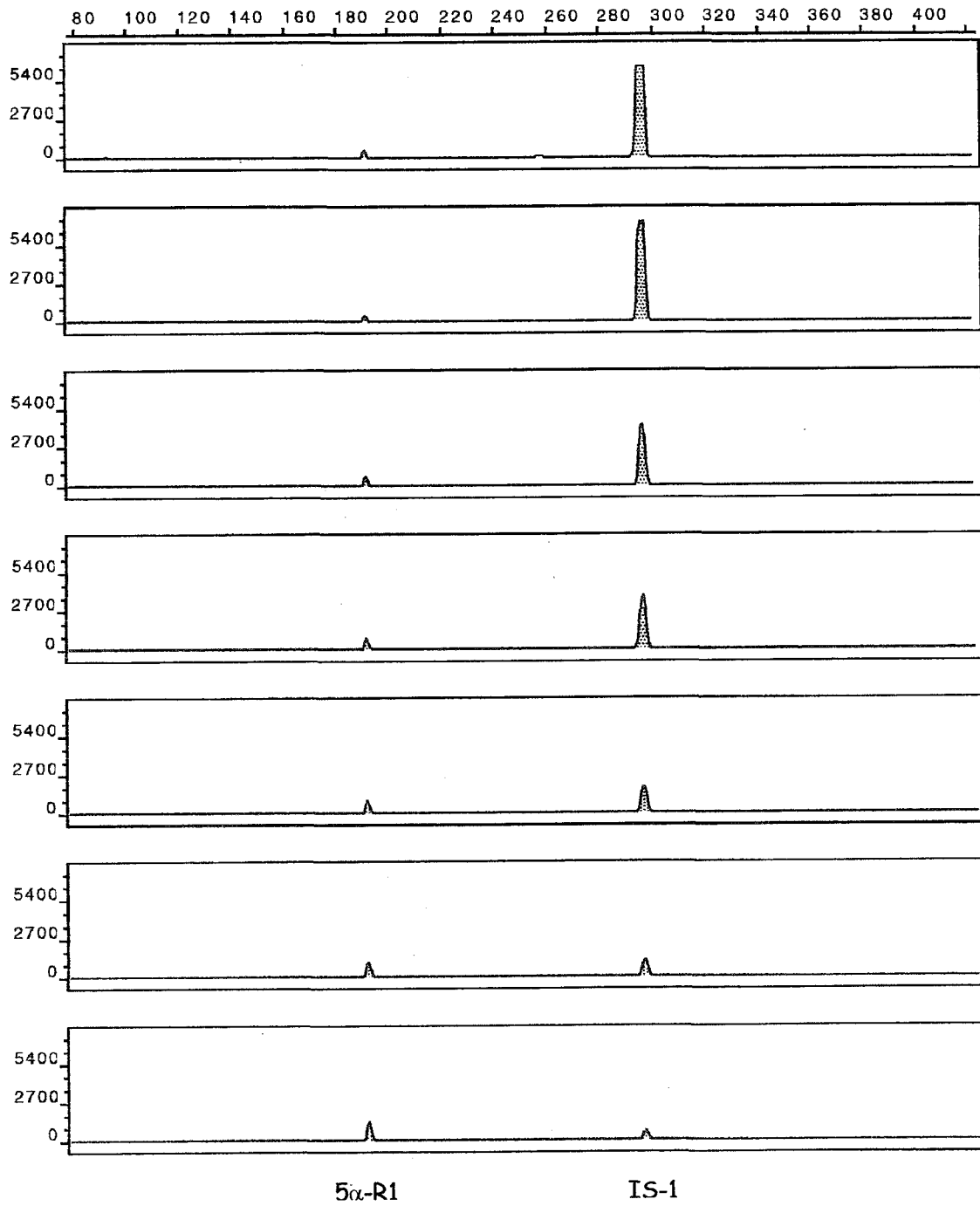


Fig. 44. RT-PCR cuantitativa de 5α-R1/IS-1 en próstata de rata C+DHT.



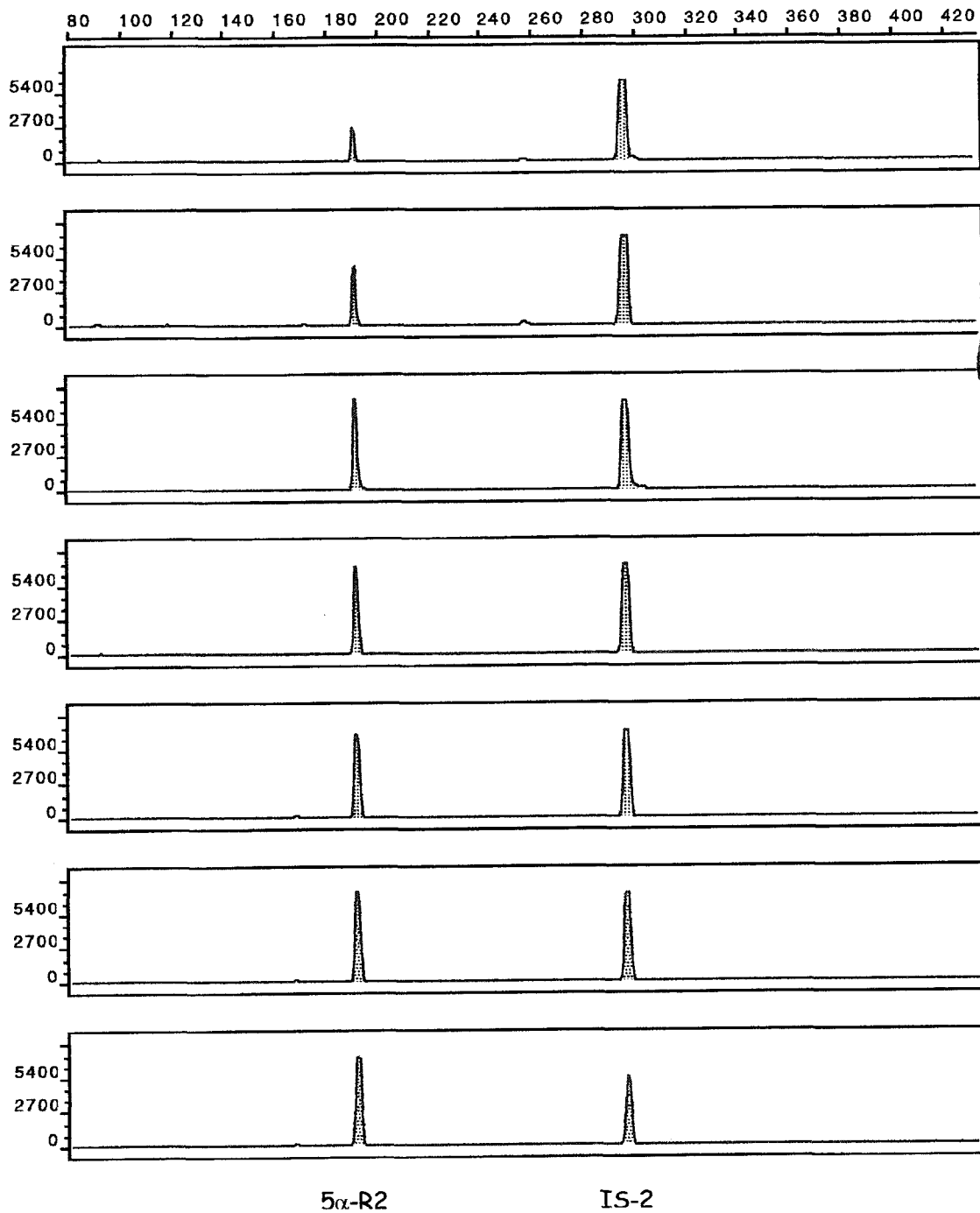


Fig. 45. RT-PCR cuantitativa de 5 $\alpha$ -R2/IS-2 en próstata de rata C+DHT.

Según la ec. 3 del fundamento matemático descrito en la sección *Material y Métodos* de esta tesis para cuantificar la cantidad de un mRNA mediante RT-PCR competitiva:

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

$$y = b - x$$

Donde:  $y = \log (N_{f\text{-prob}} / N_{f\text{-st}})$ ,  $b = \log (N_{0\text{-prob}})$ , and  $x = \log (N_{0\text{-st}})$

Así, para todos los grupos experimentales representamos el ratio de fluorescencia 5 $\alpha$ -R1/IS-1 frente a la cantidad de DNA competidor IS-1, obteniendo rectas con pendientes cercanas a -1 y cuyo punto de corte con el eje X nos dará la concentración inicial del mRNA problema según la ec. 6.

$$N_{0\text{-mRNA}} = k \times 10^{X_0} \quad \text{Ec. 6}$$

De igual modo, para todos los grupos experimentales representamos el ratio de fluorescencia 5 $\alpha$ -R2/IS-2 frente a la cantidad de DNA competidor IS-2.

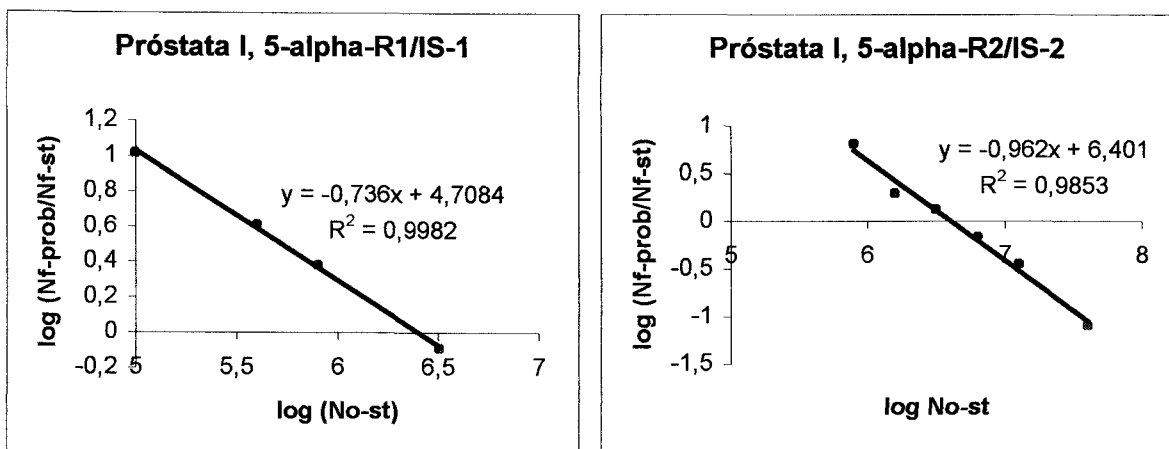


Fig. 46. Relación entre el ratio de fluorescencia 5 $\alpha$ -R1/IS-1 frente a IS-1 y 5 $\alpha$ -R2/IS-2 frente a IS-2 en próstata de rata I.

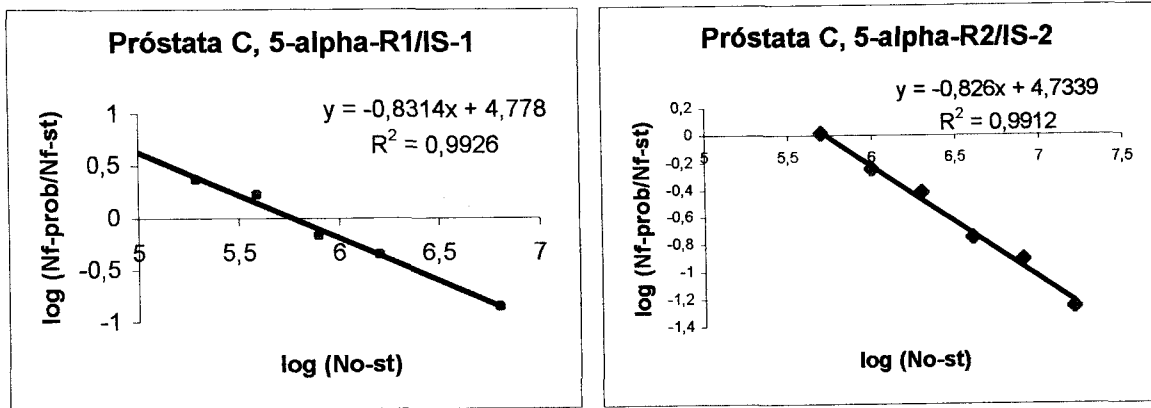


Fig. 47. Relación entre el ratio de fluorescencia 5 $\alpha$ -R1/IS-1 frente a IS-1 y 5 $\alpha$ -R2/IS-2 frente a IS-2 en próstata de rata C.

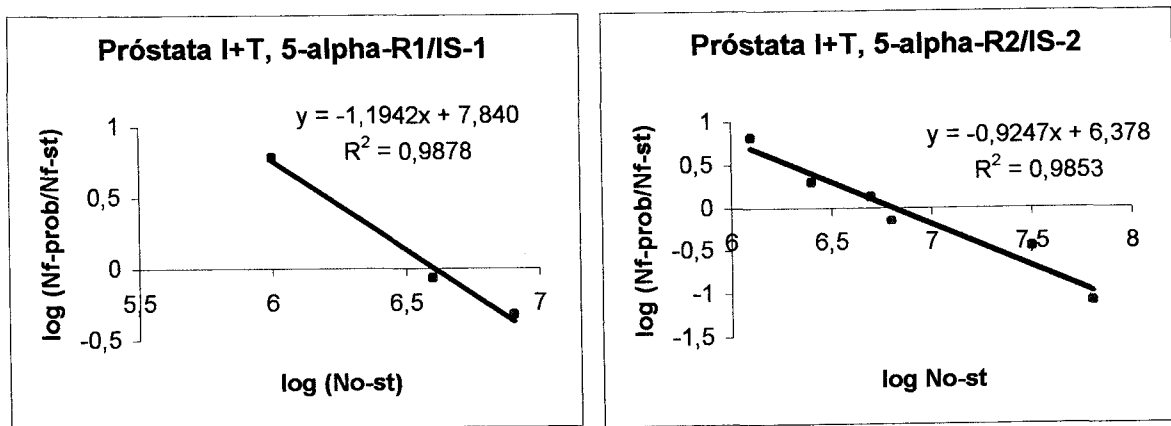


Fig. 48. Relación entre el ratio de fluorescencia 5 $\alpha$ -R1/IS-1 frente a IS-1 y 5 $\alpha$ -R2/IS-2 frente a IS-2 en próstata de rata I+T.

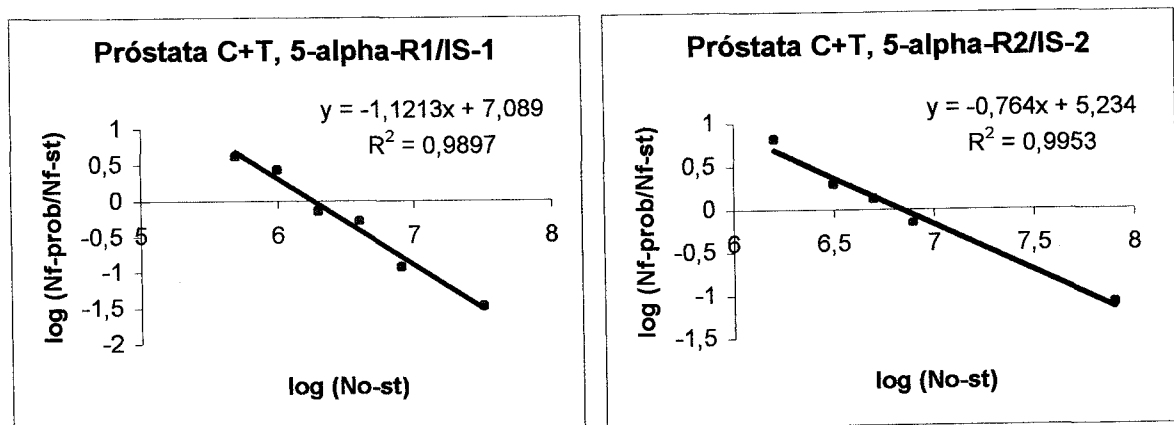


Fig. 49. Relación entre el ratio de fluorescencia 5 $\alpha$ -R1/IS-1 frente a IS-1 y 5 $\alpha$ -R2/IS-2 frente a IS-2 en próstata de rata C+T.

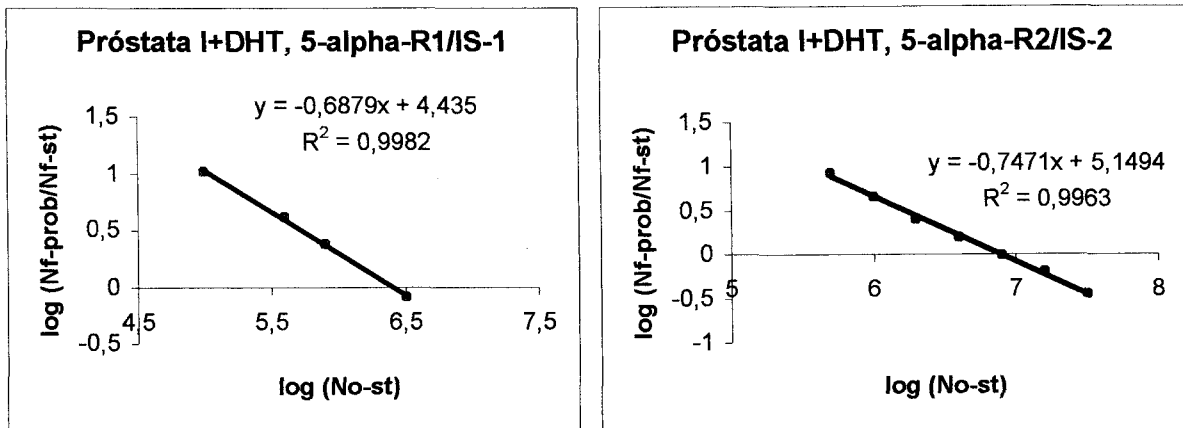


Fig. 50. Relación entre el ratio de fluorescencia 5 $\alpha$ -R1/IS-1 frente a IS-1 y 5 $\alpha$ -R2/IS-2 frente a IS-2 en próstata de rata I+DHT.

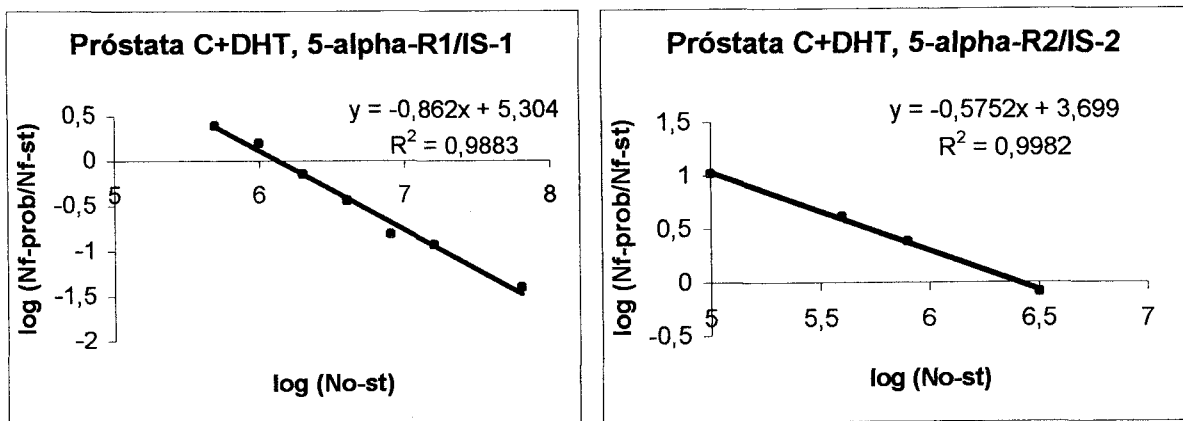


Fig. 51. Relación entre el ratio de fluorescencia 5 $\alpha$ -R1/IS-1 frente a IS-1 y 5 $\alpha$ -R2/IS-2 frente a IS-2 en próstata de rata C+DHT.

En la figura 52 se muestran los niveles de mRNA para 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en próstata de rata en las distintas situaciones experimentales estudiadas.

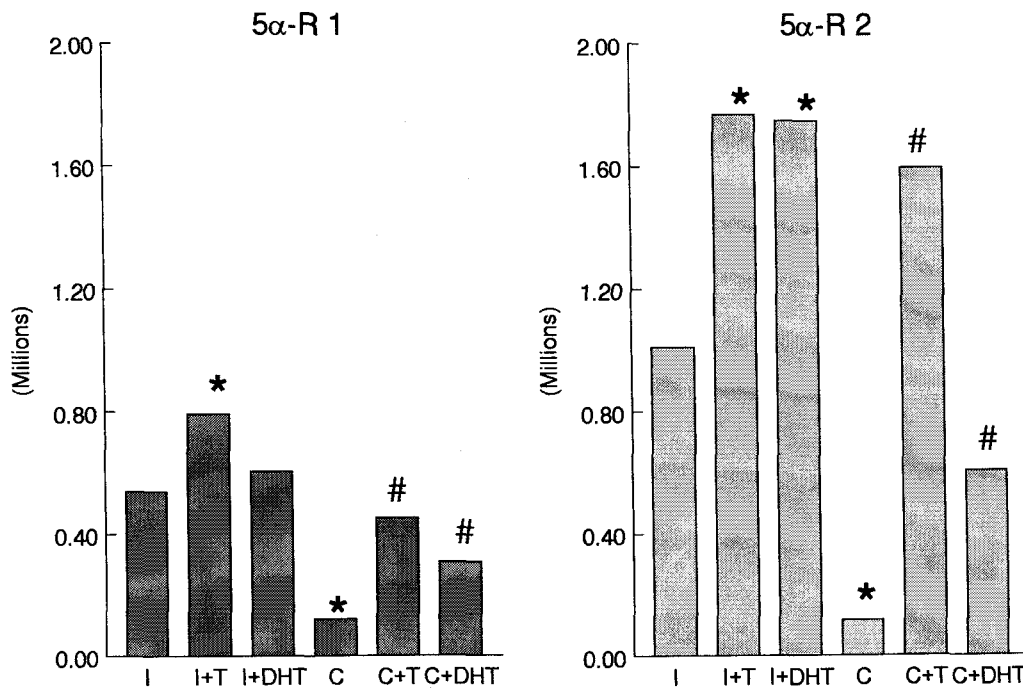


Fig. 52. Niveles de mRNA de 5α-R1 y 5α-R2 en próstata de rata en distintas situaciones experimentales.

Como se observa en la figura, los niveles de mRNA de 5α-R1 en animales castrados son significativamente menores que en animales intactos. Después del tratamiento con T, hay un incremento significativo en los niveles de mRNA de 5α-R1 tanto en animales intactos como en castrados en comparación con sus respectivos grupos sin tratamiento. Después del tratamiento con DHT hay un incremento significativo en los niveles de mRNA de 5α-R1 en animales castrados.

Se produce un descenso significativo en los niveles de mRNA de 5α-R2 en animales castrados con respecto a animales intactos. Después del tratamiento con T, hay un incremento significativo en los niveles de mRNA de 5α-R2 tanto en animales intactos como en castrados en comparación con

sus respectivos grupos sin tratamiento, con un mayor efecto en el último grupo. Después del tratamiento con DHT, hay un incremento significativo en los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R2 en animales intactos y castrados en comparación con sus respectivos grupos sin tratamiento.

En la figura 53 se representa el peso medio de las próstatas de los animales en los distintos grupos experimentales estudiados.

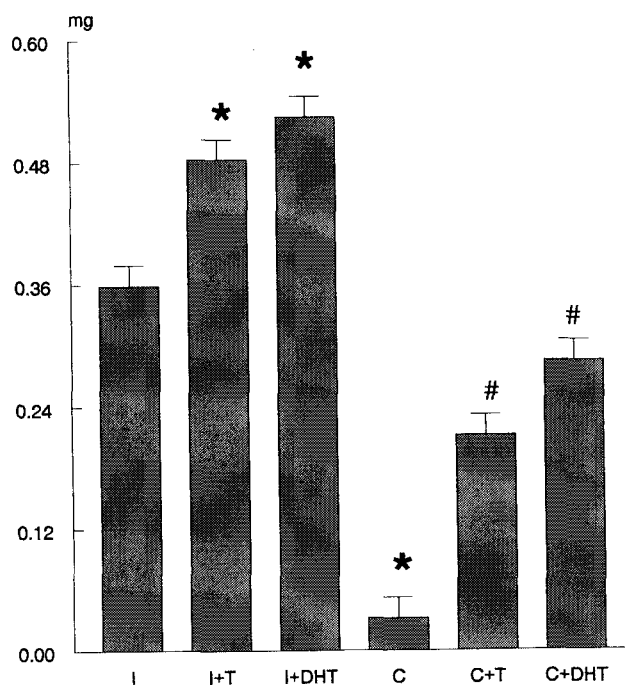


Fig. 53. Peso medio de las próstatas en las distintas situaciones experimentales estudiadas.

La orquidectomía produce una disminución significativa en el peso de la próstata de animales castrados. El tratamiento con T y DHT de animales intactos produce un incremento en el peso de la próstata, siendo superior para el caso de DHT. El tratamiento con T y DHT de animales castrados

produce un incremento significativo del peso de la próstata, siendo de nuevo este incremento superior en el caso de los animales tratados con DHT.

En la figura 54 se muestran los niveles plasmáticos de T y DHT medidos en los distintos grupos experimentales estudiados.

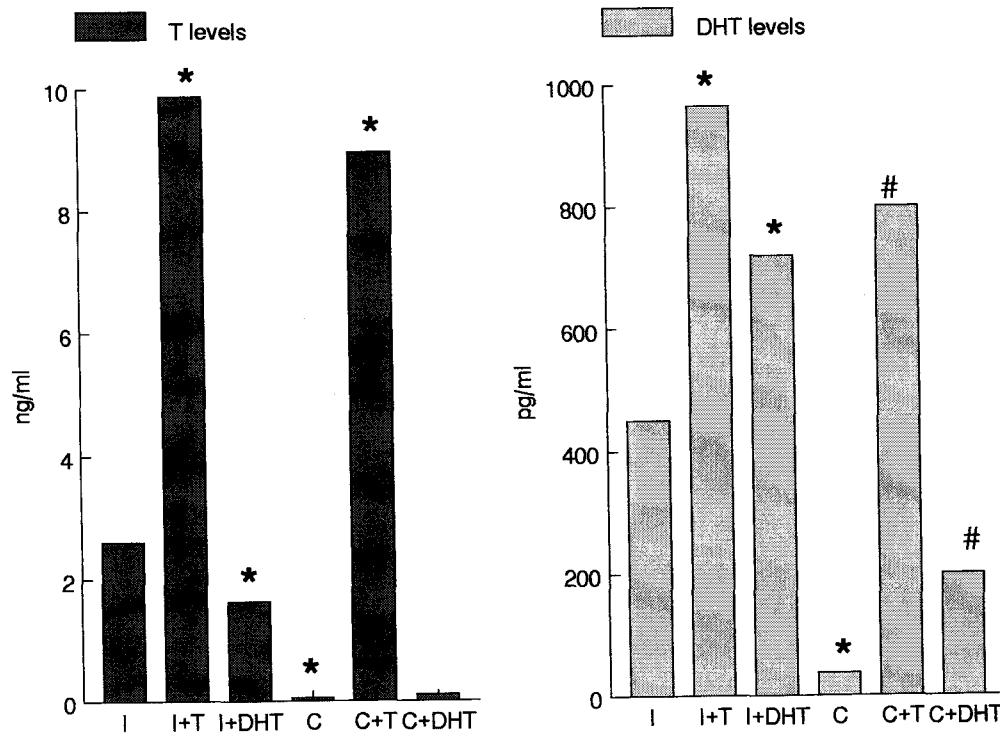


Fig. 54. Niveles plasmáticos de T y DHT en las distintas situaciones experimentales.

Se produce un descenso significativo de los niveles de T en animales castrados con respecto a los intactos. Como era de esperar, el tratamiento con T de animales intactos y castrados produce un incremento significativo en los niveles plasmáticos de T. Después del tratamiento con DHT se produce un descenso significativo en los niveles plasmáticos de T de animales intactos en comparación con el mismo grupo sin tratamiento.

Se produce un descenso significativo en los niveles plasmáticos de DHT en animales castrados con respecto a intactos. Después del tratamiento con T se produce un incremento significativo en los niveles de DHT en animales intactos y castrados, con un mayor efecto en animales castrados. Después del tratamiento con DHT se produce un incremento significativo en los niveles plasmáticos de DHT en animales intactos y castrados en comparación con sus respectivos grupos sin tratamiento.

*Cuantificación de los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 en hígado de rata mediante "two step" RT-PCR competitiva.*

Los grupos experimentales que se establecen son los siguientes: Ratas intactas (I), ratas castradas (C), ratas intactas tratadas con testosterona (I+T) y ratas castradas tratadas con testosterona (C+T), ratas intactas tratadas con dihidrotestosterona (I+DHT) y ratas castradas tratadas con DHT (C+DHT).



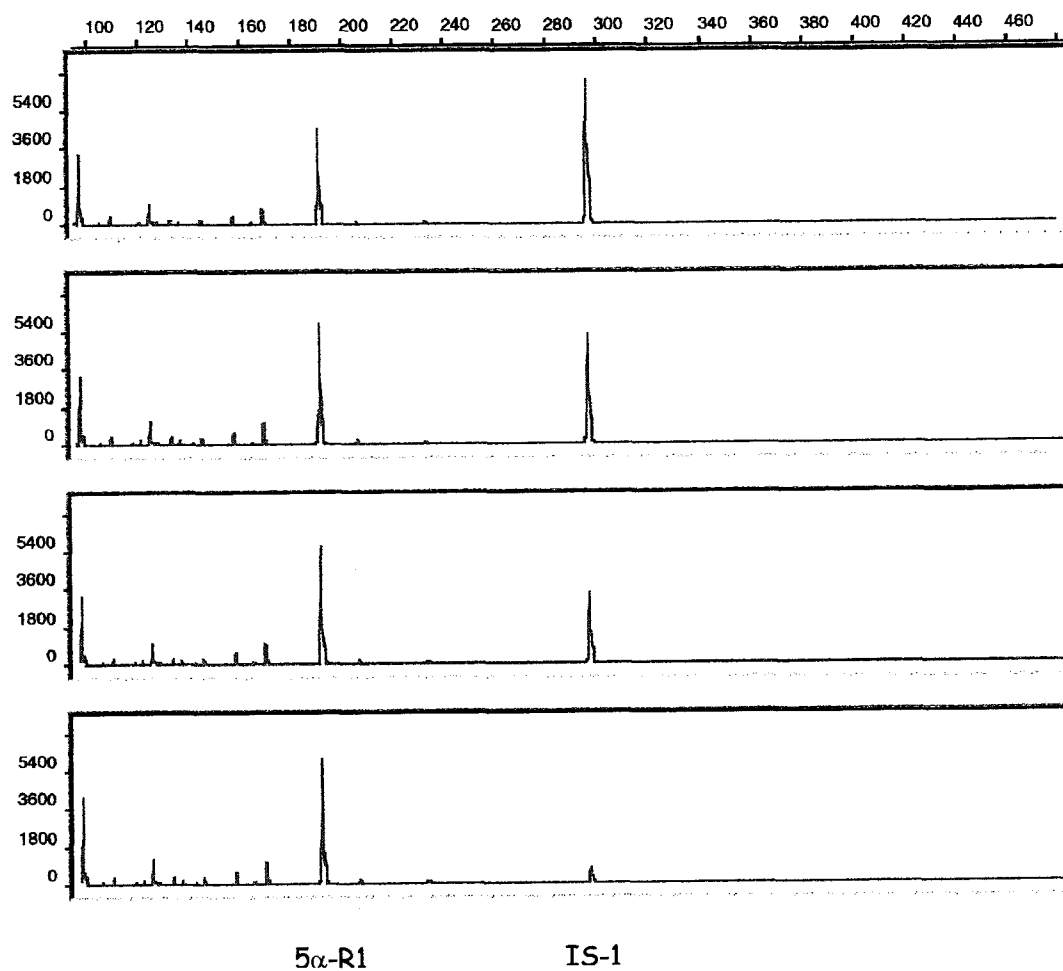


Fig. 55. RT-PCR cuantitativa de 5α-R1/IS-1 en hígado de rata I.

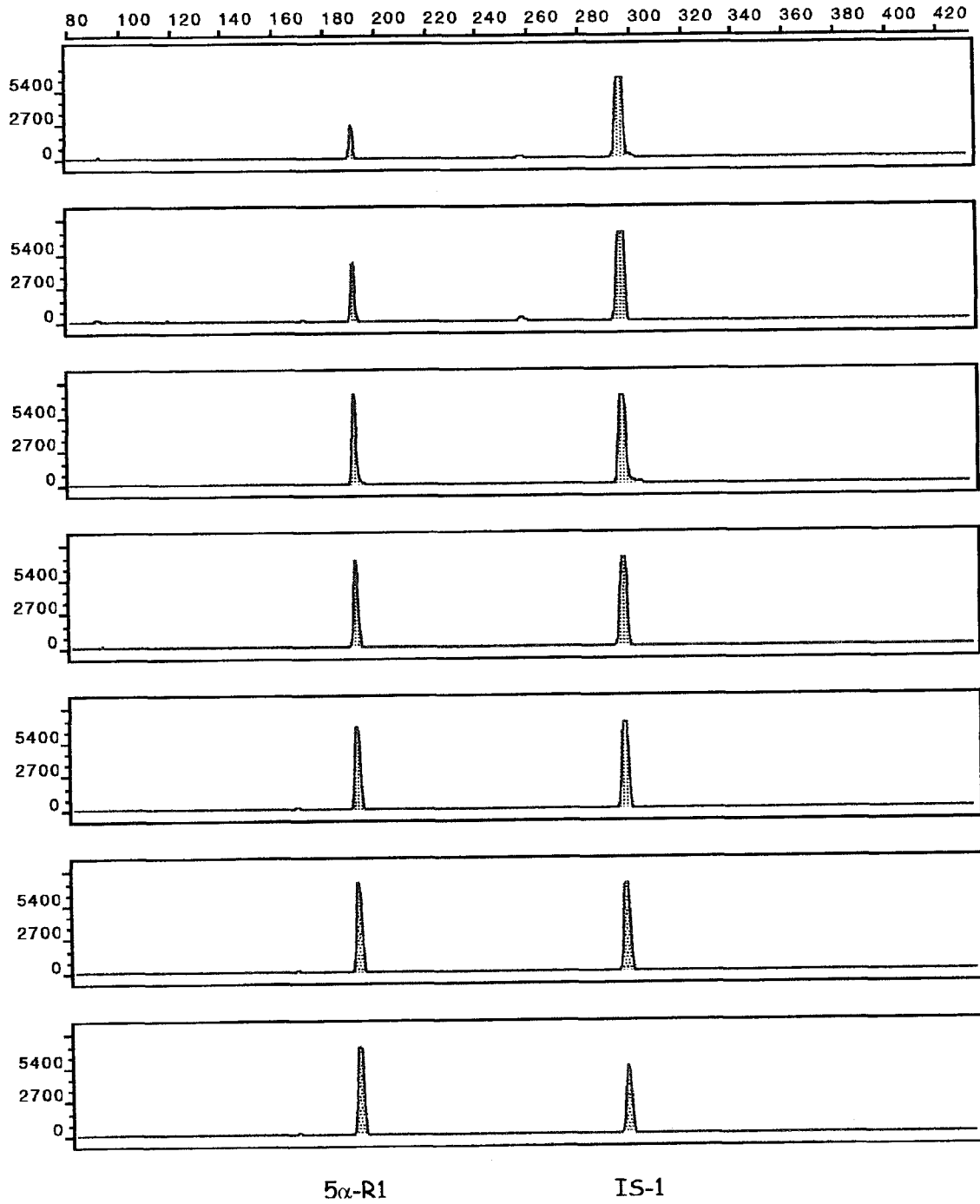


Fig. 56. RT-PCR cuantitativa de 5α-R1/IS-1 en hígado de rata C.

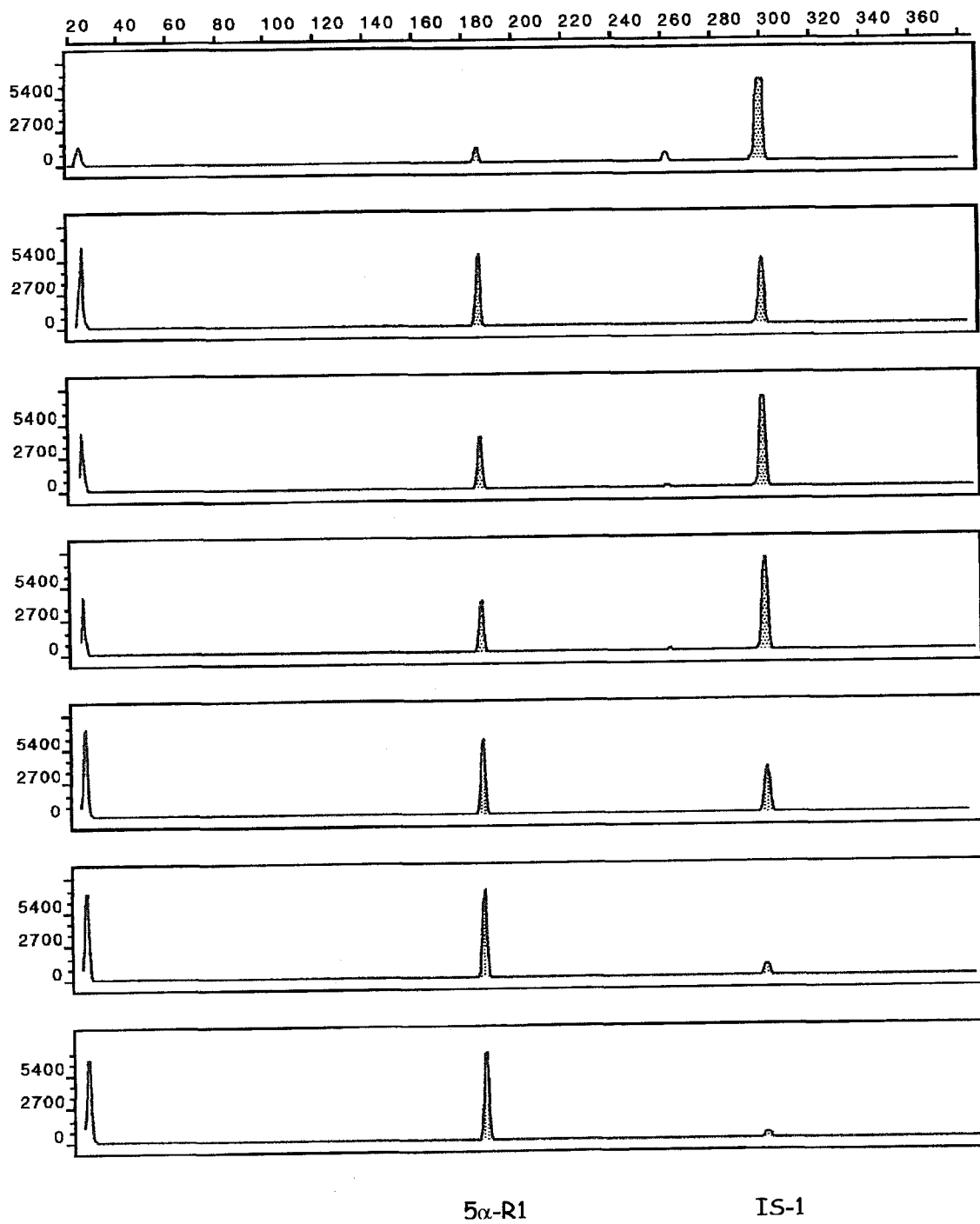


Fig. 57. RT-PCR cuantitativa de 5α-R1/IS-1 en hígado de rata I+T.

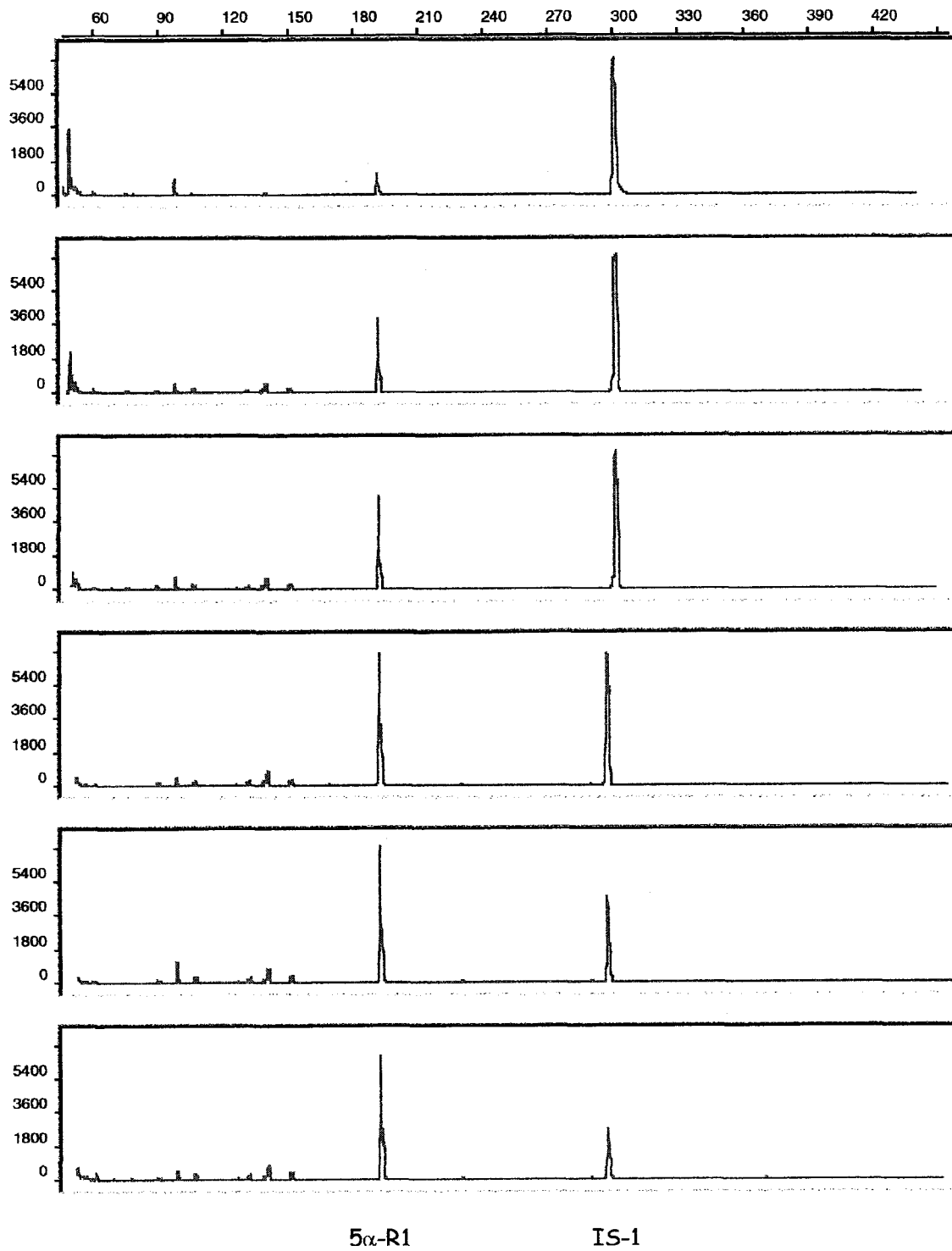


Fig. 58. RT-PCR cuantitativa de 5α-R1/IS-1 en hígado de rata C+T.

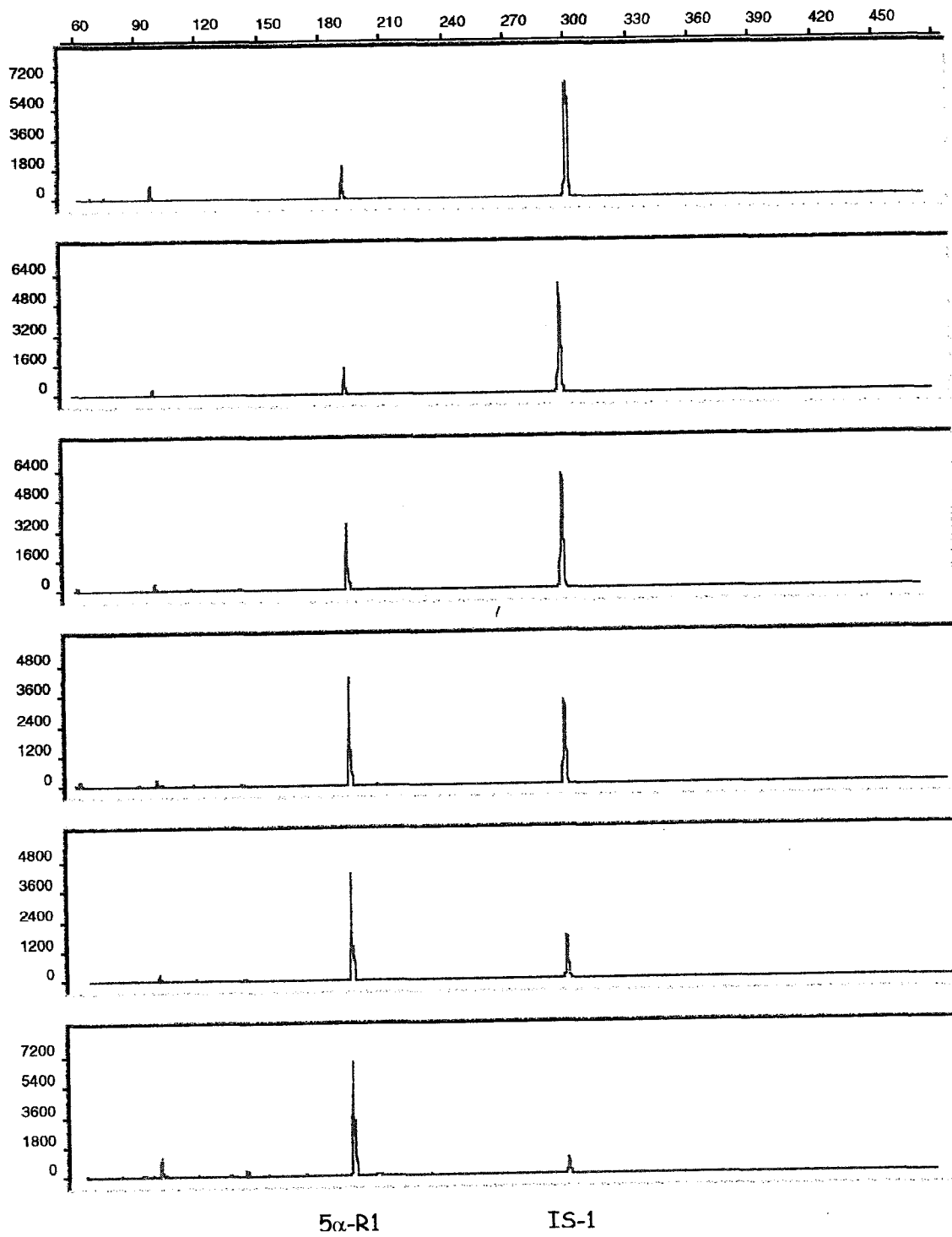


Fig. 59. RT-PCR cuantitativa de 5α-R1/IS-1 en hígado de rata I+DHT.

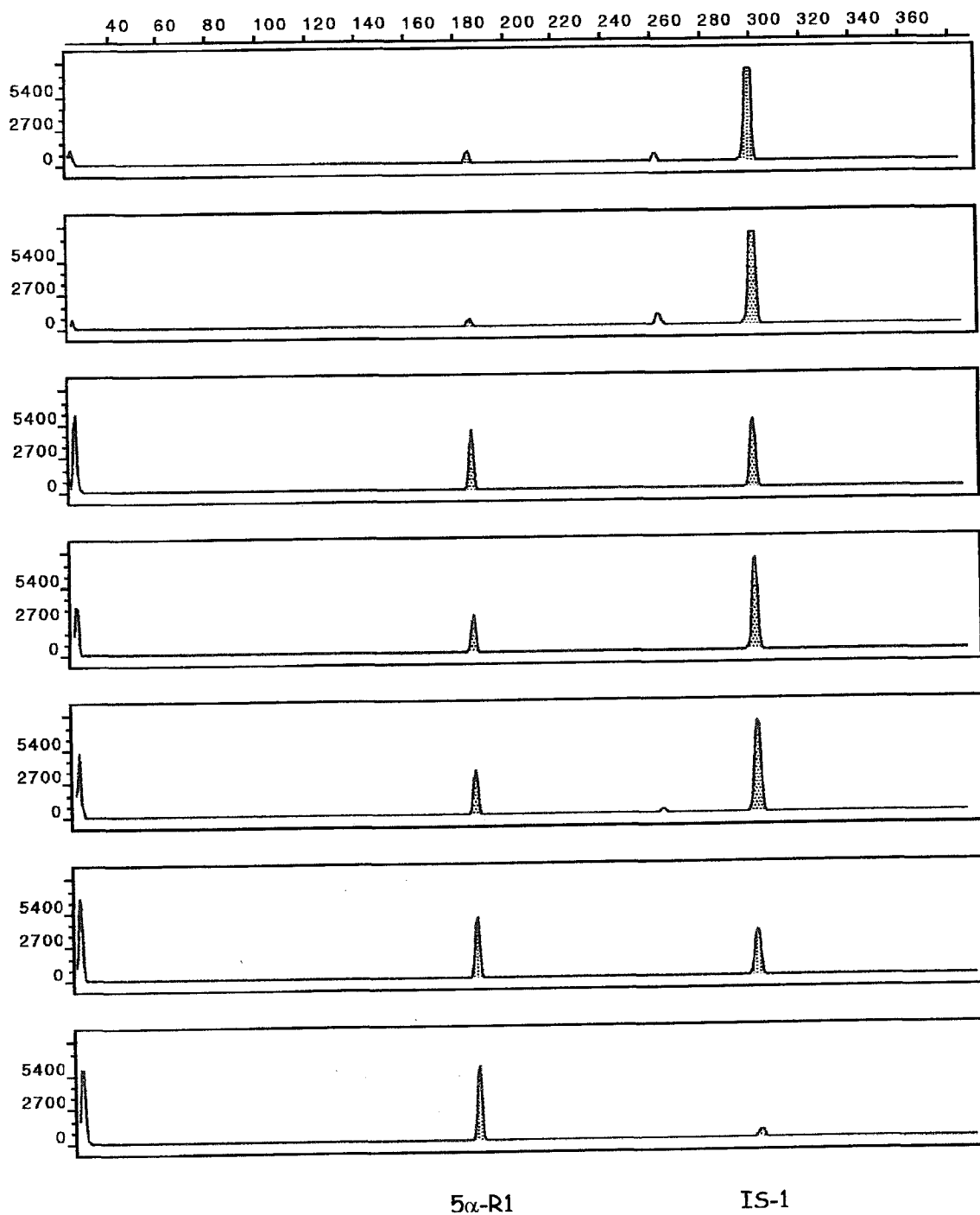


Fig. 60. RT-PCR cuantitativa de  $5\alpha$ -R1/IS-1 en hígado de rata C+DHT.

Representando el ratio de fluorescencia  $5\alpha$ -R1/IS-1 frente a la cantidad de DNA competidor IS-1:

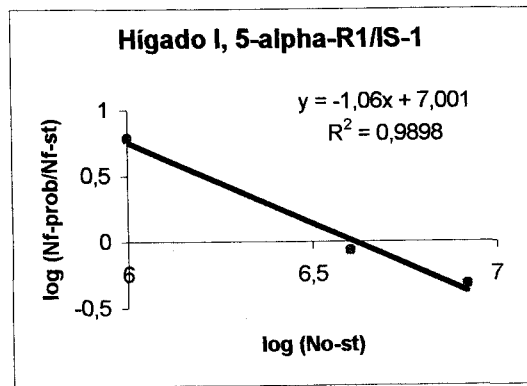


Fig. 61. Relación entre el ratio de fluorescencia 5 $\alpha$ -R1/IS-1 frente a IS-1 en hígado de rata I.

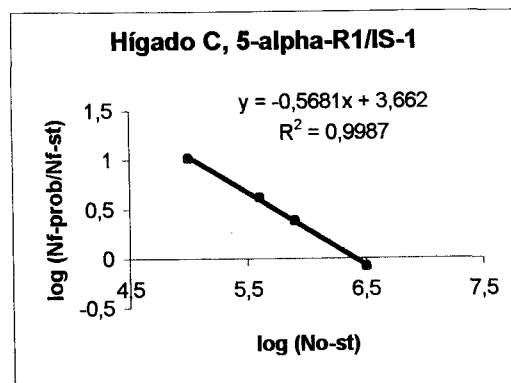


Fig. 62. Relación entre el ratio de fluorescencia 5 $\alpha$ -R1/IS-1 frente a IS-1 en hígado de rata C.

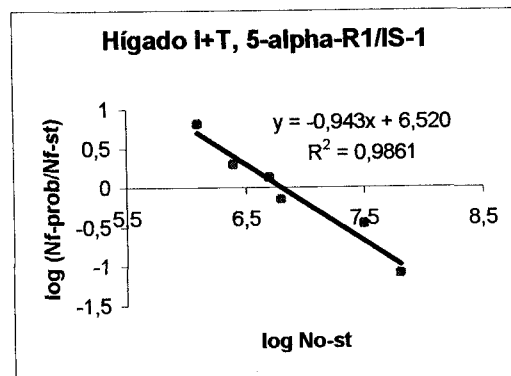


Fig. 63. Relación entre el ratio de fluorescencia 5 $\alpha$ -R1/IS-1 frente a IS-1 en hígado de rata I+T.

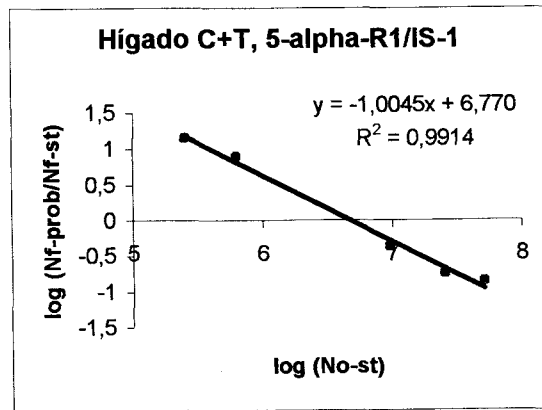


Fig. 64. Relación entre el ratio de fluorescencia 5 $\alpha$ -R1/IS-1 frente a IS-1 en hígado de rata C+T.

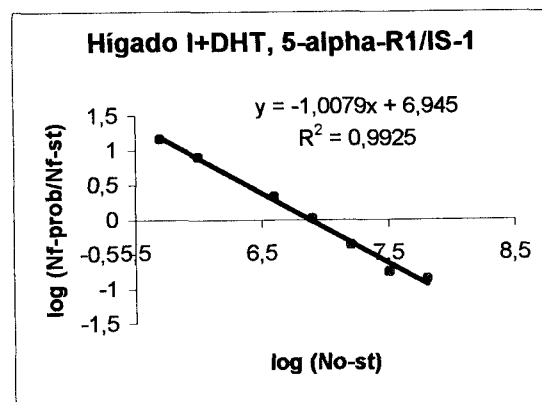


Fig. 65. Relación entre el ratio de fluorescencia 5 $\alpha$ -R1/IS-1 frente a IS-1 en hígado de rata I+DHT.

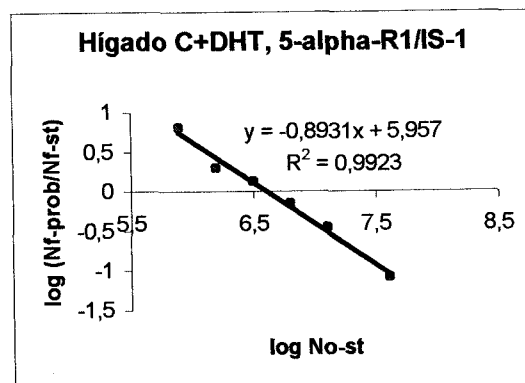


Fig. 66. Relación entre el ratio de fluorescencia 5 $\alpha$ -R1/IS-1 frente a IS-1 en hígado de rata C+DHT.



En la figura 67 se muestran los niveles de mRNA para  $5\alpha$ -R1 en hígado de rata en las distintas situaciones experimentales estudiadas.

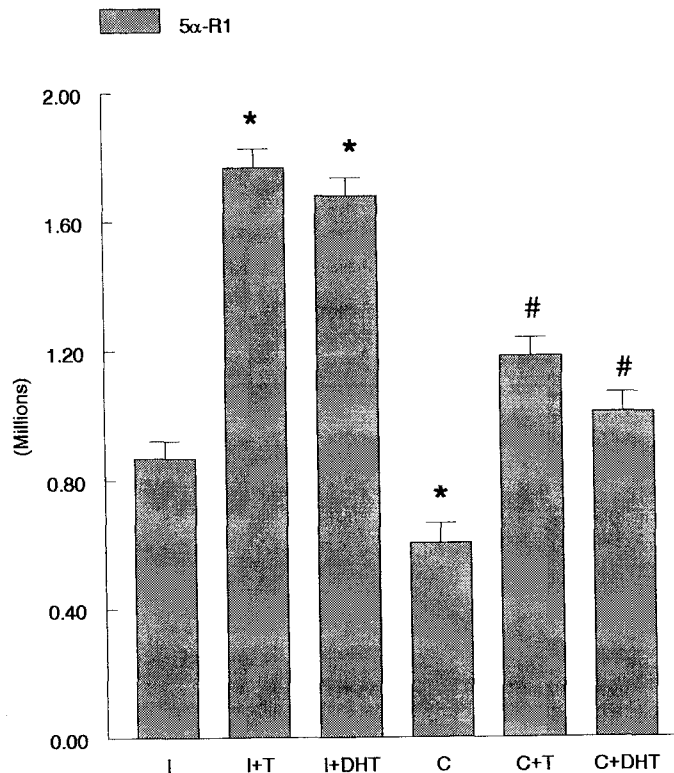
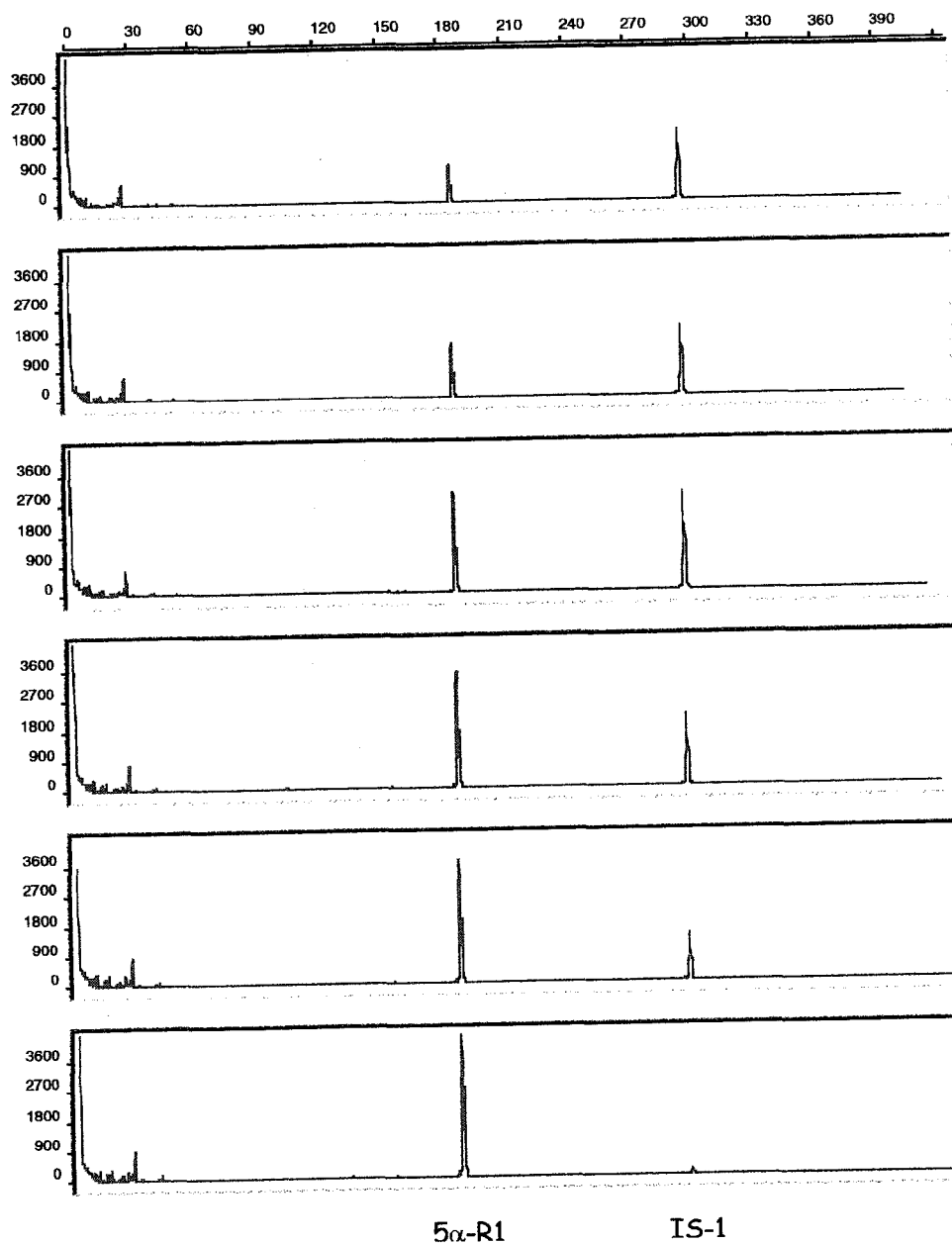


Fig. 67. Niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 en hígado de rata en distintas situaciones experimentales.

Los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 en animales castrados disminuyeron de forma significativa con respecto a animales intactos. Después del tratamiento con T, los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 aumentaron de forma significativa tanto en animales intactos como en castrados en comparación a sus respectivos grupos sin tratamiento. Después del tratamiento con DHT, los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 aumentaron de forma significativa tanto en animales intactos como en castrados en comparación a sus respectivos grupos sin tratamiento.

*Cuantificación de los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en corteza prefrontal de cerebro de rata mediante "one step" RT-PCR competitiva.*

Los grupos experimentales que se establecen son los siguientes: Ratas intactas (I), ratas castradas (C), ratas intactas tratadas con testosterona (I+T) y ratas castradas tratadas con testosterona (C+T), ratas intactas tratadas con dihidrotestosterona (I+DHT) y ratas castradas tratadas con DHT (C+DHT).



*Fig. 68. RT-PCR cuantitativa de 5 $\alpha$ -R1/IS-1 en corteza prefrontal de cerebro de rata I.*

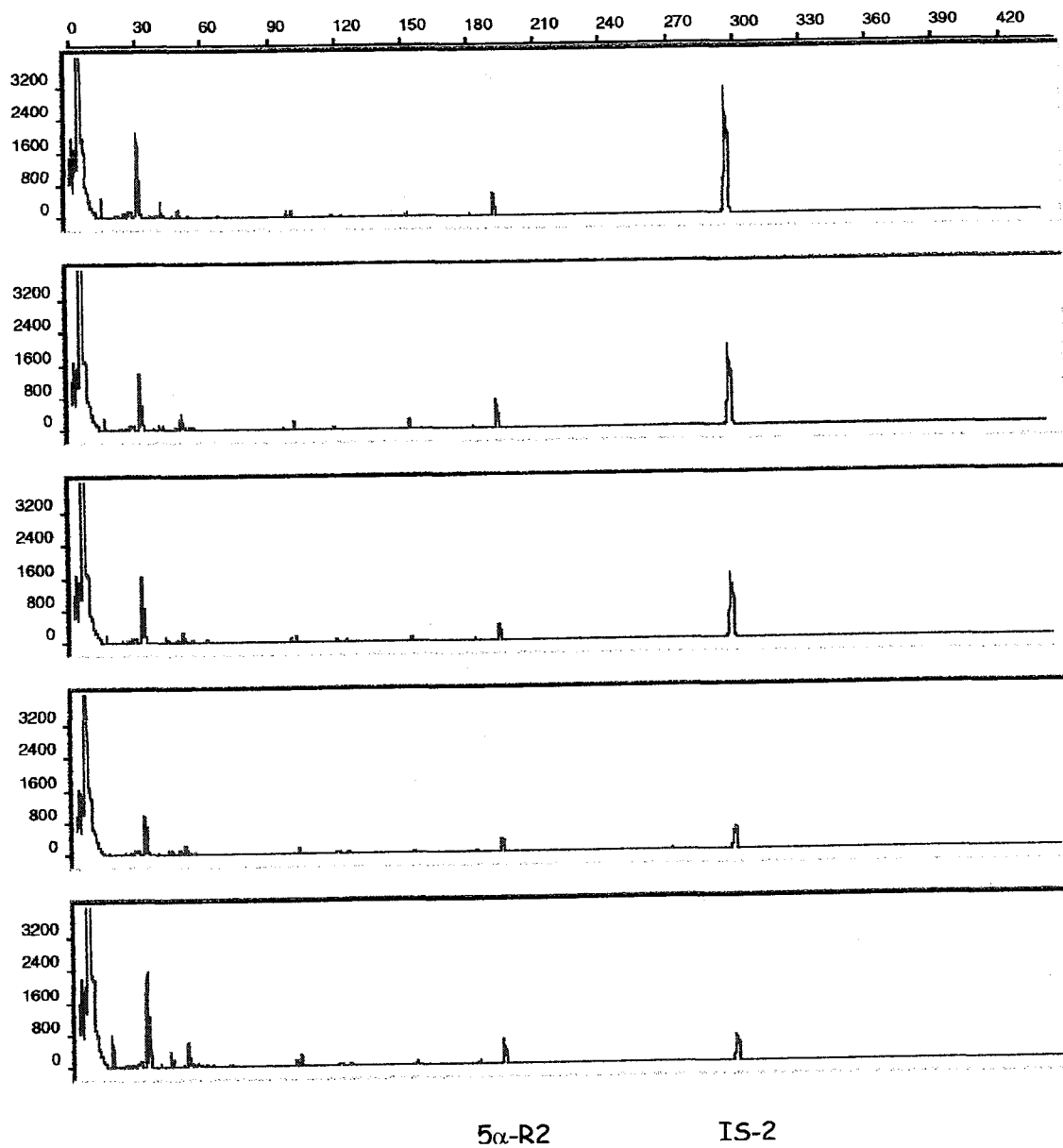


Fig. 69. RT-PCR cuantitativa de 5α-R2/IS-2 en corteza prefrontal de cerebro de rata I.

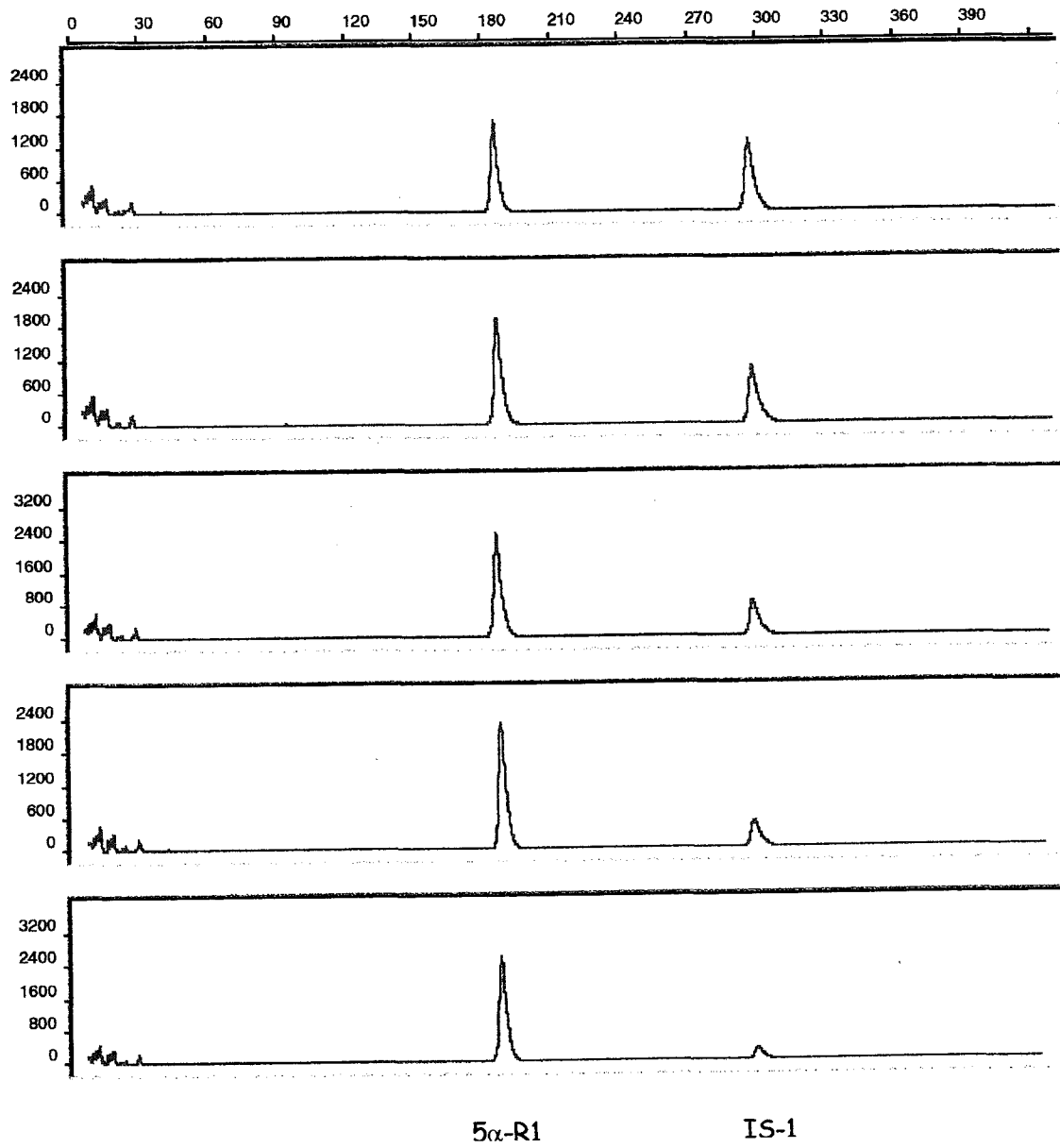


Fig. 70. RT-PCR cuantitativa de 5α-R1/IS-1 en corteza prefrontal de cerebro de rata C.

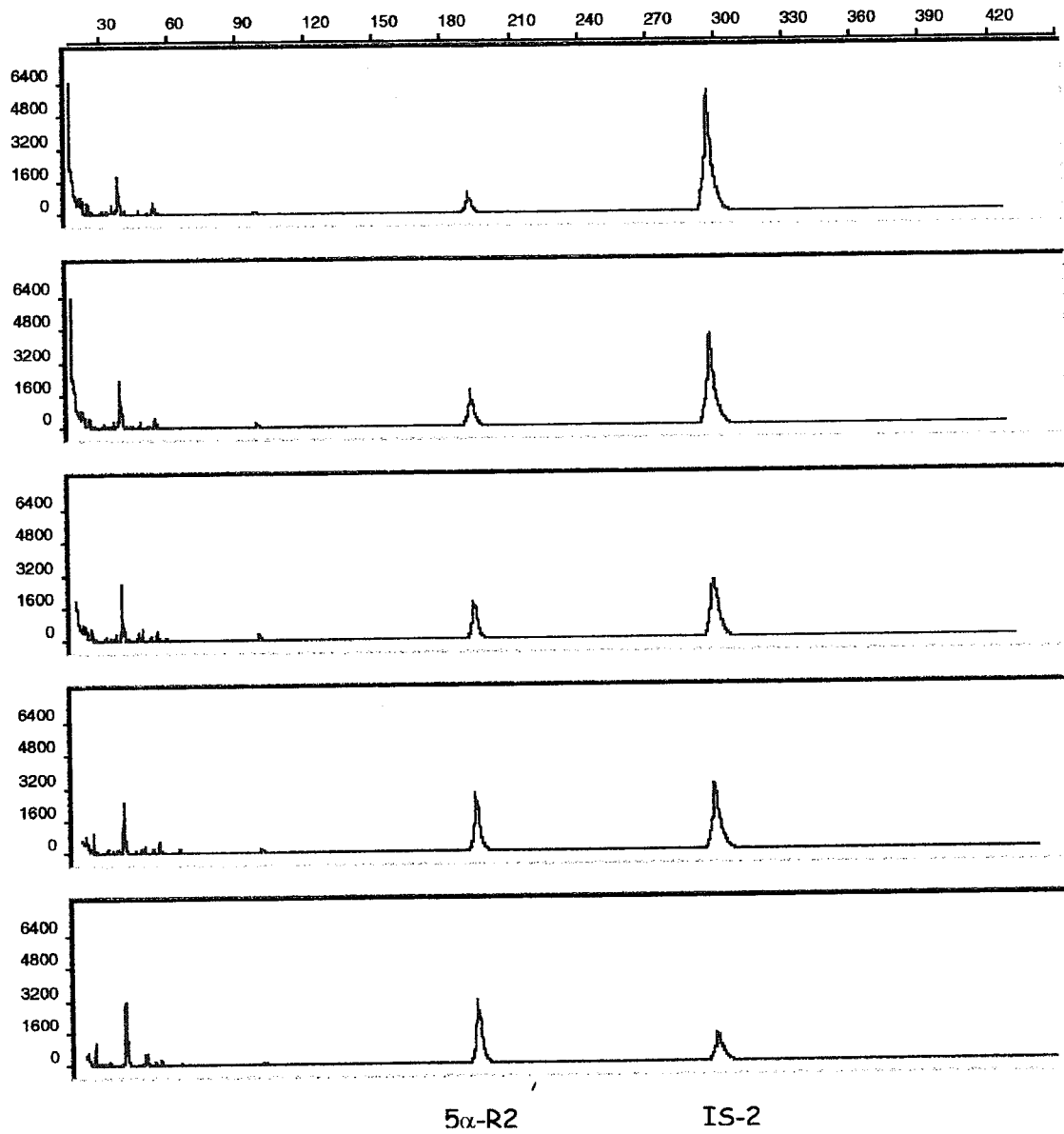


Fig. 71. RT-PCR cuantitativa de 5α-R2/IS-2 en corteza prefrontal de cerebro de rata C.

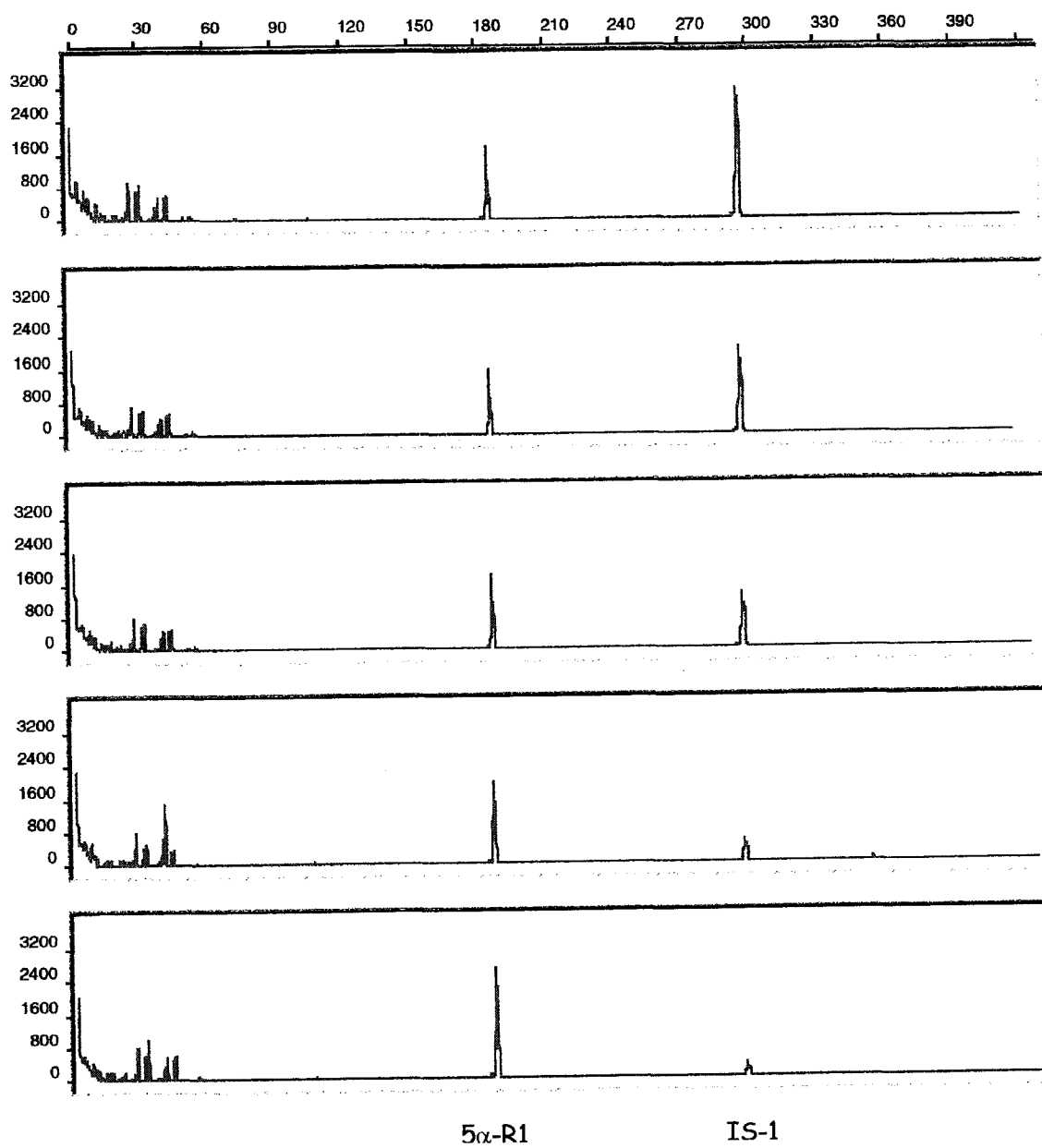


Fig. 72. RT-PCR cuantitativa de 5α-R1/IS-1 en corteza prefrontal de cerebro de rata I+T.

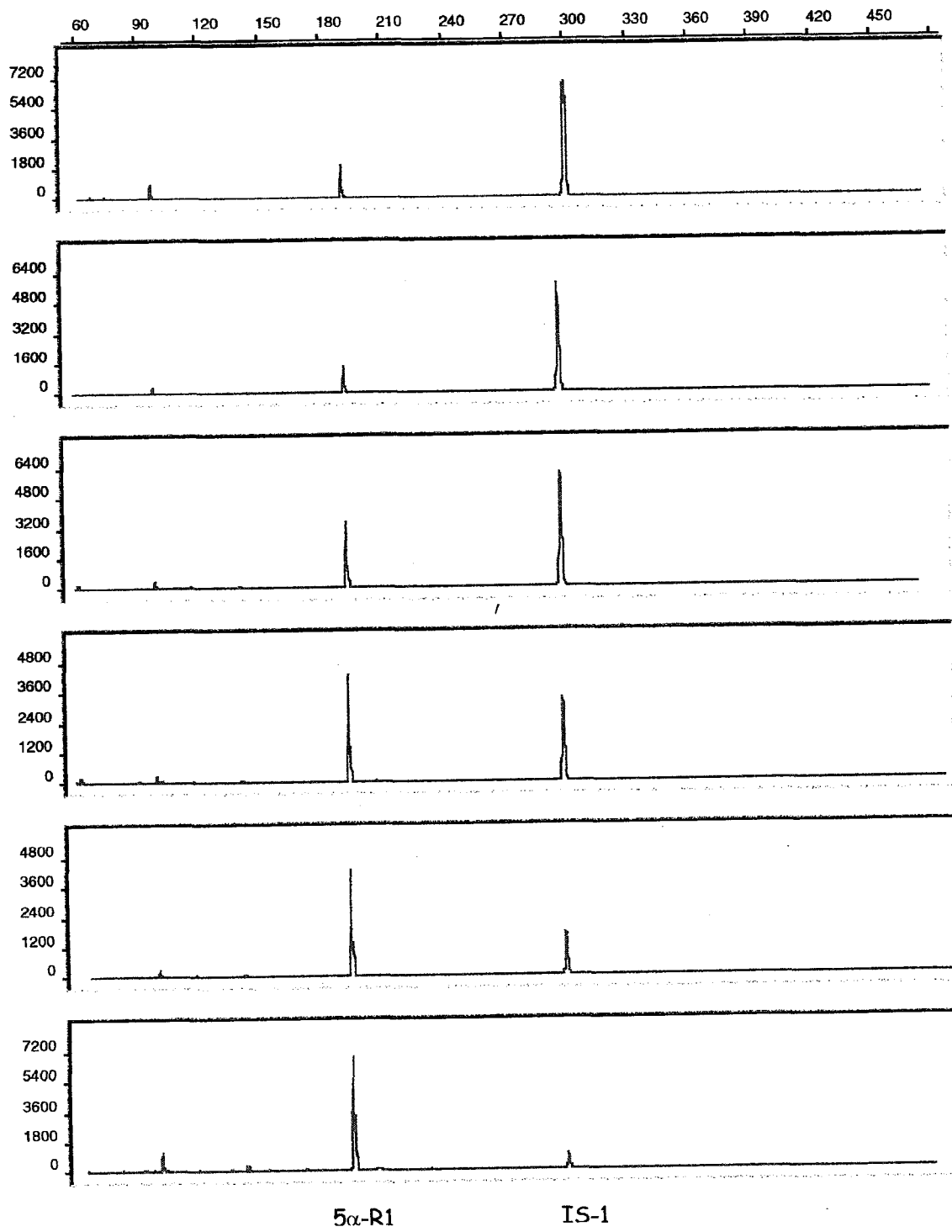


Fig. 73. RT-PCR cuantitativa de 5α-R2/IS-2 en corteza prefrontal de cerebro de rata I+T.

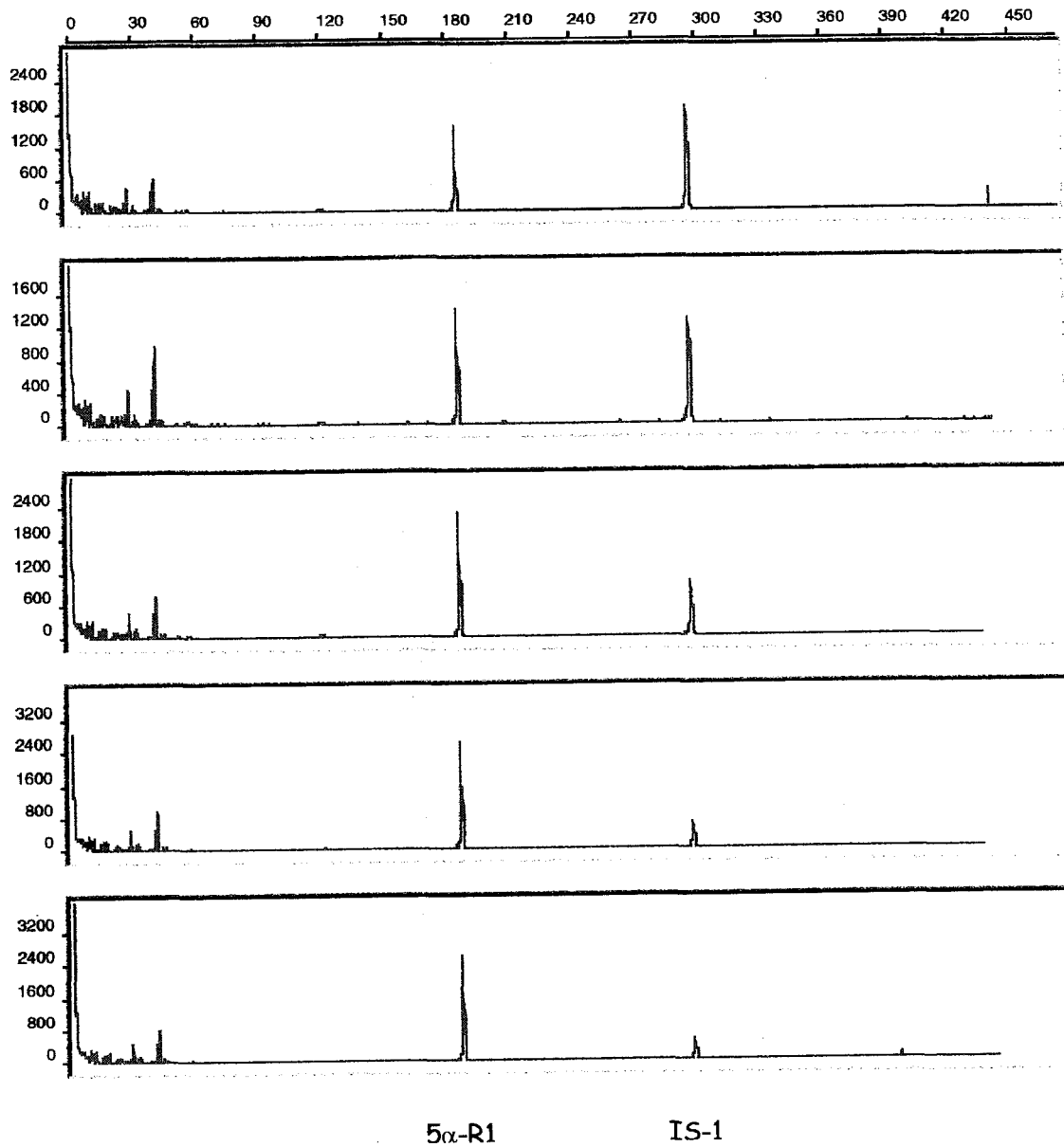


Fig. 74. RT-PCR cuantitativa de 5α-R1/IS-1 en corteza prefrontal de cerebro de rata C+T.



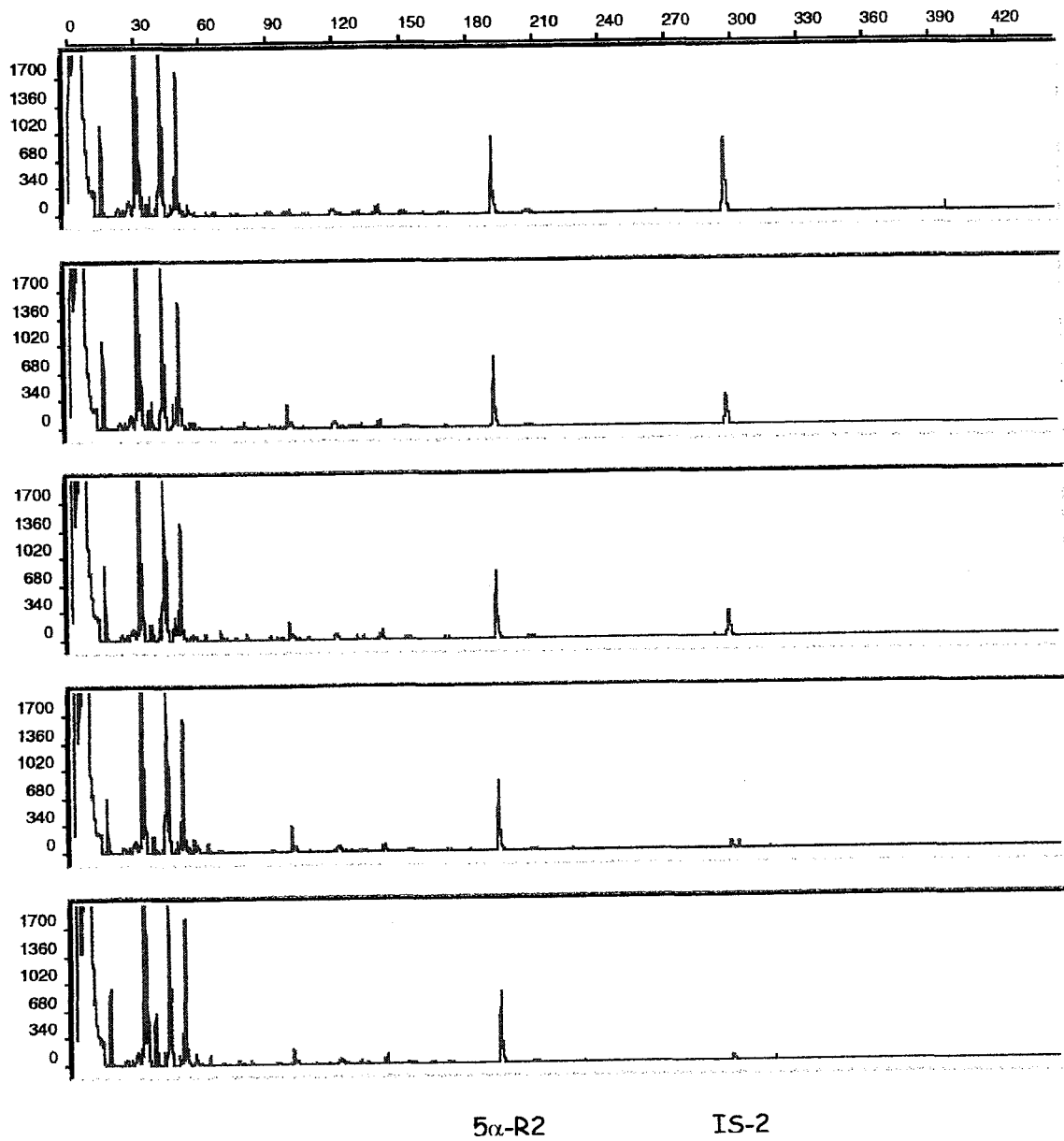


Fig. 75. RT-PCR cuantitativa de 5α-R2/IS-2 en corteza prefrontal de cerebro de rata C+T.

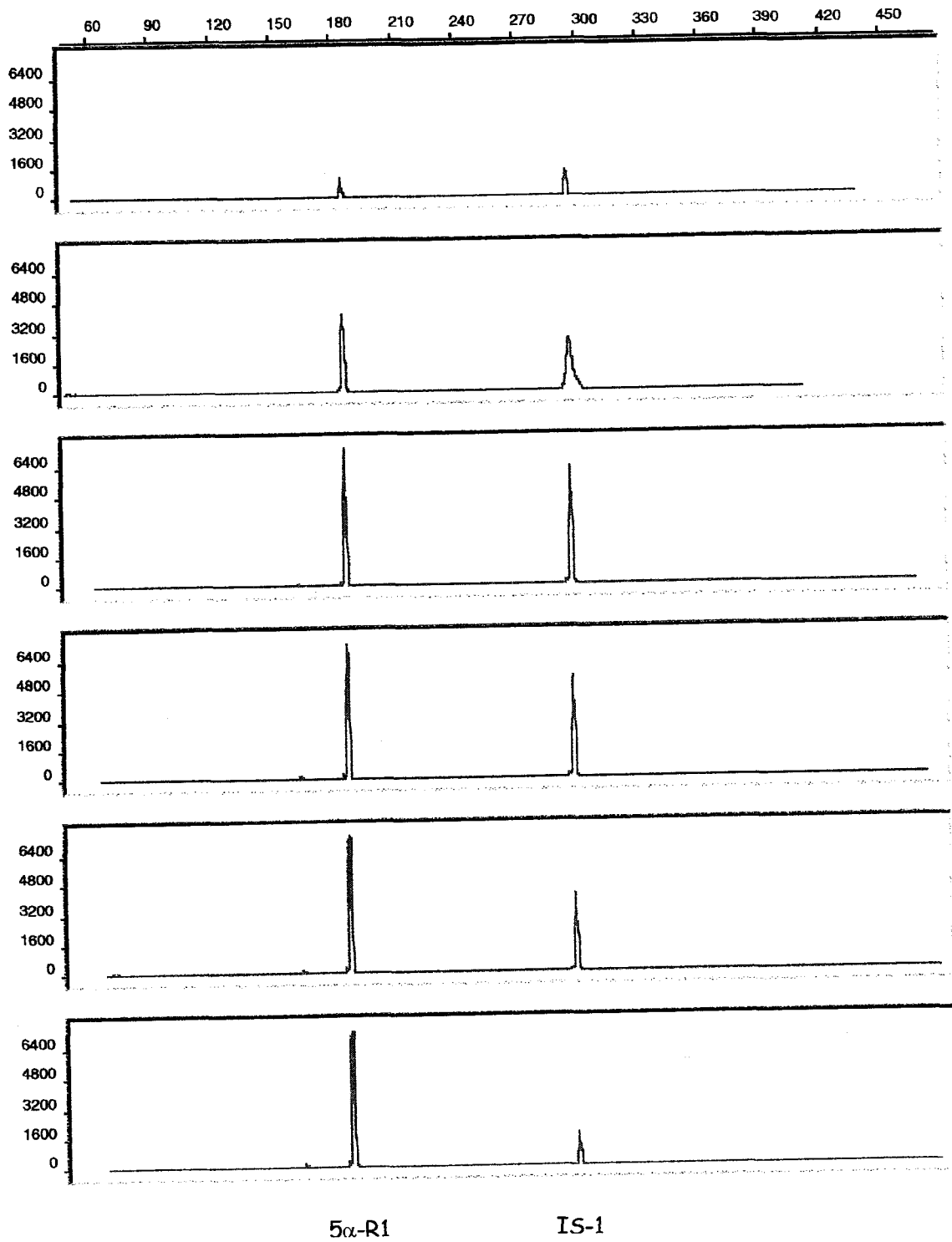


Fig. 76. RT-PCR cuantitativa de 5α-R1/IS-1 en corteza prefrontal de cerebro de rata I+DHT.

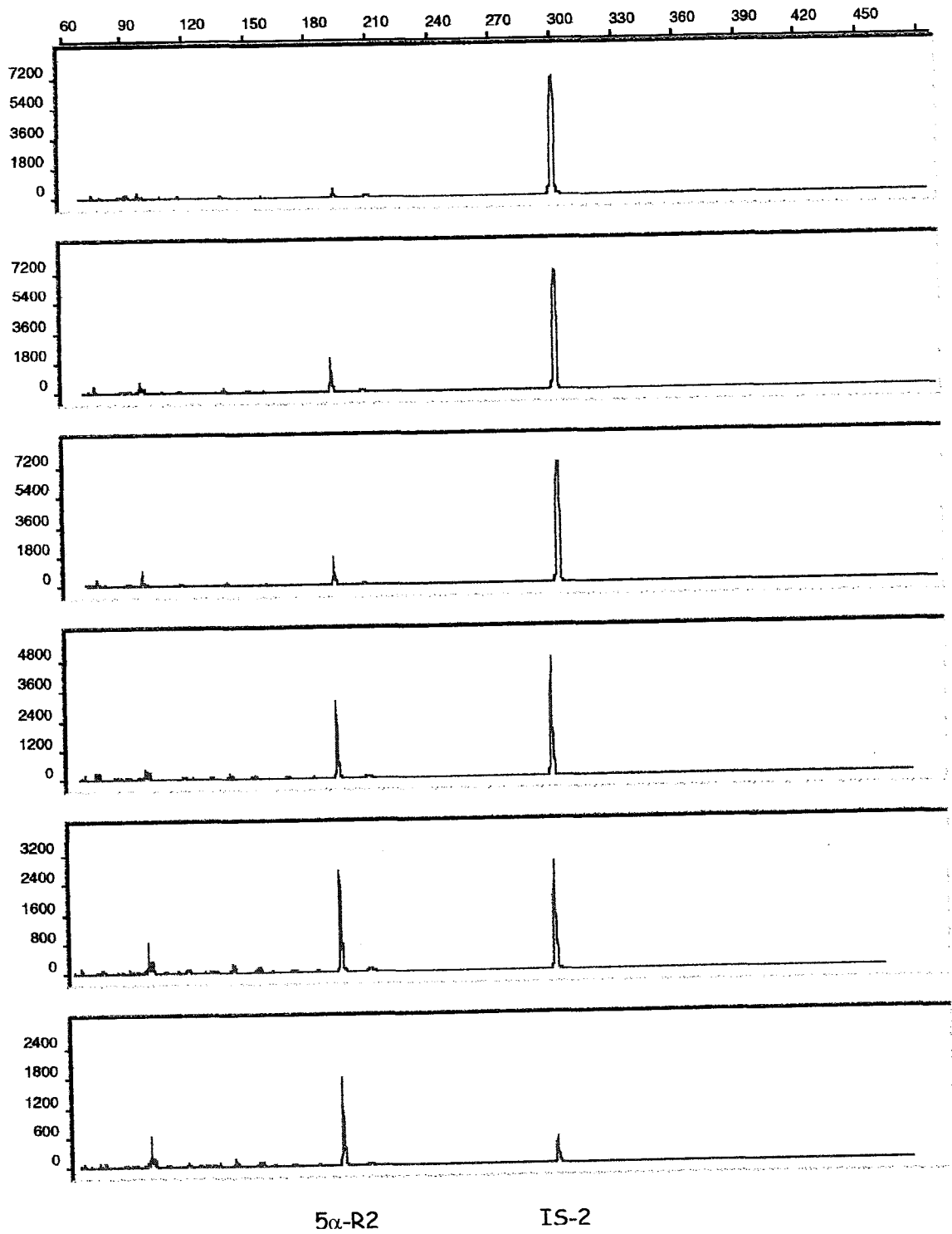


Fig. 77. RT-PCR cuantitativa de 5α-R2/IS-2 en corteza prefrontal de cerebro de rata I+DHT.

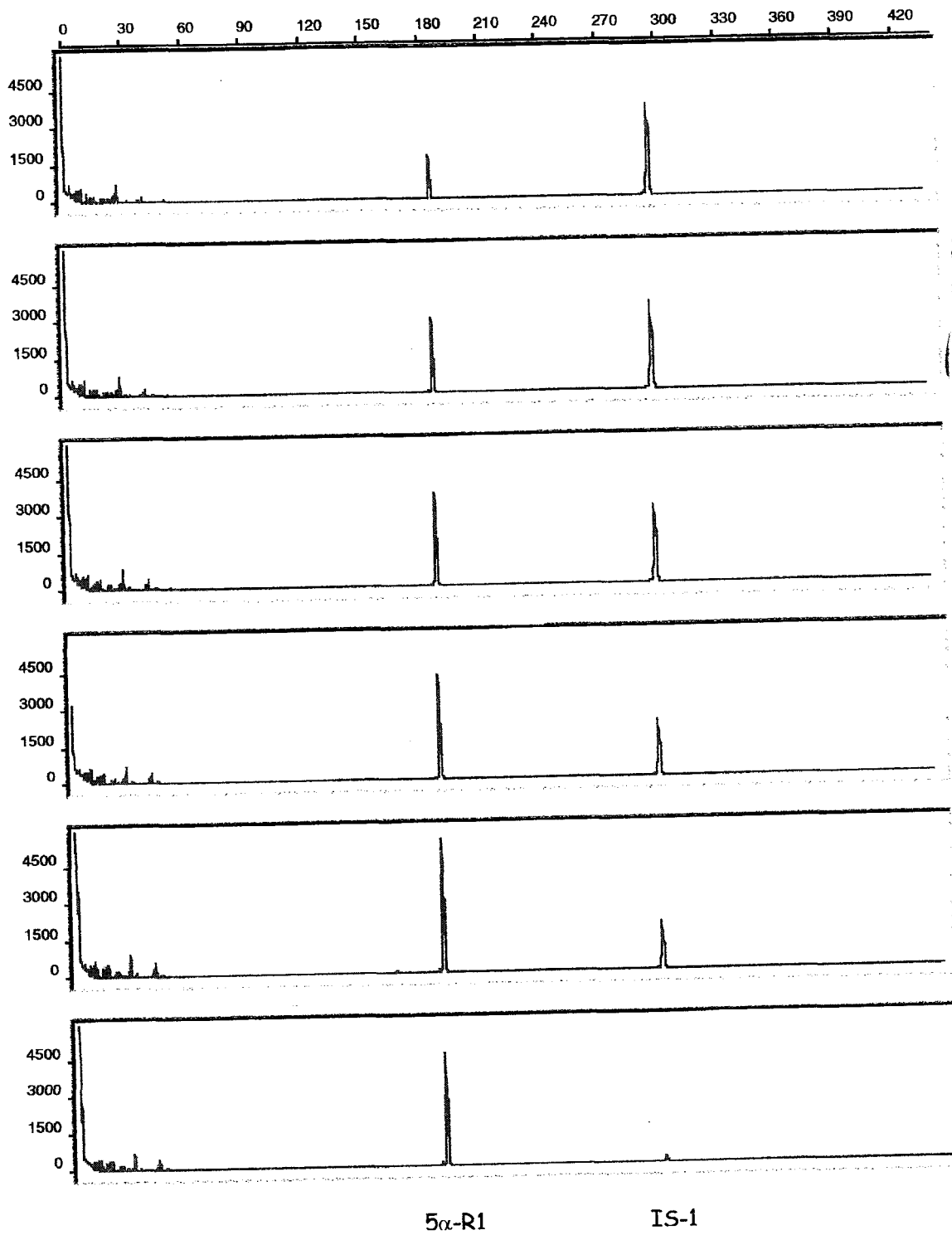


Fig. 78. RT-PCR cuantitativa de 5α-R1/IS-1 en corteza prefrontal de cerebro de rata C+DHT.

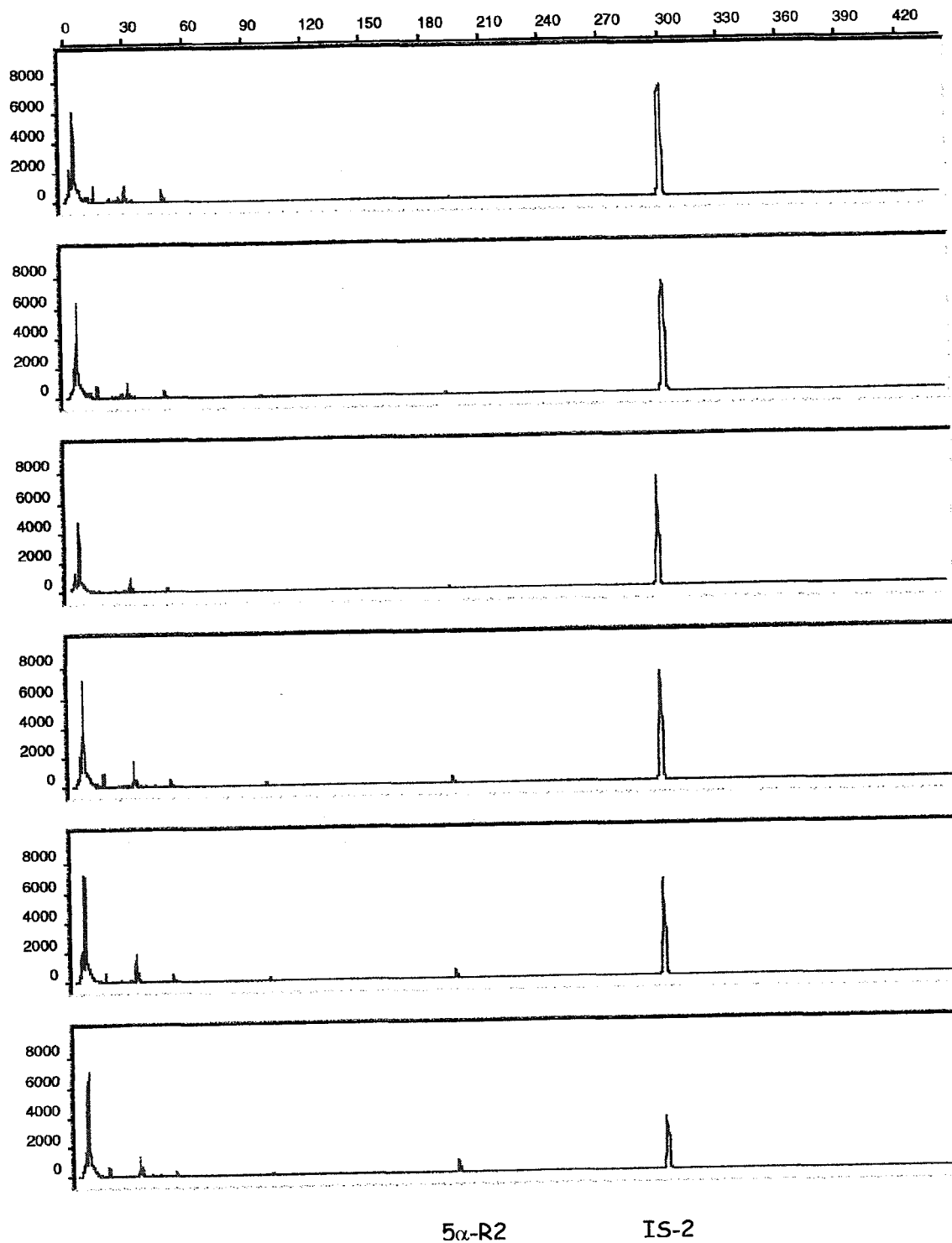


Fig. 86. RT-PCR cuantitativa de  $5\alpha$ -R2/IS-2 en corteza prefrontal de cerebro de rata C+DHT.

Representando el ratio de fluorescencia  $5\alpha$ -R1/IS-1 frente a la cantidad de DNA competidor IS-1, y el ratio de fluorescencia  $5\alpha$ -R2/IS-2 frente a la cantidad de DNA competidor IS-2:

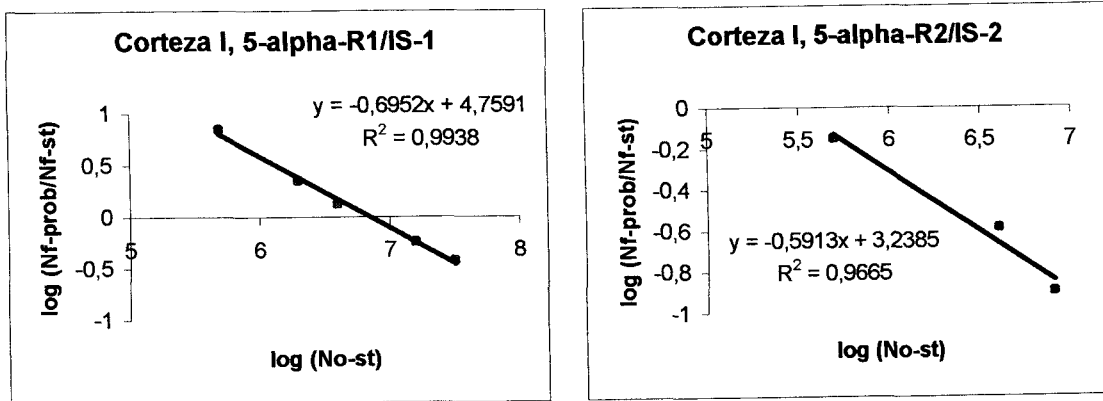


Fig. 80. Relación entre el ratio de fluorescencia 5 $\alpha$ -R1/IS-1 frente a IS-1 y 5 $\alpha$ -R2/IS-2 frente a IS-2 en corteza prefrontal de cerebro de rata I.

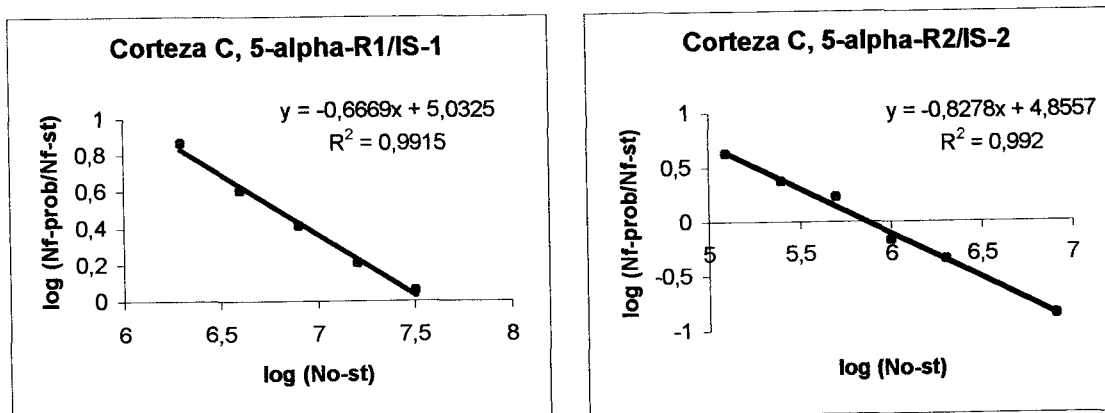


Fig. 81. Relación entre el ratio de fluorescencia 5 $\alpha$ -R1/IS-1 frente a IS-1 y 5 $\alpha$ -R2/IS-2 frente a IS-2 en corteza prefrontal de cerebro de rata C.

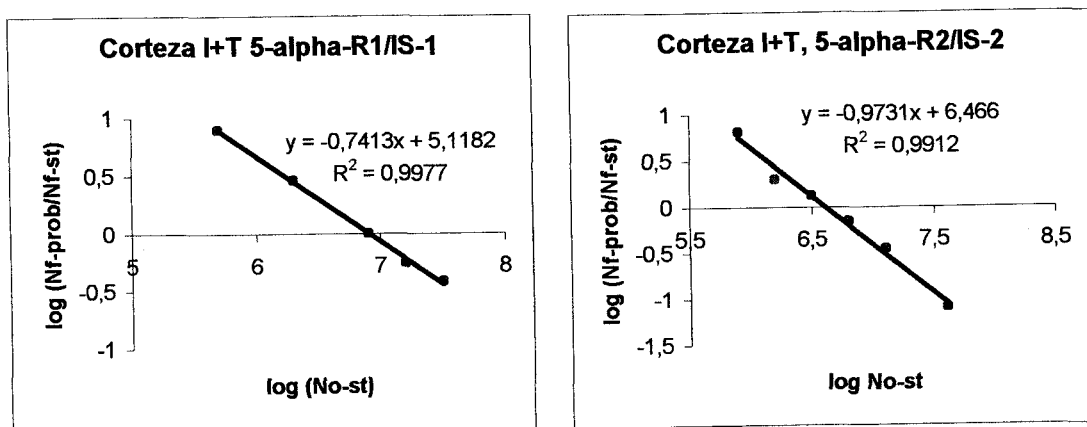


Fig. 82. Relación entre el ratio de fluorescencia 5 $\alpha$ -R1/IS-1 frente a IS-1 y 5 $\alpha$ -R2/IS-2 frente a IS-2 en corteza prefrontal de cerebro de rata I+T.

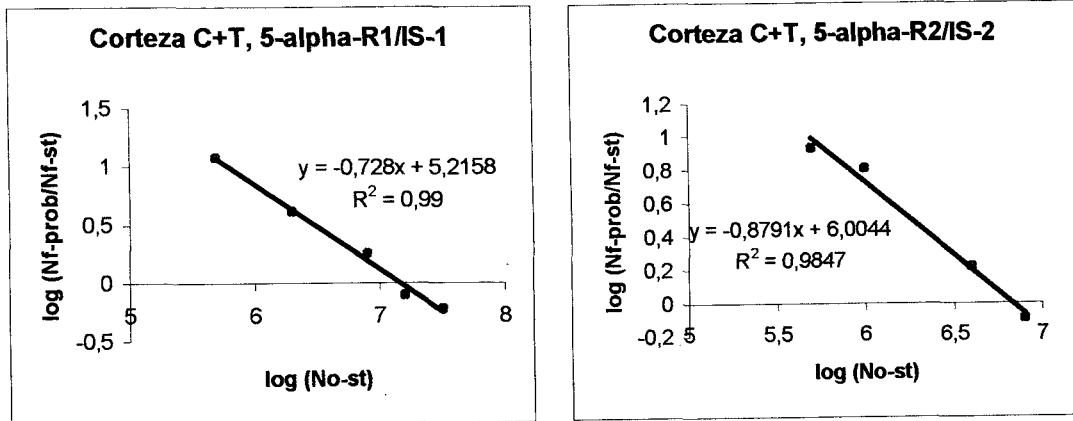


Fig. 83. Relación entre el ratio de fluorescencia 5 $\alpha$ -R1/IS-1 frente a IS-1 y 5 $\alpha$ -R2/IS-2 frente a IS-2 en corteza prefrontal de cerebro de rata C+T.

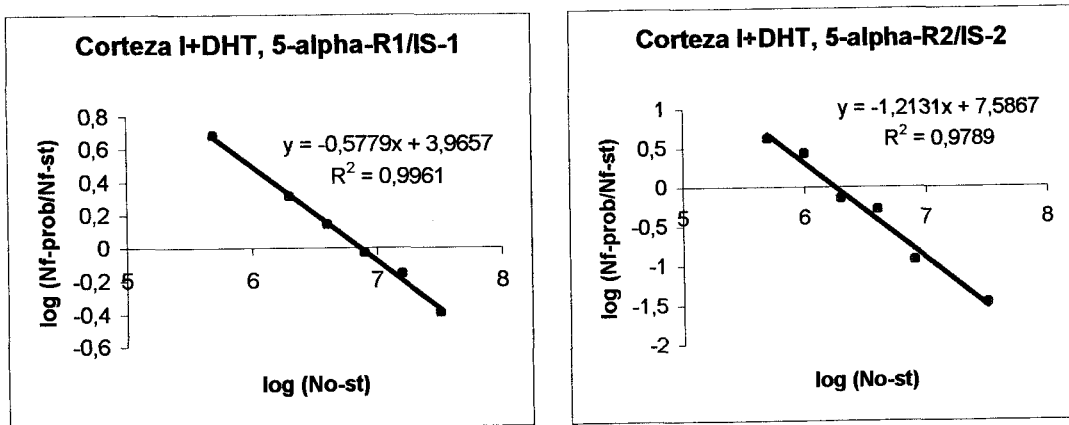


Fig. 84. Relación entre el ratio de fluorescencia 5 $\alpha$ -R1/IS-1 frente a IS-1 y 5 $\alpha$ -R2/IS-2 frente a IS-2 en corteza prefrontal de cerebro de rata I+DHT.

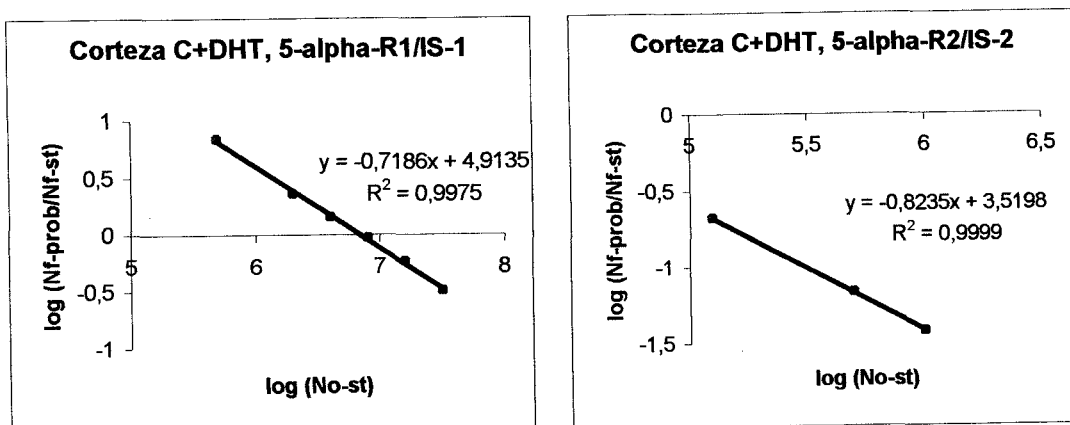


Fig. 85. Relación entre el ratio de fluorescencia 5 $\alpha$ -R1/IS-1 frente a IS-1 y 5 $\alpha$ -R2/IS-2 frente a IS-2 en corteza prefrontal de cerebro de rata C+DHT.

En la figura 86 se muestran los niveles de mRNA para  $5\alpha$ -R1 y  $5\alpha$ -R2 en corteza prefrontal de cerebro de rata en las distintas situaciones experimentales estudiadas.

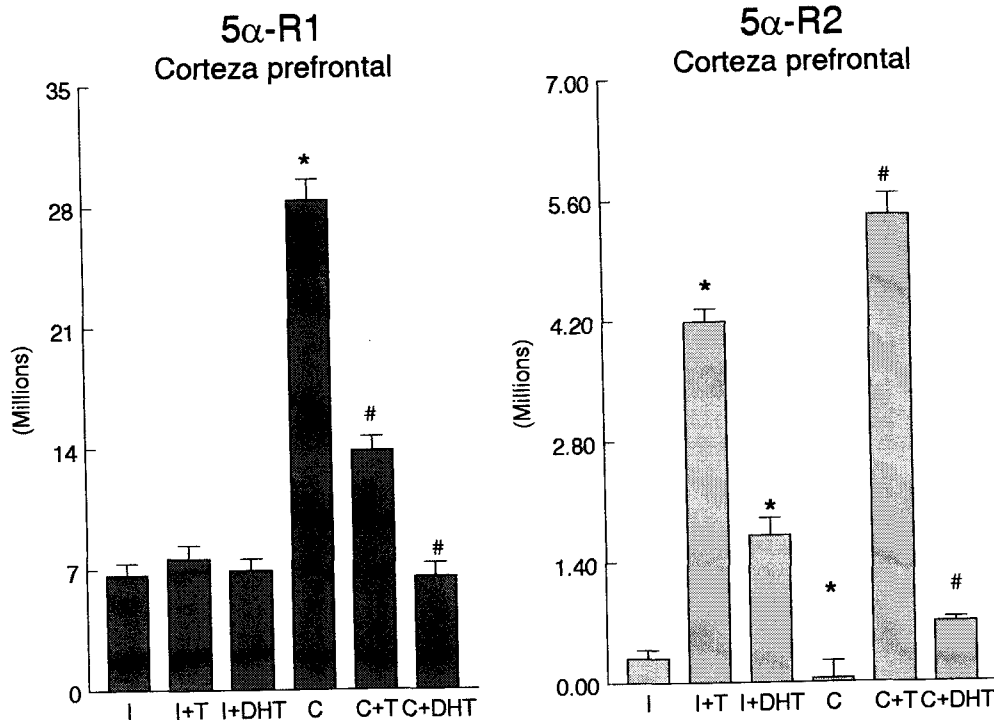


Fig. 86. Niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 y  $5\alpha$ -R2 en corteza prefrontal de cerebro de rata en distintas situaciones experimentales.

Los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 aumentan de forma significativa en los animales castrados con respecto a los intactos. Después del tratamiento con T, se produce un descenso significativo de los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 en los animales castrados en comparación con el mismo grupo sin tratamiento. Del mismo modo, después del tratamiento con DHT se produce un descenso significativo en los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 en los animales castrados en comparación con el mismo grupo sin tratamiento.



Los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R2 aumentan de forma significativa en animales castrados con respecto a animales intactos. Después del tratamiento con T, se produce un aumento significativo en los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R2 en animales intactos y castrados en comparación con sus respectivos grupos sin tratamiento. Después del tratamiento con DHT, se produce un aumento significativo en los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R2 en animales intactos, aunque este efecto es menor que el observado para la T. Sin embargo, en los animales castrados se produce una disminución significativa en los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R2 en comparación con el mismo grupo sin tratamiento.

*Cuantificación de neuroesteroides en plasma y cerebro de rata tras la administración de CRH y ACTH.*

En la figuras 87 y 88 se muestran los niveles de progesterona (PROG), dihidroprogesterona (DHP) y alopregnenolona en plasma y cerebro de ratas macho y hembra, respectivamente.

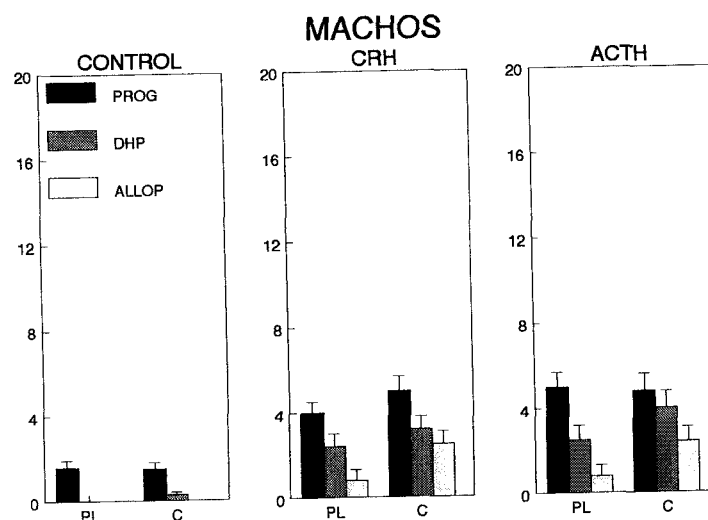


Fig. 87. Niveles de neuroesteroides  $3\alpha,5\alpha$ -reducidos en plasma y cerebro de rata macho.

En machos control, los niveles plasmáticos de DHP y alopregnenolona están por debajo del límite de detección del ensayo. En cerebro sí fueron detectables, sin embargo la alopregnenolona se detecta a muy baja concentración (fig. 87). Después de la administración de CRH y ACTH, los niveles de PROG en plasma y cerebro aumentaron, mientras que los niveles de DHP y alopregnenolona aumentaron hasta los niveles de detección.

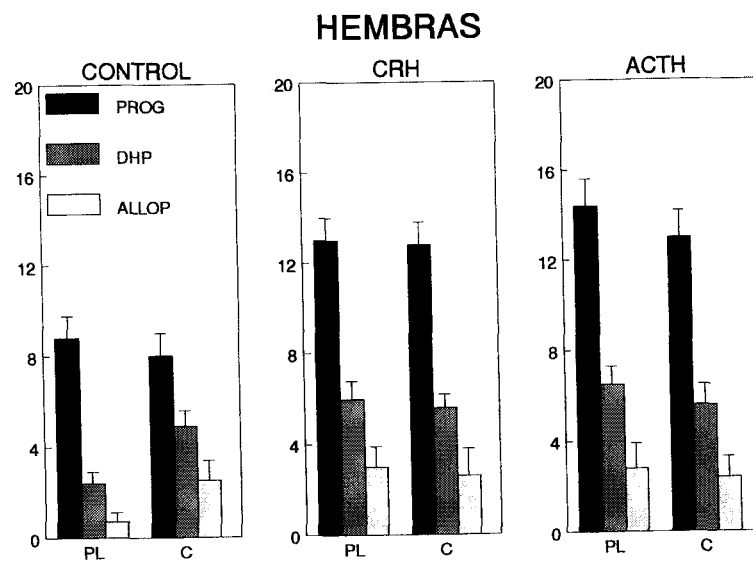
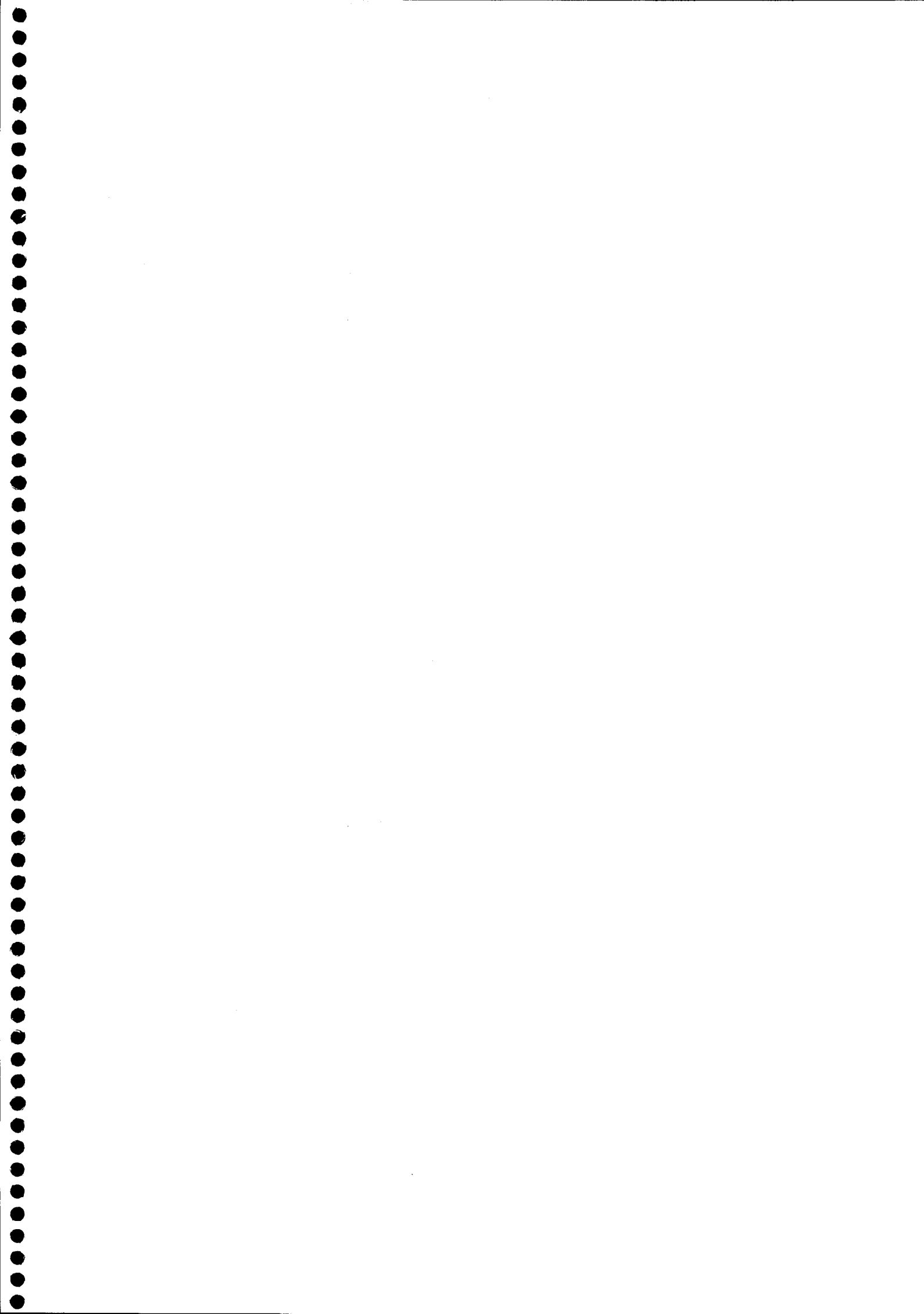


Fig. 88. Niveles de neuroesteroides  $3\alpha,5\alpha$ -reducidos en plasma y cerebro de rata hembra.

En hembras control, los niveles plasmáticos de PROG fueron mayores que en machos, mientras que DHP y alopregnenolona se presentan en niveles cuantificables. Los niveles de PROG, DHP y alopregnenolona en cerebro también son cuantificables (fig. 88). Después del tratamiento con CRH y ACTH incrementaron los niveles plasmáticos y cerebrales de PROG, DHP y alopregnenolona.

*V. DISCUSIÓN*



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

Las hormonas androgénicas sintetizadas en los testículos controlan la diferenciación de la glándula prostática durante el desarrollo embrionario, así como el crecimiento posterior de este tejido durante el periodo postnatal. En algunos órganos diana, entre ellos la próstata, la T se convierte en DHT por acción del enzima  $5\alpha$ -Reductasa ( $5\alpha$ -R) (EC 1.3.99.5) (Russel y Wilson, 1994). La DHT es un andrógeno mucho más potente que la T en algunos sistemas biológicos, siendo el andrógeno responsable del desarrollo, maduración y funcionalidad de la próstata.

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

Los dos isoenzimas presentan una homología de secuencia del 46% aproximadamente, comparten similares sustratos y presentan perfiles de hidrofobicidad parecidos. Sin embargo, difieren en sus niveles de expresión en la próstata, pH óptimo de actividad y sensibilidad a ciertos inhibidores 4-azaesteroideos (Jenkins y col., 1992). Además, mutaciones en el gen que codifica el isoenzima tipo 2, pero no así en el isoenzima tipo 1, son responsables de una alteración fenotípica en la diferenciación sexual masculina conocida como *deficiencia en 5 $\alpha$ -Reductasa*.

La expresión de la 5 $\alpha$ -R está regulada por andrógenos en un gran número de tejidos y especies. El tejido mejor estudiado ha sido la próstata de rata, un tejido dependiente de andrógenos con unas propiedades que lo convierten en el tejido ideal objeto de estudio. La administración tanto de T como de DHT causan un incremento significativo en los niveles de mRNA de ambos isoenzimas, consiguiéndose además la restauración del peso de la próstata en animales castrados. El hecho de que la DHT regule de forma positiva la expresión de los genes que codifican para su propia biosíntesis, resulta en un mecanismo inusual de regulación conocido con el nombre de *regulación feed-forward*. Este mecanismo de autorregulación se ha descrito para varios genes que juegan un papel crucial en el desarrollo y que se caracterizan porque la célula requiere una gran cantidad del producto del gen en un periodo de tiempo corto, ya sea para activar un determinado cambio en el desarrollo (Bell y col., 1991), regular el ciclo celular (Cross y col., 1991) o, como en el caso de la 5 $\alpha$ -Reductasa, para sintetizar una hormona que actúa como morfogen.

Por otro lado, la DHT es el andrógeno responsable del desarrollo y progresión de la hipertrofia benigna de próstata (HBP), una patología que afecta a un gran número de varones mayores de 55 años y que, junto con el cáncer de próstata, supone un problema de salud pública en el mundo occidental debido a su elevada y creciente incidencia (Novelli y col., 2001). El crecimiento de la glándula prostática y su posterior hiperplasia están parcialmente regulados por la  $5\alpha$ -R2, que podría estar también implicada en otras patologías prostáticas como el cáncer de próstata, ya que se han encontrado mutaciones en el gen SRD5A2 (el cual codifica para  $5\alpha$ -R2) asociadas a ciertos tipos de carcinomas prostáticos (Jaffe y col., 2000; Latil y col., 2001; Shibata y col., 2001). El papel que juega la  $5\alpha$ -R1 en las patologías prostáticas no está claro. Algunos autores no han encontrado expresión de  $5\alpha$ -R1 en próstata humana aunque si se detecta en próstata de rata (Thigpen y col., 1993). Sin embargo, otros estudios llevando a cabo técnicas de RT-PCR semicuantitativa han detectado la presencia de  $5\alpha$ -R1 en próstata humana y un aumento en sus niveles de expresión en ciertos tipos de cáncer de próstata (Iehle y col., 1999). Por todo ello se hace necesario disponer de una metodología adecuada que permita poder cuantificar de forma rápida, exacta y precisa los niveles de mRNA de ambas isoenzimas de la  $5\alpha$ -R.

En este trabajo experimental se han estudiado los efectos que tienen los andrógenos T y DHT sobre los niveles de mRNA de ambas isoenzimas de la  $5\alpha$ -R en distintos tejidos de la rata y en diferentes estados androgénicos.

En primer lugar se utilizó una técnica de RT-PCR semicuantitativa en la que los distintos cDNAs problema correspondientes a los isoenzimas tipo 1 y

tipo 2 de la  $5\alpha$ -R se co-amplifican junto a un gen estructural de expresión constante, el gen de la GAPDH, refiriendo los resultados a la expresión de este gen estructural. Patrón y problema se co-amplifican en el mismo tubo con cebadores distintos.

Una de las características que tiene que cumplir una técnica de RT-PCR semicuantitativa es que la eficiencia de amplificación (E) de patrón y problema tiene que ser constante en el número de ciclos usado. Para ellos es necesario fijar para patrón y problema el rango en el que se encuentra la fase exponencial donde E es constante. Así, a la vista de las figuras 5-7 se estableció la fase exponencial de amplificación común para los 3 cDNA ( $5\alpha$ -R1,  $5\alpha$ -R2 y GAPDH) en 32 ciclos. Esta aparición tardía de la fase exponencial en 32 ciclos se debe a la escasa eficiencia de retrotranscripción que se consigue con los kits comerciales de RT utilizados y que, en ningún caso superan el 35%. La eficiencia de RT en los ensayos de RT-PCR semicuantitativa se calculó en un 27%.

Una vez establecida la fase exponencial de amplificación se estudió la expresión de ambas isoenzimas de la  $5\alpha$ -R en próstata de rata en distintas situaciones experimentales, refiriendo su expresión a la del gen de la GAPDH. Los resultados de la figura 12 demuestran que ambas isoenzimas están regulados de forma positiva por la T ya que los niveles de mRNA de ambas isoenzimas disminuyen significativamente tras la castración y se reponen con el tratamiento de T. Sin embargo, estos resultados no están de acuerdo con la literatura existente (George y col., 1991) ya que, si bien el perfil de expresión de ambas isoenzimas es el esperado en función de su estado androgénico, en



todos los grupos experimentales el mRNA que aparece en mayor proporción es el correspondiente a 5 $\alpha$ -R1, cuando es bien conocido que el isoenzima más abundante en tejido prostático es el de 5 $\alpha$ -R2.

Este hecho podría deberse en principio a dos motivos: En primer lugar, la eficiencia de amplificación podría estar viéndose afectada a nivel del anillamiento de los cebadores *sentido* en función del marcaje con distintos fluoróforos; conviene recordar que los fluoróforos son moléculas orgánicas de gran tamaño con abundantes anillos aromáticos y que podrían de alguna manera interferir en el anillamiento de los cebadores con el cDNA. Otra explicación a este fenómeno hay que buscarla en la distinta emisión de fluorescencia producida por la excitación de los fluoróforos con los que se encuentran marcados los cebadores *sentido*. Así la mayor intensidad de fluorescencia la presenta el fluoróforo 6-FAM (azul), seguido por el TET (verde) y por último el HEX (negro). Esta diferencia en la intensidad de fluorescencia está produciendo el falseamiento en los resultados que se observa en la figura 12.

Puesto que la técnica de electroforesis capilar permite diferenciar perfectamente entre dos productos de PCR que difieran en apenas un par de pares de bases (pb), y nuestros cDNAs problema se separan perfectamente por tamaño, la solución a este problema fue marcar todos los cebadores *sentido* con el mismo fluoróforo, siendo el fluoróforo de elección el de mayor intensidad de fluorescencia, el 6-FAM (azul). Efectivamente, dos ensayos paralelos (figs. 13 y 14) llevados a cabo en las mismas condiciones diferenciándose únicamente en el marcaje de los cebadores *sentido*, puso de manifiesto las diferencias en los niveles de mRNA de ambos isoenzimas de la

5 $\alpha$ -R y de GAPDH debidas a la diferente intensidad de fluorescencia emitida por los distintos fluoróforos.

Una vez solucionado este problema se calculó de nuevo la fase exponencial de amplificación de cada cDNA resultando ser de nuevo 32 ciclos. Como era de esperar, el marcaje de los cebadores con el mismo o con distinto fluoróforo no afecta a la eficiencia de amplificación.

En la figura 23 se muestra la determinación de los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en próstata de rata mediante RT-PCR semicompetitiva en distintas situaciones experimentales y utilizando todos los cebadores *sentido* marcados con el fluoróforo 6-FAM. El índice 5 $\alpha$ -R1/GAPDH, en contra de lo que cabría esperar en un principio, se encuentra aumentado aunque de forma no significativa en animales castrados en comparación con animales intactos. Del mismo modo, la administración de T a animales intactos y castrados resultó en un descenso del índice 5 $\alpha$ -R1/GAPDH, siendo este descenso mucho más marcado en animales intactos. El tratamiento con DHT de animales intactos también resultó en un descenso del índice 5 $\alpha$ -R1/GAPDH.

Estos resultados sorprendentes de la expresión de 5 $\alpha$ -R1 en próstata de rata nos llevan a pensar que la dependencia de la expresión de un gen estructural, como es el gen de la GAPDH, puede conducir a error cuando este gen control se encuentra afectado por las condiciones experimentales o fisiológicas, como es el caso descrito para el gen de la  $\beta$ -actina para fibroblastos (Wong y col., 1994). Es importante señalar que la GAPDH es un enzima glucolítico y por tanto, el tratamiento con anabolizantes como pueden

ser los andrógenos va a favorecer el metabolismo de síntesis y podría verse afectada la regulación de este gen en función de la situación metabólica del tejido en las distintas situaciones experimentales.

Por otra parte, el índice  $5\alpha$ -R2/GAPDH disminuye de forma significativa en animales castrados con respecto a animales intactos. El tratamiento con T de animales intactos y castrados resultó en un aumento del índice  $5\alpha$ -R2/GAPDH en comparación con sus respectivos grupos sin tratamiento. Por último, el tratamiento con DHT de animales intactos resultó en un descenso aunque no significativo del índice  $5\alpha$ -R2/GAPDH. A la vista de estos resultados de la figura 30 se observa que, a diferencia de lo que ocurre para  $5\alpha$ -R1, la T regula de forma positiva los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R2, es decir, las diferencias en la expresión de GAPDH debidas a la T cuantitativamente serían menos importantes que las producidas por la regulación hormonal ejercida sobre la  $5\alpha$ -R2 en la próstata. Así, la aportación de la GAPDH al índice  $5\alpha$ -R2/GAPDH quedaría "enmascarada" de alguna manera por la importancia fisiológica que tiene la regulación hormonal de la  $5\alpha$ -R2 en el tejido prostático.

Esto se confirma cuando se determinan los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 en hígado de rata en distintas situaciones experimentales (fig. 29). Los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 en animales castrados disminuyen aunque de forma no significativa con respecto a animales intactos. La administración de T a animales intactos y castrados resultó en un aumento en el índice  $5\alpha$ -R1/GAPDH en comparación con sus respectivos grupos sin tratamiento. La administración de DHT a animales intactos también produce un aumento significativo del índice  $5\alpha$ -R1/GAPDH en comparación con animales intactos, aunque este

aumento es menor que el observado para el caso de la T. El hígado, al igual que ocurre con la  $5\alpha$ -R2 en la próstata, es el tejido en el que preferencialmente se expresa el isoenzima tipo 1 de la  $5\alpha$ -R y por tanto la regulación ejercida por las hormonas androgénicas sobre la expresión del mRNA de  $5\alpha$ -R1 va a ser cuantitativamente más importante que las diferencias que se puedan producir en la expresión de GAPDH por el tratamiento con andrógenos.

Hasta ahora, las técnicas de RT-PCR semicuantitativas que hemos utilizado para estudiar los efectos que ejercen los andrógenos T y DHT sobre los niveles de mRNA de ambos isoenzimas de la  $5\alpha$ -R, no han conseguido establecer de una forma clara la regulación ejercida por estos andrógenos sobre la expresión génica de dichos isoenzimas en los distintos tejidos y situaciones experimentales estudiadas. Como se mencionó con anterioridad, existen genes que, bien por estar implicados en una determinada patología, bien por jugar un papel fisiológico importante, etc. requieren métodos de cuantificación con la suficiente sensibilidad para caracterizarlos.

Por este motivo, en este trabajo experimental se presenta el diseño de un nuevo método rápido, preciso y relativamente poco laborioso de RT-PCR cuantitativa acoplado a electroforesis capilar para cuantificar los niveles reales de expresión de ambos isoenzimas de la  $5\alpha$ -R. Este método combina el alto grado de especificidad de la RT-PCR competitiva con la sensibilidad de la electroforesis capilar. Para ello, el RNA total extraído del tejido se retrotranscribe (cDNA problema) y se mezcla con una cantidad conocida (número de moléculas) de un fragmento sintético de DNA (estándar interno, IS). Estándar interno y cDNA problema se amplifican por PCR en el mismo tubo

usando el mismo par de cebadores. Después de la separación por electroforesis capilar de los distintos productos de PCR, la cantidad de mRNA problema se cuantifica comparando la intensidad de fluorescencia del cDNA problema con la intensidad de fluorescencia producida por la cantidad conocida del estándar interno.

El uso de la RT-PCR acoplada a electroforesis capilar (EC) para el análisis de los niveles de mRNA se ha incrementado en los últimos años (Richards y col., 2000; Borson y col., 1998; Jensen y col., 1998; Shammas y col., 1999; Murata y col., 1997; Torres y col., 2002).

Se han descrito métodos de RT-PCR semicuantitativa y cuantitativa para el estudio de la  $5\alpha$ -R así como de otros genes (Berthaut y col., 1997; Courchay y col., 1996; Orly y col., 1994; Gilliland y col., 1990; Rappolee y col., 1988; Singer-Sam y col., 1990). Las técnicas de RT-PCR competitiva implican la adición de una cantidad conocida de un estándar a una muestra de cDNA y la posterior amplificación de estándar y cDNA problema en la misma reacción. El estándar interno y el cDNA utilizan el mismo par de cebadores para la amplificación, presentándose un fenómeno de competencia por los recursos del sistema como son los cebadores, dNTPs y polimerasa. Ya que se conoce la cantidad de estándar añadido a la RT-PCR, se puede determinar la cantidad inicial de cDNA.

Una desventaja que presentan las técnicas de RT-PCR cuantitativa es que los resultados se presentan en función de la cantidad de RNA añadida al

comienzo de la retrotranscripción, por lo que la concentración de RNA tiene que determinarse con gran precisión.

Básicamente existen dos métodos para la construcción de moléculas sintéticas utilizadas como estándar internos en RT-PCR competitiva.

- 1) Competidores en forma de RNA. En este caso se aísla el cDNA problema y se modifica mediante algún procedimiento que luego permita su separación y diferenciación del cDNA problema. Lo más habitual es introducir una diana de restricción o delecionar un pequeño fragmento. A continuación se clona en un vector de expresión y se transcribe usando el promotor de la RNA polimera T7, de manera que obtenemos un fragmento sintético de RNA casi idéntico en tamaño y secuencia al mRNA problema. Este tipo de competidores se añade a la muestra de RNA antes de la retrotranscripción. Esto representa una enorme ventaja ya que la eficiencia de retrotranscripción y amplificación de ambas moléculas va a ser prácticamente idéntica. Sin embargo, presentan la desventaja de que su construcción es un proceso muy laborioso.
- 2) El segundo tipo de competidores se conocen como moléculas "miméticas" (del inglés, "mimic"), construcciones que presentan idénticas secuencias de anillamiento de los cebadores que el cDNA problema flanqueando una secuencia no relacionada con el cDNA problema. Este tipo de competidores puede añadirse a la muestra antes o después de la retrotranscripción.

La estrategia propuesta en nuestro trabajo experimental es obtener los diferentes estándar internos de una forma rápida y simple mediante dos amplificaciones por PCR consecutivas, de manera que compartan idénticas secuencias de anillamiento de cebadores con el cDNA problema y presentan un tamaño molecular muy parecido sin diferencias significativas en la eficiencia de amplificación. Las moléculas "miméticas" generadas de esta manera comparten con el cDNA problema las siguientes variables: Concentración de iones  $Mg^{2+}$  y dNTPs, número de ciclos y condiciones de temperatura y tiempo en la PCR. Así, el índice cDNA problema/DNA competidor permanece constante a lo largo de todo el proceso de amplificación, independientemente del número de ciclos o de cambios en alguna de estas variables.

Utilizando esta nueva técnica de RT-PCR cuantitativa hemos calculado los niveles reales de expresión del mRNA de los isoenzimas tipo1 y tipo 2 de la  $5\alpha$ -R en distintos tejidos y en distintas situaciones experimentales.

La cuantificación de los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 y  $5\alpha$ -R2 en próstata de rata se llevó a cabo utilizando la modalidad "two step" RT-PCR en la que tanto la reacción de RT como la de PCR se llevan a cabo en tubos distintos y por enzimas diferentes. En este caso la RT se hizo utilizando el cebador *antisentido* para generar el cDNA. Los resultados de las RT-PCR cuantitativas para cada mRNA en las distintas situaciones experimentales estudiadas se muestran en las figuras 34-45. Como puede observarse, con cantidades decrecientes del estándar (300 p.b.) aumenta la intensidad relativa del cDNA problema amplificado. En las figuras 46-51 se representa para cada caso el

índice de fluorescencia entre problema y competidor frente a la cantidad inicial de DNA competidor añadido.

Se obtiene el punto  $x_0$  a partir de las rectas de regresión y el valor final de concentración del cDNA problema se corrige mediante el factor de corrección K según la ecuación 6. El factor de corrección K depende de las características de la RT-PCR y es el producto de tres componentes:  $k_1$ ,  $k_2$  y  $k_3$ .  $K_1$  representa la corrección debida a la diferencia de tamaño entre problema y competidor;  $k_2$  representa la corrección debida a la adición del estándar interno en forma de DNA y  $k_3$  representa la eficiencia de retrotranscripción.

En la figura 52 se muestran los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 y  $5\alpha$ -R2 en próstata de rata en las distintas situaciones experimentales estudiadas. Estos resultados demuestran que ambas isoenzimas están regulados de forma positiva por los andrógenos T y DHT, ya que los niveles de mRNA de ambas isoenzimas disminuyeron de forma significativa tras la castración, aunque el efecto fue mayor para  $5\alpha$ -R2. Estos resultados están de acuerdo con los publicados anteriormente por George y col. (1991) en los que se demostraba el efecto positivo que ejerce la T sobre la actividad enzimática  $5\alpha$ -R. Sin embargo, nuestros resultados son más exactos y precisos que los de estos autores por dos razones: 1) cuantificamos niveles de mRNA, no actividad enzimática total y 2) se realiza un estudio por separado del mRNA de cada isoenzima.

En animales castrados, la DHT ejerce un efecto positivo en la expresión génica de ambas isoenzimas, aunque este efecto fue menor que el conseguido



con el tratamiento con T. Esto puede ser debido a que los niveles de DHT intraprostáticos (no medidos en este trabajo) fueran menores en los animales castrados tratados con DHT que en los animales castrados tratados con T, como se demostró anteriormente (George y col., 1991) y como sugieren nuestros propios resultados de niveles plasmáticos de DHT (fig. 54). Una posible explicación a este hecho es que el metabolismo de la DHT posiblemente sea más rápido que el de la T, y sea más rápido en animales castrados que en intactos. El hígado de animales intactos podría tener una concentración superior de esteroides que competirían en su metabolismo hepático con la DHT.

Estos nuevos datos revelan que la DHT regula de forma positiva la expresión génica de ambas isoenzimas de la  $5\alpha$ -R, demostrando a nivel transcripcional la regulación *feed-forward* ejercida por la DHT sobre su propia biosíntesis a través de un incremento en la transcripción de los genes que codifican para  $5\alpha$ -R. Como hemos indicado se ha propuesto que la regulación *feed-forward* juega un papel fundamental en varios sistemas del desarrollo, especialmente en situaciones en las que la concentración local de una molécula como es un morfogén debe ser dramáticamente incrementada para dar un patrón de diferenciación definido (Meinhardt, 1982). La glándula prostática podría constituir un claro ejemplo de esto, explicando la necesidad de regular de forma adecuada la concentración intraprostática de DHT.

Sorprendentemente, el crecimiento de la glándula prostática fue mayor en los animales castrados tratados con DHT que en los animales castrados tratados con T (fig. 53), a pesar de que los niveles plasmáticos de T y DHT así

como la expresión de ambos mRNAs fueron menores en los animales castrados tratados con DHT que en los animales castrados tratados con T. Este fenómeno puede explicarse por efectos de *up-regulation* y *down-regulation* sobre la expresión de varios genes prostáticos dependientes de T y DHT (Avila y col., 1998).

El hecho de que la DHT sea un andrógeno más eficaz en la inducción del aumento de peso de la glándula prostática en comparación con la T, podría tener implicaciones importantes en la acción del receptor de andrógenos. Así, parece ser que existen tres clases de genes respuesta para andrógenos: aquellos que ejercen su acción a través del receptor de andrógenos acoplado a T, aquellos que lo hacen a través del receptor de andrógenos acoplados a DHT y aquellos que responden independientemente del andrógeno acoplado al receptor. Está todavía por determinar si estas diferencias en la respuesta ligando-receptor son debidas a la secuencia del gen dependiente de andrógenos que se vaya a transcribir o bien si son debidas a la interacción del receptor con diferentes proteínas adaptadoras. De cualquier forma, esta hipótesis podría explicar la existencia de dos andrógenos con distintas funciones fisiológicas (Russel y Wilson, 1994).

El importante papel que juegan los isoenzimas de la  $5\alpha$ -R en las patologías prostáticas ha atraído la atención de la industria farmacéutica y se han llevado a cabo numerosas investigaciones a nivel bioquímico y farmacológico sobre dichos isoenzimas. Así, se han sintetizado una serie de inhibidores del isoenzima  $5\alpha$ -R2 (Steers, 2001; Kaplan, 2001) y se ha obtenido un extracto lipo-esteroideo de la planta *Serenoa Repens* que parece inhibir la actividad de

5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 (Boyle y col., 2000; Di Silverio y col., 1998; Bayne y col., 1999; Bayne y col., 2000). Una de las mejores herramientas para estudiar los efectos de un tratamiento farmacológico es la cuantificación de la expresión génica regulada por el fármaco.

Utilizando esta nueva técnica de "two step" RT-PCR cuantitativa estudiamos de nuevo los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 en hígado de rata en distintos estados androgénicos (fig. 67). Estos resultados demuestran que el isoenzima 5 $\alpha$ -R1 está regulado de forma positiva por los andrógenos T y DHT, ya que sus niveles de mRNA disminuyeron de forma significativa tras la castración.

En animales castrados, la DHT ejerce un efecto positivo en la expresión génica de 5 $\alpha$ -R1, aunque este efecto fue menor que el conseguido con el tratamiento con T. Esto puede ser debido a que los niveles de DHT intrahepáticos (no medidos en este trabajo) fueran menores en los animales castrados tratados con DHT que en los animales castrados tratados con T, como sugieren nuestros propios resultados de niveles plasmáticos de DHT. Como ya se apuntó para el caso de la próstata, el metabolismo de la DHT posiblemente sea más rápido que el de la T, y sea más rápido en animales castrados que en intactos. El hígado de animales intactos, por tener el testículo como fuente importante de producción de andrógenos, podría tener una concentración superior de esteroides que competirían en su metabolismo hepático con la DHT. Estos resultados de la DHT regulando de forma positiva la expresión génica del isoenzima 5 $\alpha$ -R1 confirman de nuevo la regulación *feed-*

*forward* ejercida por la DHT sobre su propia biosíntesis, en esta ocasión a nivel hepático.

En el sistema nervioso central se conoce la existencia de la vía de la  $5\alpha$ -reducción (Melcangi y col., 1998). Recientemente se ha podido demostrar que los metabolitos  $5\alpha$ -reducidos de ciertos esteroides desempeñan funciones importantes en el cerebro adulto y podrían tener un papel en el desarrollo del cerebro y en la diferenciación sexual del SNC. Estos esteroides  $3\alpha5\alpha$ -reducidos pueden obtenerse *in situ* en el cerebro a partir del colesterol por acción del enzima cit. P450<sub>sc</sub>. Esta reacción es característica de las células esteroideogénicas de las glándulas endocrinas, por lo que el cerebro se convertiría así en una glándula esteroideogénica.

El termino neuroesteroides se aplica a estos esteroides que se sintetizan en el SNC a partir del colesterol u otros precursores esteroideos, y se acumulan en el SNC con niveles que al menos en parte son independientes de la secreción por las glándulas esteroideogénicas (Baulieu, 1998).

En el cerebro, algunos neuroesteroides actúan directamente sobre receptores de membrana para neurotransmisores, por ejemplo receptores de acetilcolina y sobre todo de ácido gamma-aminobutírico (GABA) estando implicados por ello en el mecanismo de neurotransmisión.

El receptor tipo A del ácido gamma amino butírico ( $GABA_A$ -R) es un complejo receptor ligado al canal de  $Cl^-$ , responsable de la inhibición presináptica, que actúa como un importante nexo entre el sistema endocrino y el

sistema nervioso, de manera que tanto su identidad molecular como su función de receptor están regulados por los esteroides. El  $GABA_A$ -R permite el flujo selectivo de iones de  $Cl^-$ , regulando así la excitabilidad neuronal. Estos receptores son proteínas transmembrana pentaméricas que están compuestas por varias subunidades codificadas, a su vez, por varias familias de genes. Esta compleja diversidad molecular hace que este receptor permita la plasticidad necesaria a este importante sistema de neurotransmisión inhibitoria basada en las siguientes características: 1) Diferentes formas isomórficas expresadas en diferentes partes del SNC. 2) Regulación dinámica de la expresión de las subunidades por acción de esteroides. 3) Propiedades biofísicas del receptor y, 4) Sensibilidad farmacológica a un número de moduladores alostéricos entre los que se incluyen: zinc, etanol, benzodiazepinas (BZD), barbitúricos y neuroesteroides (Majewska, 1992).

La diferenciación sexual del sistema nervioso y de las conductas reproductoras se ha sustentado, clásicamente, en dos proposiciones:

1) El concepto de "organización", basado en la hipótesis de que las hormonas gonadales diferencian o producen cambios a largo plazo en el tejido neural y en las conductas reproductoras durante períodos tempranos del desarrollo, mientras que estas mismas hormonas tienen una función "activadora" en esos mismos sistemas durante el período adulto (Phoenix y col., 1959).

2) La "hipótesis de cascada" que sugiere que la testosterona y el estradiol regulan una serie de eventos encadenados, cuya consecuencia es el dimorfismo en el sistema nervioso, reflejado en el número de sinápsis y neuronas,

crecimiento de las neuritas y, finalmente, en el volumen de estructuras específicas o de núcleos neuronales (Toran-Allerand, 1984).

Ambas propuestas implican mecanismos básicos comunes por los que la respuesta hormonal se relaciona con la existencia de receptores que, a su vez median las acciones de las hormonas esteroideas a nivel de la expresión génica (McEwen, 1991).

Los estudios morfológicos sobre la diferenciación sexual del SNC han establecido la primera vía multisináptica sexodimórfica en mamíferos (Segovia y Guillamón, 1993). Este circuito se adapta, en general, a las dos proposiciones que sobre diferenciación sexual del SNC ejercen los esteroides sexuales. Sin embargo, las acciones genómicas de los esteroides gonadales no explican todas las diferencias sexuales neurales. En efecto se ha descrito que tanto neuronas monoaminérgicas como neuronas GABAérgicas hipotalámicas (Lieb y col., 1994), en cultivo, pueden mostrar diferenciación sexual en ausencia de esteroides gonadales exógenos. Además, se ha puesto de manifiesto la importante función de los sistemas de neurotransmisión en el proceso de diferenciación sexual durante los períodos críticos del desarrollo (Döner, 1976; Döhler y col., 1991).

Esto indica que otros mecanismos no-genómicos y, por ello, rápidos y sin mediación de receptores intranucleares, pueden estar modificando la actividad neuronal, alterando la supervivencia o la muerte celular natural (apoptosis), ajustándose así a la base (mantenimiento de la sinapsis) de la hipótesis de "cascada" (Torand -Allerand, 1984). En ésta, se explica la diferenciación sexual del sistema nervioso por la acción de los esteroides gonadales, Testosterona y

Estradiol, que promoviendo el crecimiento de neuritas (proceso de maduración neuronal - última fase de la diferenciación), llevaría, a través del crecimiento axonal y dendrítico, a la supervivencia neuronal, mantenimiento de sinápsis y, consecuentemente, establecimiento del número de neuronas y volumen de la estructura.

Miembros de nuestro grupo de investigación, basándose en estos planteamientos decidieron, junto al estudio de las hormonas gonadales, introducir el estudio del complejo receptor  $GABA_A-Cl^-$  en la diferenciación del SNC y de la conducta parental (Segovia y col., 1996, 1999), demostrándose que con la administración durante el periodo neonatal de moduladores alostéricos del  $GABA_A-R$ , como el diazepam (DZ) y la picrotoxina (PTX), se podía invertir la conducta parental del macho y la hembra al llegar a adultos.

Los neurosteroides pueden participar en la diferenciación sexual del SNC ya que potencian la actividad de GABA modulando alostéricamente el receptor de  $GABA_A$  y potenciando el binding de BDZ<sub>s</sub>. (Majewska y col, 1986 ; Majewska, 1992).

Los neuroesteroides más importantes son los metabolitos  $3\alpha,5\alpha$ -reducidos de la progesterona (PROG) y la corticoesterona. Hace algunos años se puso de manifiesto la modulación del receptor  $GABA_A$  en el cerebro por los metabolitos  $5\alpha$ -reducidos de ciertos esteroides (Gee y col., 1988; Majewska, 1992; Paul y col., 1992). Desde entonces, han sido numerosas las evidencias acumuladas que demuestran que los metabolitos reducidos, especialmente aquellos producidos a partir de PROG, pueden tener importantes funciones en el cerebro adulto. La

5 $\alpha$ -reducción de PROG a dihidroprogesterona (DHP) es de particular importancia ya que DHP puede reducirse a alopregnenolona, un potente modulador del GABA<sub>A</sub>-R (Lambert y col., 1995; McEwen, 1991; Paul, 1992). Por este motivo es de sumo interés el estudio de la 5 $\alpha$ -R en cerebro.

En cerebro de rata se ha demostrado la actividad 5 $\alpha$ -Reductasa (Normington y col., 1992). La 5 $\alpha$ -reducción en el SNC parece ser mayor en los centros cerebrales inferiores y en la hipófisis anterior, sin embargo en otras regiones como el hipotálamo y la corteza se ha demostrado también la actividad enzimática 5 $\alpha$ -Reductasa (Denef y col., 1973; Krieger y col., 1983; Massa y col., 1975).

Son pocos los datos que existen hasta la fecha acerca de los niveles de mRNA de los isoenzimas de la 5 $\alpha$ -R en cerebro. Lauber y col., (1996) encontraron niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 en zonas germinales del cerebro de rata mediante técnicas de hibridación *in situ*. Sin embargo nada se conoce acerca de la expresión de 5 $\alpha$ -R2 en cerebro, bien porque no se exprese en este tejido o bien porque las técnicas utilizadas no sean lo suficientemente sensibles para determinar bajos niveles de expresión.

Por este motivo es muy importante disponer de una metodología fiable y precisa que nos permita conocer: 1) Si en cerebro de rata se expresa el isoenzima tipo 1, el isoenzima tipo 2 o ambas. 2) Si en condiciones basales ambos isoenzimas se expresan en el mismo orden de magnitud. 3) Si en cerebro, al igual que en otros tejidos, ambos isoenzimas está bajo el control de T y DHT, en particular 5 $\alpha$ -R2.



Antes de abordar el estudio de los isoenzimas de la  $5\alpha$ -R en regiones sexodimórficas hemos preferido centrarnos en una región en la que al menos se conoce la presencia de uno de los dos isoenzimas. Es por ello por lo que en este trabajo experimental nos planteamos cuantificar los niveles de mRNA de uno o ambos isoenzimas de  $5\alpha$ -R en corteza prefrontal de cerebro de rata.

Para cuantificar los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R en cerebro de rata hemos utilizado la variante "one step" RT-PCR competitiva. Esta variante, como ya se mencionó en la sección *Material y Métodos*, presenta la ventaja de su gran eficiencia de retrotranscripción, en torno al 95%, lo que va a permitir una gran sensibilidad en la detección de los niveles de mRNA. Esto es especialmente importante si tenemos en cuenta que queremos cuantificar especies de mRNA con un bajo nivel de expresión como puede ser  $5\alpha$ -R2 en regiones concretas del cerebro.

Con esta tecnología hemos sido capaces de detectar y cuantificar los niveles de mRNA de ambos isoenzimas de  $5\alpha$ -R en corteza prefrontal de cerebro de rata. Los resultados de nuestros experimentos se muestran en la figura 86.

Esta nueva tecnología nos ha permitido demostrar que en corteza prefrontal de cerebro de rata se expresan ambos isoenzimas de la  $5\alpha$ -R aunque mayoritariamente el isoenzima tipo 1 de la  $5\alpha$ -R.

Gracias a la sensibilidad de esta técnica hemos sido capaces de detectar los bajos niveles de expresión de  $5\alpha$ -R2 en corteza prefrontal de cerebro de

rata y además, poner de manifiesto la regulación positiva ejercida por T y DHT sobre la expresión de  $5\alpha$ -R2. Esta regulación es la misma que encontramos en próstata, una regulación característica de un gen muy regulado por andrógenos.

Sorprendentemente, los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 en corteza se incrementaron drásticamente tras la castración. La regulación que ejercen T y DHT sobre los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 en corteza prefrontal es muy diferente a la que se presenta en próstata e hígado, lo cual podría indicar que alguna/s molécula/s del testículo, entra ellas la T, están ejerciendo un efecto represor sobre el mRNA de  $5\alpha$ -R1 en cerebro.

El cerebro de los animales castrados adquiere un comportamiento femenino en el que la vía de la  $5\alpha$ -reducción se incrementa enormemente para la síntesis de neuroesteroides. Con la administración de T y DHT tienden a restaurarse los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 observados en los animales intactos.

En cerebro, los andrógenos T y DHT en el macho intacto no incrementaron los niveles de expresión de  $5\alpha$ -R1. A nuestro juicio, este hallazgo es muy importante porque podría indicar que el macho presenta niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 menores que la hembra. Probablemente, este sea el motivo por el que las hembras presentan niveles de neuroesteroides  $3\alpha5\alpha$ -reducidos más altos que los machos (figs. 87 y 88), modulando de esta forma el receptor  $GABA_A$  según un patrón femenino (Torres y col., 2001).

El papel de los estrógenos en el desarrollo del SNC de la rata se conoce desde hace tiempo (Lauber y col., 1996). En el macho, los estrógenos

localmente producidos por la aromatización de la T testicular controlan un gran número de funciones y comportamientos típicamente masculinos en el SNC (MacLusky y col., 1981). Es por ello que en el macho la T debe aromatizarse a estradiol para ejercer efectos masculinos, mientras que en la hembra la T no puede aromatizarse a estradiol ya que masculinizaría el cerebro, sino que seguiría la vía de la  $5\alpha$ -reducción. Esto daría sentido fisiológico a los elevados niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 encontrados en cerebro de animales castrados.

***VI. CONCLUSIONES***

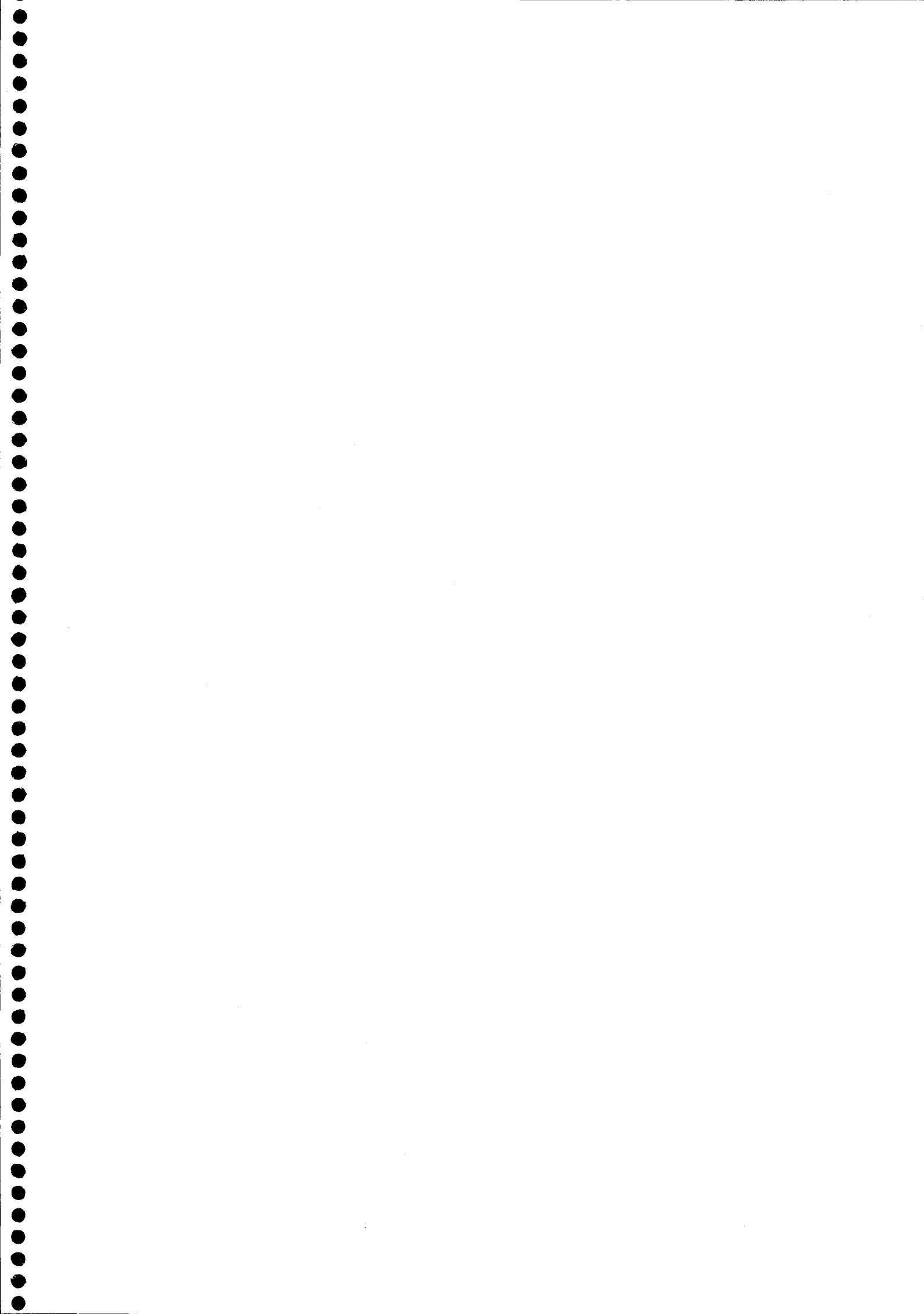


- 1) La técnica de RT-PCR semicuantitativa acoplada a EC en la que cada cebador *sentido* está marcado con un fluoróforo diferente, no sirve para estudiar cambios en los niveles de mRNA de los isoenzimas de la  $5\alpha$ -R, debido a la distinta intensidad de fluorescencia que emite cada fluoróforo al excitarse.
- 2) En las técnicas de RT-PCR semicuantitativa, el tratamiento con los andrógenos T y DHT afecta a la regulación del gen de la GAPDH, por lo que al referir la expresión de los mRNAs de  $5\alpha$ -R1 y  $5\alpha$ -R2 a la expresión de este gen constitutivo, estamos cometiendo un error en la determinación de los niveles de mRNA.
- 3) La técnica de RT-PCR competitiva acoplada a EC diseñada en este trabajo permite cuantificar de forma rápida, fiable y precisa los niveles de mRNA de los isoenzimas tipo1 y tipo 2 de la  $5\alpha$ -R.
- 4) Los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 en hígado de rata están regulados de forma positiva por los andrógenos T y DHT.
- 5) Los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 y  $5\alpha$ -R 2 en próstata de rata están regulados de forma positiva por los andrógenos T y DHT, siendo este efecto mucho mayor para  $5\alpha$ -R2.
- 6) Con la metodología diseñada en este trabajo se han podido cuantificar los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1 y  $5\alpha$ -R2 en corteza prefrontal de cerebro de rata.

- 7) Los andrógenos T y DHT regulan de forma diferente la expresión de  $5\alpha$ -R1 y  $5\alpha$ -R2 en corteza prefrontal de cerebro de rata.
  
- 8) En corteza prefrontal de cerebro de rata, la orquidectomía aumenta drásticamente los niveles de mRNA de  $5\alpha$ -R1.
  
- 9) Los niveles de neuroesteroides  $3\alpha,5\alpha$ -reducidos encontrados en cerebro podrían dar una explicación fisiológica a la regulación de  $5\alpha$ -R1 en corteza prefrontal.

*VII. BIBLIOGRAFÍA*





Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, Russell DW. 1991. Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* 354:159-61

Andersson S, Bishop RW, Russell DW. 1989. Expression cloning and regulation of steroid 5 alpha-reductase, an enzyme essential for male sexual differentiation. *J. Biol. Chem.* 264:16249-55

Andersson S, Russell DW. 1990. Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 alpha-reductases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3640-44

Avila DM, Fuqua SA, George FW, McPhaul MJ. 1998. Identification of genes expressed in the rat prostate that are modulated differently by castration and finasteride treatment. *J. Endocrinol.* 159:403-411.

Baulieu EE. 1998. Neurosteroids a novel function on the brain. *Psychoneuroendocrinology* 23:963-987.

Bayne CW, Donnelly F, Ross M, Habib FK. 1999. Serenoa repens (Permixon) a 5-alpha-reductase types I and type II inhibitor new wvidence in a coculture model of BPH. *Prostate.* 40:232-241.

Bayne CW, Ross M, Donnelly F, Habib FK. 2000. The selectivity and specificity of the actions of the lipo-sterolic extract of serenoa repens (Permixon) on the prostate. *J. Urol.* 164:876-871.

Bell LR, Horabin JI, Schedl P, Cline TW. 1991. Positive autoregulation of sex-lethal by alternative splicing maintains the female determined state in *Drosophila*. *Cell* 65:229-39

Berman DM, Russell DW. 1993. Cell-type-specific expression of rat steroid 5 alpha-reductase isozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:9359-63

Berthaut I, Mestayer C, Portois MC, Cussenot O, Mowszowicz I. 1997. Pharmacological and molecular evidence for the expression of the two steroid 5 alpha-reductase isozymes in normal and hyperplastic human prostatic cells in culture. *Prostate* 32:155-163.

Bjorkhem I, Buchmann M, Bystrom S. 1992. Mechanism and stereochemistry in the sequential enzymatic saturation of the two double bonds in cholesta-4,6-dien-3-one. *J. Biol. Chem.* 267:19872-75

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.* 319:489-98.

Bondy PK. 1981. In *Williams Textbook of Endocrinology*, ed. JD Wilson, DW Foster, pp. 816-890. Philadelphia: Saunders.

Borson ND, Strausbauch MA, Wettstein PJ, Oda RP, Johnston SL, Landers JP. 1998. Direct quantitation of RNA transcripts by competitive single-tube RT-PCR and capillary electrophoresis. *Biotechniques* 25:130-137.

Bouaboula M, Legoux P, Pessegue B, Delpéch B, Dumont X, Piechaczyk M, Casellas P, Shire D. 1992. Standardization of mRNA titration using a polymerase chain reaction method involving co-amplification with a multispecific internal control. *J. Biol. Chem.* 267:21830-8.

Boyle P, Robertson C, Lowe F, Roehrborn C. 2000. Meta-analysis of clinical trials of Permixon in the treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia. *Urology.* 55:533-539.

Brandt M, Levy MA. 1989. 3 Beta-hydroxy-delta 5-steroid dehydrogenase/3-keto-delta 5-steroid isomerase from bovine adrenals: mechanism of inhibition by 3-oxo-4-aza steroids and kinetic mechanism of the dehydrogenase *Biochemistry* 28:140-48

Brawley OW, Barnes S, Parnes H. 2001. The future of prostate cancer prevention. *Ann. NY Acad. Sci.* 952:145-152.

Brooks JR, Baptista EM, Berman C., Ham EA, Hichens M, et al. 1981. Response of rat ventral prostate to a new and novel 5 alpha-reductase inhibitor. *Endocrinology* 109:830-36

Bullock P, Gemzik B, Johnson D, Thomas P, Parkinson A. 1991. Evidence from dwarf rats that growth hormone may not regulate the sexual differentiation of liver cytochrome P450 enzymes and steroid 5 alpha-reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5227-31

Celi FS, Zenilman ME, Shuldiner AR. 1993. A rapid and versatile method to synthesize internal standards for competitive PCR. *Nucleic Acids Res.* 21:1047.

Chelly J, Montarras D, Pinset C, Berwald-Netter Y, Kaplan JC, Kahn A. 1990. Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction. Application to dystrophin mRNA in cultured myogenic and brain cells. *Eur. J. Biochem.* 187:691-8.

Chen B, Przybyla AE. 1994. An efficient site-directed mutagenesis method based on PCR. *Biotechniques.* 17:657-9.

Chomczynski P. and Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.

Cooke GM, Robaire B. 1985. Modulation of epididymal delta 4-steroid 5 alpha-reductase activity in vitro by the phospholipid environment. *J. Biol. Chem.* 260:7489-95

Corpechot C, Young J, Calvel C. et al. 1993. Neurosteroids: 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one and its precursors in the brain, plasma and steroidogenic glands of male and female rats. *Endocrinology.* 133:1003-1009.

Cross FR, Tinkelenberg AH. 1991. A potential positive feedback loop controlling CLN1 and CLN2 gene expression at the start of the yeast cell cycle. *Cell* 65:875-83

Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, et al. 1987. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrine Rev.* 8:338-62

Davis DL, Russell DW. 1993. Unusual length polymorphism in human steroid 5 alpha-reductase type 2 gene (SRD5A2). *Human Mol. Genet.* 2:820

Denef C, Magnus C, McEwen BS. 1973. Sex differences and hormonal control of testosterone metabolism in rat pituitary and brain. *J. Endocrinol.* 59:605-21.

Di Silverio F, Monti S, Sciarra A, Varasano PA, Martini C, Lanzara S, D'Eramo G, Di Nicola S, Toscano V. 1998. Effects of long term treatment with serenoa repens (Permixon) on the concentration and regional distribution of androgens and epidermal growth factor in BPH. *Prostate.* 37:77-83.

Döhler KD. 1991. The pre and postnatal influence of hormones and neurotransmitters on sexual differentiation of the mammalian hypothalamus. *Int. Rev. Cytol.* 131:1-57.

Dörner G. 1976. Hormones and brain differentiation. Amsterdam. Elsevier

Dostal DE, Rothblum KN, Baker KM. 1994. An improved method for absolute quantification of mRNA using multiplex polymerase chain reaction: determination of renin and angiotensinogen mRNA levels in various tissues. *Anal. Biochem.* 223:239-50.

Enderle-Schmitt U, Neuhaus C, Aumuller G. 1989. Solubilization of nuclear steroid 5 alpha-reductase from rat ventral prostate. *Biochim. Biophys. Acta* 987:21-28

Faller B, Farley D, Nick H. 1993. Finasteride: a slow-binding 5 alpha-reductase inhibitor. *Biochemistry* 32:5705-10

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

Farkash Y, Soreq H, Orly J. 1988. Biosynthesis of catalytically active rat testosterone 5 alpha-reductase in microinjected *Xenopus* oocytes: evidence for tissue-specific differences in translatable mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5824-28

Fersht A. 1985. *Enzyme Structure and Mechanism*, pp. 155-75. New York: Freeman

Fisher LK, Kogut MD, Moore RJ, Goebelsmann U, Weitman JJ, et al. 1978. Clinical, endocrinological, and enzymatic characterization of two patients with 5 alpha-reductase deficiency: evidence that a single enzyme is responsible for the 5 alpha-reduction of cortisol and testosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 47:653-64

Fletterick RJ, Schroer T, Matela RJ. 1985. *Protein Structure*, pp. 39-63. Palo Alto, CA: Blackwell

Forchielli E, Dorfman RI. 1952. *J. Biol. Chem.* 223:443-48

Frederiksen DW, Wilson JD. 1971. Partial characterization of the nuclear reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: delta 4-3-estosteroid 5 alpha-oxidoreductase of rat prostate. *J. Biol. Chem.* 246:2584-93

Frye SV, Cribbs CM, Haffner CD, Maloney PR, Andrews RC. 1993. *World Patent No. W093/13124*

Futscher BW, Blake LL, Gerlach JH, Grogan TM, Dalton WS. 1993. Quantitative polymerase chain reaction analysis of *mdr1* mRNA in multiple myeloma cell lines and clinical specimens. *Anal Biochem.* 213:414-21.

Gee KW, Bolger MB, Brinton RE, Coirini H, McEwen BS. 1988. Steroid modulation of the chloride ionophore in rat brain: structure-activity requirements, regional dependence and mechanism of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246:803-12.

George FW, Russell DW, Wilson JD. 1991. Feed-forward control of prostate growth: dihydrotestosterone induces expression of its own biosynthetic enzyme, steroid 5 alpha-reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8044-47

Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF. 1990. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:2725-9.



Gloyna RE, Siiteri PK, Wilson JD. 1970. Dihydrotestosterone in prostatic hypertrophy. II. The formation and content of dihydrotestosterone in the hypertrophic canine prostate and the effect of dihydrotestosterone on prostate growth in the dog. *J. Clin Invest.* 246:1746-53

Gloyna RE, Wilson JD. 1969. A comparative study of the conversion of testosterone to 17-beta-hydroxy-5-alpha-androstan-3-one (Dihydrotestosterone) by prostate and epididymis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 29:970-77

Gormley GJ, Stoner E, Bruskewitz RC, Imperato-McGinley J, Walsh PC, et al. 1992. The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. The Finasteride Study Group. *N. Engl. J. Med.* 327: 1187-91

Gorsline J, Latif SA, Morris DJ. 1988. Changes in 5 alpha- and 5 beta-reductase pathways of aldosterone metabolism by dietary sodium. *Am. J. Hypertension* 1:272-75

Griffin JE, McPhaul MJ, Russell DW, Wilson JD. 1994. In *Metabolic Basis Inherited Disease*, ed. CR Scriver, AL

Guiffre A, Atkinson K, Kearney P. 1993. A quantitative polymerase chain reaction assay for interleukin 5 messenger RNA. *Anal. Biochem.* 212:50-7.

Gustafsson JA, Mode A, Norstedt G, Skett P. 1983. Sex steroid induced changes in hepatic enzymes. *Annu. Rev. Physiol.* 45:51-60

Guyon T, Levasseur P, Truffault F, Cottin C, Gaud C, Berrih-Aknin S. 1994. Regulation of acetylcholine receptor alpha subunit variants in human myasthenia gravis. Quantification of steady-state levels of messenger RNA in muscle biopsy using the polymerase chain reaction. *J Clin Invest.* 94:16-24.

Harris GS, Azzolina BA. 1990. *Fed Am. Soc. Exp. Biol. J.* 4:2717 (Abstr.)

Heemskerk J, DiNardo S, Kostriken R, O'Farrell PH. 1991. Multiple modes of engrailed regulation in the progression towards cell fate determination. *Nature* 352: 404-10

Hirsch KS, Jones CD, Audia JE, Andersson S, McQuaid LA, et al. 1993. LY191704: a selective, nonsteroidal inhibitor of human steroid 5 alpha-reductase type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5277-81

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

Hsia SL, Voigt W. 1974. Inhibition of dihydrotestosterone formation: an effective means of blocking androgen action in hamster sebaceous gland. *J. Invest Dermatol.* 62:224-27

Hudson RW. 1981. Studies of the nuclear 5 alpha-reductase of human hyperplastic prostatic tissue. *J. Steroid Biochem.* 14:579-84

Huynh H, Alpert L, Alaoui-Jamali MA, Ng CY, Chan TW. 2001. Co administration of finasteride and the pure antioestrogen ICI 182, 780 act synergistically in modulating the IGF system in rat prostate. *J. Endocrinol.* 17:109-118.

Ichihara K, Tanaka C. 1987. Some properties of progesterone 5 alpha-reductase solubilized from rat liver microsomes. *Biochem. Int.* 15:1005-11

Iehle C, Radvanyi F, Gil Diez de Medina S, Ouafik LH, Gerard H, Chopin D, Raynaud JP, Martin PM. 1999. Differences in steroid 5 $\alpha$ -reductase isoenzymes expression between normal and pathological human prostate tissue. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 68:189-195.

Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, Peterson RE. 1974. Steroid 5alpha-reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science* 186:1213-15

Imperato-McGinley J, Sanchez RS, Spencer JR, Yee B, Vaughan ED. 1992. Comparison of the effects of the 5 alpha-reductase inhibitor finasteride and the antiandrogen flutamide on prostate and genital differentiation: dose-response studies. *Endocrinology* 131:1149-56

Imperato-McGinley J, Gautier T, Zirinsky K, Horn T, Palomo O, et al. 1992. Prostate visualization studies in males homozygous and heterozygous for 5-alpha-reductase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75:1022-26

Ish-Horowicz D, Pinchin SM, Ingham PW, Gyurkovics HG. 1989. Autocatalytic ftz activation and metameric instability induced by ectopic ftz expression. *Cell* 57:223-32

Jaffe JM, Malkowicz SB, Walker AH, MacBride S, Peschel R, Tomaszewski J, Van Arsdalen K, Wein AJ, Rebbeck TR. 2000. Association of SRD5A2 genotype and pathological characterization of prostate tumors. *Cancer Res.* 60:1626-30.

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

Jenkins EP, Hsieh CL, Milatovich A, Normington K, Berman DM, et al. 1991. Characterization and chromosomal mapping of a human steroid 5 alpha-reductase gene and pseudogene and mapping of the mouse homologue. *Genomics* 11:1102-12

Jensen LE, Whitehead AS. 1998. Competitive reverse transcription polymerase chain reaction for quantifying pre-mRNA and mRNA of major acute phase proteins. *J. Immunol. Methods* 215:45-58.

Jones CD, Audia JE, Lawhom DE, McQuaid LA, Neubauer BL, et al. 1993. Nonsteroidal inhibitors of human type I steroid 5-alpha-reductase. *J. Med. Chem.* 36:421-23

Jost A. 1970. Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. *Philos. Trans. R. Soc. London* 259:119-30

Kaplan SA. 2001. 5alpha-Reductase inhibitors, what role should they play? *Urology*. 58:65-70.

Kinoshita T, Imamura J, Nagai H, Shimotohno K. 1992. Quantification of gene expression over a wide range by the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem*. 206:231-5.

Köhler TH, Labner D, Rost AK, Thamm B, Pustowitz B, Remke H. 1995. Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction. Nonradiative PCR methods. Springer-Verlag.

Krieger NR, Scott RG, Jurman ME. 1983. Testosterone 5 alpha-reductase in rat brain. *J. Neurochem*. 40:1460-4.

Labrie F, Sugimoto Y, Luu-The V, Simard J, Lachance Y, et al. 1992. Structure of human type II 5 alpha-reductase gene. *Endocrinology* 131:1571-73

Lambert JJ, Belelli D, Hill-Venning C, Peters JA. 1995. Neurosteroids and GABA-A receptor function. *Trends Pharmacol. Sci*. 16:295-303.

Latil AG, Azzouri R, Cancel GS, Guillaume EC, Cochran-Priollet B, Berthon PL, Cussenot O. 2001. Prostate carcinoma risk and allelic variations of genes involved in androgen biosynthesis and metabolism pathway. *Cancer* 92:1130-1137.

Lauber ME, Lichtensteiger W. 1996. Ontogeny of 5 alpha-reductase (type 1) messenger ribonucleic acid expression in rat brain: early presence in germinal zones. *Endocrinology*. 137:2718-30.

Levy MA, Brandt M, Greway AT. 1990. Mechanistic studies with solubilized rat liver steroid 5 alpha-reductase: elucidation of the kinetic mechanism. *Biochemistry* 29:2808-15

Levy MA, Metcalf BW, Brandt M, Erb JM, Oh HJ, et al. 1991. *Biorg. Chem.* 19:245-60.

Liang T, Heiss CE, Cheung AH, Reynolds GF, Rasmusson GH. 1984. 4-Azasteroidal 5 alpha-reductase inhibitors without affinity for the androgen receptor. *J. Biol. Chem.* 259:734-39

Liang T, Cascieri MA, Cheung AH, Reynolds GF, Rasmusson GH. 1985. Species differences in prostatic steroid 5 alpha-reductases of rat, dog, and human. *Endocrinology* 117:571-79

Liang T, Heiss CE, Ostrove S, Rasmusson GH, Cheung A. 1983. Binding of a 4-methyl-4-aza-steroid to 5 alpha-reductase of rat liver and prostate microsomes. *Endocrinology* 112:1460-68

Liang T, Liao S. 1992. Inhibition of steroid 5 alpha-reductase by specific aliphatic unsaturated fatty acids. *Biochem. J.* 285:557-62

Lyttelton MP, Hart S, Ganeshaguru K, Hoffbrand AV, Mehta AB. 1994. Quantitation of multidrug resistant MDR1 transcript in acute myeloid leukaemia by non-isotopic quantitative cDNA-polymerase chain reaction. *Br. J. Haematol.* 86:540-6.

MacLusky NJ, Naftolin F. 1981. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science.* 211:1294-302.

Mahendroo MS, Cala KM, Hess DV, Russell DW. 2001. Unespected virilization in male mice lacking steroid 5alpha-reductase enzymes. *Endocrinology* 142:4652-4662.

Mainwaring WI. 1969. A soluble androgen receptor in the cytoplasm of rat prostate. *J. Endocrinol.* 45:531-41

Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM. 1986. Steroid hormones metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science.* 232:1004-1007.

Majewska, M.D. 1992. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA-a receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog. Neurobiol.* 38:379-395.

Martini L, Zoppi S, Motta M. 1986. Studies on the possible existence of two 5 alpha-reductases in the rat prostate. *J. Steroid Biochem.* 24:177-82

Massa R, Justo S, Martini L. 1975. Conversion of testosterone into 5alpha-reduced metabolites in the anterior pituitary and in the brain of maturing rats. *J. Steroid Biochem.* 6:567-71.

McDermott M, Latif SA, Morris DJ. 1983. The metabolism of aldosterone in target tissues. *J. Steroid Biochem.* 19:1205-11

McEwen BS, Coirini H, Westlind-Danielsson A, Frankfurt M, Gould E, Schumacher M, Woolley C. 1991. Steroid hormones as mediators of neural plasticity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 39:223-32.

McGuire JS, Hollis VW, Tomkins GM. 1960. *J. Biol. Chem.* 235:3112-16

McGuire JS, Tomkins GM. 1960. *J. Biol. Chem.* 235:1634-38

Meinhardt H. 1982. Models of biological pattern formation. (Academic, New York).

Melcangi RC, Poletti A, Cavarretta I, Celotti F, Colciago A, Magnaghi V, Motta M, Negri-Cesi P, Martini L. 1998. The 5alpha-reductase in the central nervous system: expression and modes of control. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 65:295-9.

Milewich L, Gomez-Sanchez C, Crowley G, Porter JC, Madden JD, MacDonald PC. 1977. Progesterone and 5alpha-pregnane-3,20-dione in peripheral blood of normal young women: Daily measurements throughout the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 45:617-22



Milewich L, Gomez-Sanchez C, Madden JD, MacDonald PC. 1975. Isolation and characterization of 5 $\alpha$ -pregnane-3,20-dione and progesterone in peripheral blood of pregnant women. measurement throughout pregnancy. *Gynecol. Invest.* 6:291-306

Moore RJ, Wilson JD. 1972. Localization of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: 4 $\beta$ -3-ketosteroid 5 $\alpha$ -oxidoreductase in the nuclear membrane of the rat ventral prostate. *J. Biol. Chem.* 247:958-67

Moore RJ, Wilson JD. 1974. Extraction of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate:delta 4 $\beta$ -3-ketosteroid-5 $\alpha$ -oxidoreductase of rat prostate with digitonin and potassium chloride. *Biochemistry* 13:450-56

Moore CR, Price D, Gallagher TF. 1930. *Am. J. Anat.* 45:71-107

Moore RJ, Wilson JD. 1976. Steroid 5 $\alpha$ -reductase in cultured human fibroblasts. Biochemical and genetic evidence for two distinct enzyme activities. *J. Biol. Chem.* 251:5895-900

Moore RJ,, Wilson JD. 1973. The effect of androgenic hormones on the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate:delta-4 $\beta$ -3-ketosteroid 5 $\alpha$ -oxidoreductase of rat ventral prostate. *Endocrinology* 93:581-92

Morris DJ, Brem AS. 1987. Metabolic derivatives of aldosterone. *Am. Physiol. Soc.* 252:365-73

Morris DJ, Souness GW, Saccoccio NA, Harnik M. The effects of infusions of ring-A-reduced derivatives of aldosterone on the antinatriuretic and kaliuretic actions of aldosterone. 1989. *Steroids* 53:21-36

Murata T, Takizawa T, Funaba M, Fujimura H, Murata E, Takahashi M, Torii K. 1997. Quantitative RT-PCR for inhibin/activin subunit: measurements of rat hypothalamic and ovarian inhibin/activin subunit mRNAs during the estrous cycle. *Endocr. J.* 44:35-42.

Murphy LD, Herzog CE, Rudick JB, Fojo AT, Bates SE. 1990. Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of *mdr-1* gene expression. *Biochemistry.* 29:10351-6.

Nagano M, Kelly PA. 1994. Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.* 269:13337-45.

Nakai H, Terashima H, Arai Y. 1988. *Eur. Patent No. 029J245A2*

Nakayama O, Yagai M, Kiyoto S, Okuhara M, Kohsaka M. 1990. *J. Antibiotics* 43:1615-16

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

Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, Chin JE, Wunder JS, Andrulis IL, Gazdar AF, Willman CL, Griffith B, Von Hoff DD, et al. 1990. Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:7160-4.

Normington K, Russell DW. 1992. Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5-alpha-reductase isozymes. Evidence for distinct physiological functions. *J. Biol. Chem.* 267:19548-54

Novelli G, Margiotti K, Sangiulo F, Reichardt JK. 2001. Pharmacogenetic of human androgens and prostate disease. *Pharmacogenomics.* 2:65-72.

Nowakowski H, Lenz W. 1961. *Rec. Prog. Hormone Res.* 17:53-95

Orly J, Rei Z, Greenberg NM, Richards JS. 1994. Tyrosine kinase inhibitor AG18 arrests follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation: use of reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for multiple messenger ribonucleic acids. *Endocrinology.* 134:2336-2346.

Pannetier C, Delassus S, Darche S, Saucier C, Kourilsky P. 1993. Quantitative titration of nucleic acids by enzymatic amplification reactions run to saturation. *Nucleic Acids Res.* 21:577-83.

Paul, S.M. and Purdy, R.H. 1992. Neuractive steroids. *FASEB J.* 6:2311-2322.

Perham RN, Scmtton NS, Berry A 1991. New enzymes for old: redesigning the coenzyme and substrate specificities of glutathione reductase. *BioEssays* 13:515-25

Phoenix C, Goy RW, Gerall AA et al. 1959. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology*. 65:369-382.

Ptashne M. 1986. *A Genetic Switch:Gene Control and Phage I*. Cambridge, MA: Blackwell. 128 pp.

Purdy RH, Moore PH, Rao PN. et al. 1990. Radioimmunoassay of 3 hidroxy-5alfa- pregnan-20 -one in rat and human plasma. *Steroids*. 55:290-296.

Putnam-Roberts C, Brann DW, Mahesh VB. 1992. Role of 5 alpha-reduction in progesterone's ability to release FSH in estrogen-primed ovariectomized rats. *J. Steroid Biochem*. 42:875-82

Raeymaekers L. 1993. Quantitative PCR: theoretical considerations with practical implications. *Anal. Biochem*. 214:582-5.

Raff MC. 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356:397-400.

Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. 1988. Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science*. 241:708-712.

Rasmusson GH, Reynolds GF, Steinberg NG, Walton E, Patel GF, et al. 1986. Azasteroids: structure-activity relationships for inhibition of 5 alpha-reductase and of androgen receptor binding. *J. Med. Chem.* 29:2298-15

Rasmusson GH, Reynolds GF, Utne T, Jobson RB, Primka RL, et al. 1984. Azasteroids as inhibitors of rat prostatic 5 alpha-reductase. *J. Med. Chem.* 27:1690-701

Richards MP, Ashwell CM, McMurtry JP. 2000. Quantitative analysis of leptin mRNA using competitive reverse transcription polymerase chain reaction and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* 21:4 792-4798.

Rivier C, Vale W. 1985. Effect of the long-term administration of corticotropin-releasing factor on the pituitary-adrenal and pituitary-gonadal axis in the male rats. *J. Clin. Invest.* 75:689-694.

Sargent NS, Habib FK. 1991. Partial purification of human prostatic 5 alpha-reductase (3-oxo-5 alpha-steroid:NADP+ 4-ene-oxido-reductase; EC 1.3.1.22) in a stable and active form *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 38:73-77

Saunders FJ. 1963. In *Biology of the Prostate and Related Tissue*, ed. EP Vollmer, pp. 139-59. Washington, DC: US Gov. Print. Off.

Schneider JJ, Horstmann PM. 1951. *J. Biol. Chem.* 191:327-38

Schneider JJ. 1952. *J. Biol. Chem.* 199:235-44

Segovia S, del Cerro MC, Ortega E, Perez-Laso C, Rodriguez-Zafra C, Izquierdo MA, Guillamon A. 1996. Role of GABAA receptors in the organization of brain and behavioural sex differences. *Neuroreport.* 7:2553-7.

Segovia S, Guillamon A, del Cerro MC, Ortega E, Perez-Laso C, Rodriguez-Zafra M, Beyer C. 1999. The development of brain sex differences: a multisignaling process. *Behav. Brain Res.* 105:69-80.

Segovia S., Guillamón A. 1993. Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Res. Rev.* 18:51-74.

Shibata A, Stamey TA, McNeal JE, Cheng I, Peehl DM. 2001. Genetic polymorphism in the androgen receptor and type II 5 alpha-reductase genes in prostate enlargement. *J. Urol.* 166:1560-1564.

Siiteri P, Wilson JD. 1979. *J. Clin. Invest.* 49:1737-45

Siiteri PK, Wilson JD. 1974. Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38:113-25

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, et al. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240-44

Singer-Sam J, Robinson MO, Bellve AR, Simon MI, Riggs AD. 1990. Measurement by quantitative PCR of changes in HPRT, PGK-1, PGK-2, APRT, MTase, and Zfy gene transcripts during mouse spermatogenesis. *Nucleic Acids Res.* 18:1255-1259.

Stamey TA, McNeal JE. 1992. In *Campbell's Urology*, ed. PC Walsh, AB Retik, TA Stamey, ED Vaughan Jr. pp. 1159-221. Philadelphia: Saunders

Steers WD. 2001. 5alpha reductase activity in the prostate. *Urology.* 58:17-24.

Thigpen AE, Cala KM, Russell DW. 1993. Characterization of Chinese hamster ovary cell lines expressing human steroid 5 alpha-reductase isozymes. *J. Biol. Chem.* 268:17404-12

Thigpen AE, Davis DL, Gautier T, Imperato-MeGinley J, Russell DW. 1992. Brief report: the molecular basis of steroid 5 alpha-reductase deficiency in a large Dominican kindred. *N. Engl. J. Med.* 327:1216-19

Thigpen AE, Davis DL, Milatovich A, Mendonca BB, Imperato-MeGinley J, et al. 1992. Molecular genetics of steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *J. Clin. Invest.* 90:799-809

Thigpen AE, Russell DW. 1992. Four-amino acid segment in steroid 5 alpha-reductase 1 confers sensitivity to finasteride, a competitive inhibitor. *J. Biol. Chem.* 267:8577-83

Thigpen AE, Silver RI, Guileyardo JM, Casey ML, McConnell JD, Russell DW. 1993. Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 alpha-reductase isozyme expression. *J. Clin. Invest.* 92:903-10

Tomkins GM. 1957. *J. Biol. Chem.* 225:13-24

Toran-Allerand CD. 1984. En: De Vries, J. et al. (Eds.), *Sex differences in the Brain*, Progress in Brain Research, pp63-98. Elsevier, Amsterdam

Torres JM, Ruiz E, Ortega E. 2001. Effects of CRH and ACTH administration on plasma and brain neurosteroid levels. *Neurochem. Res.* 26:555-8.

Torres JM., Gomez-Capilla JA. and Ortega E. Semiquantitative RT-PCR assay for mRNA levels of steroid 5-alpha-Reductase isozymes. *Anal. Biochem.* 2002 (aceptado para publicación).

Tsai SF, Strauss E, Orkin SH. 1991. Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter. *Genes Dev.* 5:919-31

Verhagen AP, Aalders TW, Ramaekers FC, Debruyne FM, Schalken JA. 1988. Differential expression of keratins in the basal and luminal compartments of rat prostatic epithelium during degeneration and regeneration. *Prostate* 13:25-38



Viger RS, Robaire B. 1991. Differential regulation of steady state 4-ene steroid 5 alpha-reductase messenger ribonucleic acid levels along the rat epididymis. *Endocrinology* 128:2407-14

Viger RS, Robaire B. 1992. Expression of 4-ene steroid 5 alpha-reductase messenger ribonucleic acid in the rat epididymis during postnatal development. *Endocrinology* 131:1534-40

Voigt W, Fernández EP, Hsia SL. 1970. Transformation of testosterone into 17 beta-hydroxy-5 alpha-androstan-3-one by microsomal preparations of human skin. *J. Biol. Chem.* 245:5594-99

Voigt W, Hsia SL. 1973. The antiandrogenic action of 4-androsten-3-one-17 beta-carboxylic acid and its methyl ester on hamster flank organ. *Endocrinology* 92:1216-22.

Wadhvani KC, Fukuyama R, Giordano T, Rapoport SI, Chandrasekaran K. 1993. Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction of glucose transporter 1 mRNA levels in rat brain microvessels. *Anal. Biochem.* 215:134-41.

Walsh PC, Madden JD, Halrod MJ, Goldstein JL, MacDonald PC, Wilson JD. 1974. Familial incomplete male pseudohermaphroditism, type 2. Decreased dihydrotestosterone formation in pseudovaginal perineoscrotal hypospadias. *N. Engl. J. Med.* 291:944-49

Walsh PC. 1992. In *Campbell's Urology*, ed. PC Walsh, AB Retik, TA Stamey, ED Vaughan Jr. pp. 1007-27. Philadelphia: Saunders

Wang AM, Doyle MV, Mark DF. 1989. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:9717-21.

Weinstein BI, Kandalaft N, Ritch R, Gordon GG, Southren AL. 1991. 5 alpha-dihydrocortisol in human aqueous humor and metabolism of cortisol by human lenses in vitro. *Invest. Ophthalm. Visual Sci.* 32:2130-35

Wilson JD, Griffin JE, Russell DW. 1993. Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *Endocrine Rev.* 14:577-93

Wilson JD, Lasnitzki I. 1971. Dihydrotestosterone formation in fetal tissues of the rabbit and rat. *Endocrinology* 89:659-68

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.* 250:3498-504

Wilson JD. 1972. Recent studies on the mechanism of action of testosterone. *N. Engl. J. Med.* 287:1284-91

Wilson JD. 1975. *Handb. Physiol.* 5:491-508

Wong H, Anderson WD, Cheng T, Riabowol KT. 1994. Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: the "primer-dropping" method. *Anal. Biochem.* 223:251-8.

Yates FE, Herbst AL, Urquhart J. 1958. *Endocrinology* 63:887-902

Zhou J, Hoffman EP. 1994. Pathophysiology of sodium channelopathies. Studies of sodium channel expression by quantitative multiplex fluorescence polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.* 269:18563-71.