

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**



**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA  
CAMPUS UNAM-UAQ, JURQUILLA QUERÉTARO**

**“ACTIVIDAD DESYODATIVA EN EL EPIDÍMIMO DE RATA.  
CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN HORMONAL”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS  
(NEUROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:**

***LMA. NURI ARANDA LÓPEZ***

**DIRECTOR DE TESIS:**

***DRA. R. BRENDA ANGUIANO SERRANO***

**QUERÉTARO**

**2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Metabolismo Energético del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría de la Dra. R. Brenda Anguiano Serrano. Se recibió el apoyo de los siguientes proyectos: CONACYT 44976-M y PAPIIT (DGAPA-UNAM) IN224602. Beca por parte del CONACYT. No.181306 y beca complementaria otorgada por la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (No. de cuenta 504005923).**

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Brenda Anguiano y a la Dra. Carmen Aceves por aceptarme como parte de su laboratorio y por darme su apoyo incondicional durante el desarrollo de este trabajo.

A Guadalupe Delgado y Felipe Ortiz Cornejo por su apoyo técnico y amistad. A Lic. Ma. del Pilar Galarza (Biblioteca INB-UNAM), a Quím. Leonor Casanova Rico y Yolanda Orduña (unidad de enseñanza INB). Al MVZ. Martín García Servín (Bioterio INB) y a los Ing. Alberto Lara y Omar González (Unidad de cómputo INB).

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Maricela Luna Muñoz y Dr. Rogelio Arellano Ostoa por sus valiosos comentarios cada semestre.

Por sus valiosos comentarios y ayuda para mejorar este trabajo, a los miembros del jurado, Dra. Brenda Anguiano, Dra. Maricela Luna, Dra. Aurea Orozco, Dr. Enrique Pedernera y Dr. Gonzalo Martínez.

A todos mis compañeros del laboratorio, Omar, Pablo, Yunuén, Ofelia, Ale, Elvira y Laura. Gracias por su comprensión, apoyo y amistad.

A mi mamá, por permanecer a mi lado siempre.

A mi familia, mis padres y hermanos, por ser una constante en mi vida.

A todas aquellas personas que de alguna manera me ayudaron a salir adelante en los momentos duros de estos dos años.

## DEDICATORIA

**Este trabajo lo dedico y regalo a los hombres de mi vida: a mi padre, Jorge, por darme la vida y enseñarme a vivirla. A mi esposo, Salvador, por darme el regalo más hermoso del mundo y por ayudarme a mantenerme en pie. A mi hijo, Sebitas, por ser la luz que me guía en este mundo loco.**

Indice

Abreviaturas

Resumen

Introduccion

Antecedentes

- Glandula tiroides

  - Biosintesis de hormonas tiroideas

  - Transporte

  - Regulacion de la secrecion

  - Efectos biologicos

  - Mecanismos de accion

- Conversion periferica de T4 a T3

  - Desyodasa tipo I (D1)

  - Desyodasa tipo II (D2)

- Epididimo

  - Origen evolutivo y embrionario

  - Composicion celular

  - Aspectos anatomicos y funcionales

  - Funciones

  - Control de la funcion

Planteamiento del problema

Hipotesis

Objetivos

- General

- Especificos

Estrategia experimental

- Material biologico

- Diseño experimental

- Procedimientos quirurgicos

- Procesamiento de los tejidos

- Metodos analíticos

- Analisis estadistico

Resultados

- Estandarizacion y caracterizacion cinetica

- Ontogenia de la actividad D1

- Distribucion regional de la actividad D1

- Influencia de las hormonas sexuales en la regulacion de la actividad D1

  - Dihidrotestosterona (DHT)

## Testosterona (T) y 17-B-estradiol (E2)

### Discusion

- Caracterizacion del subtipo enzimatico

- Modulacion por hormonas sexuales

- Posibles implicaciones funcionales de la producción de T3

### Conclusiones

### Bibliografia

### Anexo

- Metodo de Bradford

- Tecnica de liberacion de radioyodo

## RESUMEN

El epidídimo expresa receptores a la hormona tiroidea activa (T3), una de cuyas funciones es mantener la integridad del epitelio y modular su metabolismo. En este tejido se ha reportado producción local de T3 a partir de la desyodación de la prohormona tiroxina (T4), pero los mecanismos enzimáticos se desconocen. El propósito de esta tesis fue identificar el tipo de actividad desyodativa presente en el epidídimo y caracterizar su distribución a lo largo de la ontogenia. Además, se analizó si la actividad desyodativa se expresa de manera segmento-específica en la cabeza, cuerpo y/o cola del epidídimo, y si es modulada por dihidrotestosterona (DHT), testosterona (T), y/o 17 $\beta$ -estradiol (E2). La caracterización enzimática se realizó en extractos de epidídimo, obtenidos de ratas adultas (300 g). La actividad desyodativa se cuantificó con la técnica de liberación de radio-yodo. La ontogenia se analizó en ratas neonatas (1-2 semanas), prepúberes (4-5 semanas), púberes (7-8 semanas), adultas (3 y 8 meses) y seniles (2 años). Los efectos de la DHT se analizaron en animales adultos tratados con el inhibidor de la producción de DHT finasteride y los de T y E2 en animales castrados con reemplazo hormonal. La presencia de la desyodasa tipo I (D1) en el epidídimo de rata fue indicada por la afinidad 8 veces mayor por rT3 que por T4, la marcada inhibición con propiltiouracilo o PTU (0.25 mM), los bajos requerimientos de cofactor (DTT, 2 mM), el patrón cinético tipo ping-pong (líneas paralelas) y los parámetros cinéticos (Km, 0.1 $\mu$ M y Vmax, 45 pmol l/mg/h) indican. Con excepción de los animales seniles, la actividad D1 estuvo presente en prácticamente todas las etapas del desarrollo, sugiriendo un posible papel de la T3 en los procesos de diferenciación y funcionalidad. En los animales adultos la mayor actividad D1 se encontró en la región de la cabeza-cuerpo, sugiriendo un posible papel modulador de la T3 en la maduración de los espermatozoides. La DHT y la T no tuvieron efecto alguno sobre la actividad D1. En contraste, el E2 moduló positivamente la actividad D1. Nuestros datos descartan la presencia de actividad D1 en los espermatozoides.



## INTRODUCCIÓN

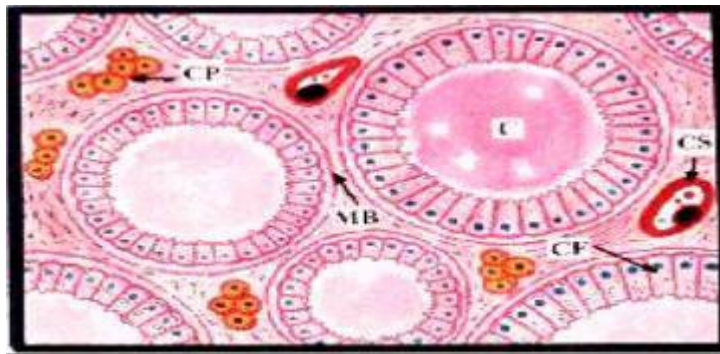
Las hormonas tiroideas (HT) participan en prácticamente todas las funciones metabólicas del organismo, así como en el crecimiento y desarrollo de distintos órganos y tejidos (Chopra, 1996). La mayor parte de los efectos de las HT están mediados por la interacción de la triyodotironina ó T3 con sus receptores nucleares (Köhrle, 2000). Por esta razón, a la T3 se la considera como la hormona tiroidea biológicamente activa. Actualmente es ampliamente conocido que la producción local de T3 ocurre de manera órgano-específica, a partir de la desyodación de la prohormona tiroxina (T4). La desyodación de T4 a T3 es un mecanismo enzimático catalizado por dos subtipos de enzimas, la desyodasa tipo I (D1) y la desyodasa tipo II (D2). Esta clasificación se ha hecho con base en la afinidad por el sustrato, la susceptibilidad a inhibidores específicos (propiltiouracilo o PTU), el tipo de cinética enzimática y los parámetros cinéticos. Estudios realizados en nuestro laboratorio han mostrado que el epidídimo es una de las estructuras del aparato reproductor masculino con mayor actividad desyodativa. Esto significa que es un tejido capaz de generar T3 de manera abundante. Por lo tanto, esta tesis se diseñó con los siguientes propósitos: 1) caracterizar por métodos bioquímicos el tipo (s) de actividad desyodativa presente en el epidídimo de la rata, 2) comparar la actividad desyodativa del epidídimo durante la ontogenia, 3) caracterizar su distribución en los diferentes segmentos del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola) y 4) analizar su posible modulación por esteroides sexuales. La importancia de este trabajo radica en que en el epidídimo se lleva a cabo la maduración de los espermatozoides. Entender los mecanismos enzimáticos que participan en la producción local de T3, resulta indispensable para conocer el papel de esta hormona en la fisiología reproductiva.

## ANTECEDENTES

### Glándula tiroides

La glándula tiroides es uno de los órganos endócrinos filogenéticamente más antiguos que se han descrito en los vertebrados. Esta glándula generalmente se encuentra organizada en folículos altamente vascularizados, rodeados por una cápsula de tejido conectivo. Recibe inervación tanto simpática como parasimpática (Norris, 1980).

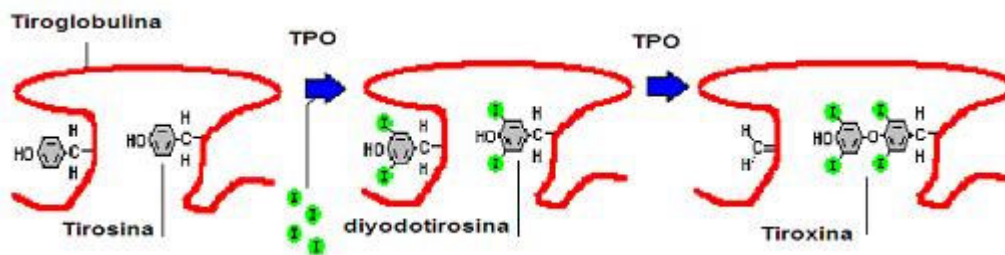
La síntesis de las hormonas tiroideas (HT) se lleva a cabo en las células epiteliales (tirocitos) de la glándula tiroides. El epitelio tiroideo es altamente polarizado y consta de una región basal y una apical. Como su nombre lo indica, la región basal se encuentra en estrecho contacto con la membrana basal y posee una extensa red de capilares y terminales nerviosas. En contraste, la región apical está en contacto directo con la luz del folículo, y es allí donde se lleva a cabo la organificación del yodo para la síntesis de HT. En condiciones de estimulación de la glándula, la membrana apical presenta microvellosidades y extensiones citoplásmicas que aumentan el área de contacto de la célula con el coloide (Figura 1).



**FIGURA 1. Histología de la glándula tiroides.** CF, células foliculares (tirocitos); MB, membrana basal; CP, células parafoliculares; C, Coloide; CS, capilar sanguíneo.

## Biosíntesis de Hormonas Tiroideas

Los folículos tiroideos consisten de una monocapa de células epiteliales de tipo cuboidal que se encuentran rodeando al coloide. El coloide está formado por una glucoproteína llamada tiroglobulina (TG), cuya estructura contiene 134 residuos de tirosina. Las HT se sintetizan a partir de estas tirosinas y se requiere de la presencia de yodo para su formación. Las células epiteliales de la tiroides contienen en su membrana plasmática un co-transportador  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  (NIS), que es el encargado de importar el yodo proveniente de la circulación a la tiroides. Posteriormente, en la membrana apical de los tirocitos, la tiroperoxidasa (TPO) cataliza la organificación del yodo a los residuos de tirosina de la TG y participa en el acoplamiento de 2 tirosinas yodadas para la síntesis de tiroxina (T4) o de triyodotironina (T3) (figura 2) (Taurog, 2000). La tiroides de los mamíferos secreta el 100 % de la T4 y únicamente el 20 % de la T3 circulante. El resto de la T3 se produce a partir de la conversión local de T4 a T3 en los diferentes tejidos.



**FIGURA 2.** Formación de tiroxina (T4) a partir del acoplamiento de 2 diyodotirosinas.

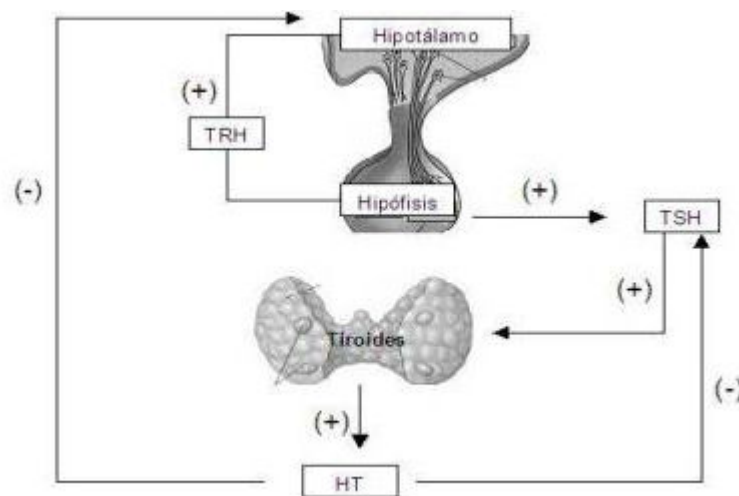
## Transporte

Una vez en la circulación, las HT son transportadas a los tejidos periféricos en asociación con proteínas plasmáticas, entre las que destacan la globulina de unión a tiroxina (TBG), la transtiretina (TTR) y la albúmina. En el plasma de mamíferos, aproximadamente el 80% de la T4 se encuentra unida a TBG, el 15% a TTR, y el 5% a albúmina y otras lipoproteínas. Para la T3, la distribución es

diferente, encontrándose el 90% unida a TBG y el resto a albúmina y a lipoproteínas (Robbins, 2000).

### Regulación de la secreción

La hormona estimulante de la tiroides (TSH) es secretada por la adenohipófisis y regula tanto la síntesis como la secreción de HT. La tirotropina (TRH) es secretada en el núcleo paraventricular del hipotálamo y a su vez regula la secreción de la TSH. Las concentraciones circulantes de HT son reguladas por asas de retroalimentación negativa en la unidad hipotálamo-hipófisis. En general., concentraciones de HT por encima de los niveles normales, inhiben la liberación de TRH y TSH. En cambio, cuando los niveles bajan, la liberación de TRH y TSH aumenta (Figura 3).



**FIGURA 3. Regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.** TRH, hormona liberadora de la tiroides; TSH, hormona estimuladora de la tiroides; HT, hormona tiroidea. (+) estimulación, (-) inhibición.

### Efectos biológicos

Las HT participan en prácticamente todas las funciones del organismo, regulando tanto el metabolismo de lípidos y carbohidratos, como el consumo de oxígeno en prácticamente todas las células. Además, participan de manera

fundamental en el crecimiento y maduración de los tejidos durante diferentes períodos del desarrollo (Chopra, 1996, Hulbert 2000, Cooke *et al.*, 2004). A continuación se resumen algunos de estos efectos:

- *Metabolismo*: Aumentan el metabolismo basal mediante la regulación del consumo de O<sub>2</sub> (termogénesis obligatoria).
- *Crecimiento*: Promueven el crecimiento corporal y en varios tejidos inducen la proliferación celular. Regulan la expresión del gen de la hormona de crecimiento (GH).
- *Desarrollo*: Participan en el desarrollo y maduración de varios tejidos, siendo el sistema nervioso central uno de los más estudiados. Estimulan el crecimiento axonal y dendrítico, promueven la sinaptogénesis y la mielinización de los axones. La deficiencia de estas hormonas provoca alteraciones en las conexiones neurales.
- *Cardiovasculares*: Tienen un efecto iono- y cronotrópico sobre el ritmo cardíaco, potenciando algunos efectos de las catecolaminas. Aumentan la transcripción del mRNA de la cadena  $\alpha$  de la miosina y disminuyen la de la  $\beta$ .
- *Reproducción*: Participan en el proceso de maduración sexual, a través de sus bien conocidos efectos sobre la diferenciación del testículo, modulando la espermatogénesis y la producción de hormonas sexuales.

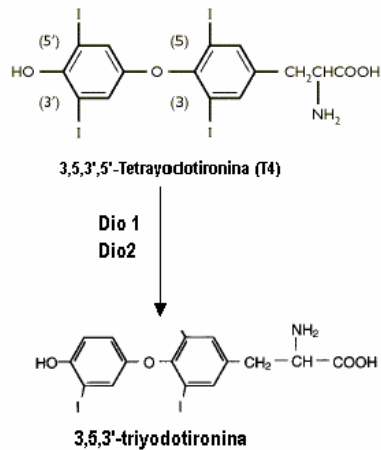
### Mecanismos de acción

Para que las HT ejerzan sus acciones se requiere su internalización a las células blanco. Estudios recientes indican la presencia de varios mecanismos de transporte membranar, dependientes de energía, que permiten la entrada de T3 y T4 al interior de la célula. Se han identificado transportadores de yodotironinas que son miembros de la familia de cotransportadores Na<sup>+</sup>/taurocolato (NTCP) y de la de aniones orgánicos no dependiente de Na<sup>+</sup> (OATP). Dado que las HT son una clase particular de amino ácidos construidas a partir de la unión de dos residuos

de tirosina, no es de sorprender que los transportadores de aminoácidos, en particular los tipo L y T, estén también involucrados en el transporte de HT (Jansen *et al.*, 2005). Los receptores nucleares a HT consisten de un dominio de transactivación, un dominio de unión al ADN y un dominio de unión a la HT y dimerización (Anderson *et al.*, 2000). Una vez dentro del núcleo, la hormona se une a su receptor, y el complejo hormona-receptor interactúa con secuencias específicas de ADN en las regiones promotoras de los genes responsivos. El efecto de la unión al ADN es modular la expresión de genes, estimulando o inhibiendo su transcripción. Puesto que la afinidad por los receptores es mayor para T3 que para T4, se considera a la T3 como la hormona biológicamente activa y a la T4 como la prohormona (Bianco *et al.*, 2002).

### **Conversión periférica de T4 a T3**

Debido a la mayor afinidad de T3 por sus receptores nucleares, es ampliamente aceptado que la conversión local de T4 a T3 es un requisito fundamental para la acción de las HT en los diferentes tejidos. La biotransformación de las HT ocurre a nivel extratiroideo mediante un mecanismo enzimático de desyodación. La remoción del yodo del anillo externo de T4 en la posición 3' ó 5' da lugar a la formación de la T3 (Figura 4). Esta biotransformación de T4 a T3 es catalizada por 2 isoenzimas, denominadas desyodasas tipo I (D1) y tipo II (D2). Ambas enzimas pertenecen a la familia de las seleno-proteínas por poseer una seleno-cisteína en su sitio activo (Bianco *et al.*, 2002). A continuación se revisan algunas de las características más importantes de estas enzimas (Tabla 1).



**FIGURA 4. Conversión de T4 a T3 por acción de las desyodasas.**

Desyodasa tipo I (D1)

Esta enzima opera a concentraciones altas de sustrato (0.1-5  $\mu\text{M}$ ) y bajas de cofactor (5 mM). Aunque *in vivo* desyoda a la T4, su sustrato preferencial *in vitro* es la rT3. La desyodación catalizada por la actividad D1 sigue una cinética bisustrato tipo ping-pong, siendo el primer sustrato la yodotironina y el segundo un grupo tiol (SH) que funciona como cofactor. La primera mitad de la reacción desyoda a la yodotironina, llevando a la formación de un intermediario (selenoenilyoduro). Posteriormente, se liberan el sustrato desyodado y el yodo del complejo selenoenilyoduro, permitiendo la regeneración de la enzima gracias a la presencia de los grupos tioles (Kohrle, 2002). Se desconoce cual podría ser el cofactor *in vivo*, pero en los ensayos *in vitro* se utiliza el ditioneitol (DTT) como agente reductor. Para la actividad *in vivo* se ha propuesto la participación del glutation y la tioredoxina como cofactores, sin embargo esto no se ha podido comprobar, pues en ensayos *in vitro* le confieren muy poca actividad a las desyodasas (Kóhrle, 2002). La actividad D1 es inhibida por el propiltiouracilo (PTU), el cual se une de manera covalente a la cisteína de la enzima. Sin embargo altas concentraciones de DTT protegen a la enzima de su inhibición por PTU. La inhibición por PTU es acompetitiva con el sustrato y competitiva con el cofactor. Estudios recientes sugieren que esta enzima se localiza en la membrana plasmática, y la T3 producida se secreta primordialmente al compartimiento

extracelular (Munira *et al.*, 2000). La actividad D1 se encuentra de manera abundante en hígado y riñón, así como en algunas glándulas como la tiroides, la hipófisis y la glándula mamaria lactante. Los principales reguladores de la síntesis de esta enzima son las HT y el ácido retinoico. Ambos tipos de hormonas aumentan la transcripción del gen de D1, debido a que este gen posee en su región promotora elementos responsivos a T3 y ácido retinoico (Bianco *et al.*, 2002). Aunque los mecanismos no se comprenden del todo bien, se ha descrito que el AMPc, los glucocorticoides, la GH y la testosterona modulan la actividad de la D1 (Bianco *et al.*, 2002). Respecto a esta última hormona, se sabe que la actividad D1 hepática presenta un dimorfismo sexual, siendo mayor en ratas macho que en hembras. Esta diferencia ha sido atribuida a la presencia de testosterona (Lisbôa *et al.*, 2001).

### Desyodasa tipo II (D2)

A diferencia de la actividad D1, la D2 funciona en concentraciones bajas de sustrato (1-2 nM) y altas de cofactor (20 mM). Su sustrato preferencial es la T4, y no se inhibe con PTU (1mM) (Kohrle, 2002). Al igual que la actividad D1, la D2 también requiere de la presencia de grupos tioles (DTT) para su actividad. La reacción catalizada por D2 sigue una cinética secuencial, sugiriendo que tanto el sustrato como el tiol deben de combinarse con la enzima antes de que la reacción se lleve a cabo. Esta enzima se encuentra primordialmente en el SNC y en algunas glándulas endocrinas como la pineal, la suprarrenal y la de Harder. Existen evidencias de que se localiza primordialmente en el sistema de membranas del retículo endoplásmico rugoso y la T3 producida se dirige al compartimiento nuclear (Munira *et al.*, 2000). El estado tiroideo es uno de los principales reguladores de la actividad D2, a nivel tanto pre como post-traducciona, aumentando durante el hipotiroidismo y disminuyendo durante el hipertiroidismo. Además, existen evidencias de que la transcripción del gen de D2 se regula por AMPc (el gen contiene un sitio CRE responsivo funcional) y glucocorticoides (Bianco *et al.*, 2002).



**TABLA 1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LAS DESYODASAS EN MAMÍFEROS**

<b>Propiedad</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>
Anillo desyodado	Ambos	Fenólico
Sustrato preferente	rT3>T4>T3	T4>rT3
Reacción catalizada	T4→T3	T4→T3
K <sub>m</sub> (sustrato)	~0.5μM	~1-2 nM
K <sub>m</sub> (cofactor DTT)	~5 mM	~30 mM
Inhibidores		
PTU 1 mM	++++	+
TGA 1 μM	++++	+
Distribución en tejidos	hígado, riñón, tiroides, hipófisis, glándula mamaria	SNC, grasa café, hipófisis, glándula, suprarrenal y timo
Localización subcelular	Membrana plasmática	Retículo endoplásmico rugoso

Modificado de Bianco *et al.*, 2002. + = resistente a inhibirse, ++++ = altamente sensible a inhibirse, ↓ = disminución, ↑ = aumento.

## **Epidídimo**

### Origen evolutivo y embrionario

El epidídimo (del griego *epí*, sobre y *dídymoi*, gemelos –testículos-) es una estructura que forma parte del sistema reproductor masculino y se localiza alrededor de los testículos (figura 5). Embriológicamente tiene su origen en el sistema genito-urinario primitivo a partir del mesonefros. Se encuentra presente en todos los vertebrados de fertilización interna (mamíferos, aves, reptiles y peces cartilagosos) y ausente en los vertebrados de fertilización externa (anfibios y peces óseos). Estos últimos, en lugar de epidídimo poseen un conducto espermático por donde se transportan los espermatozoides ya maduros (Jones 1998, Cooper 1999). La posición del epidídimo en los diferentes grupos es variable, pudiendo ser abdominal, inguinal o escrotal. En la mayoría de los mamíferos el epidídimo se localiza en el escroto y desciende vía el gubernaculum. Durante el desarrollo embrionario, el epidídimo, junto con los conductos deferentes y las vesículas seminales, se originan a partir de los conductos de Wolf. La testosterona y la androstenediona fetal, son los principales reguladores de la diferenciación de estas estructuras (Hughes 2001).

### Composición celular

El epidídimo es un tejido tubular altamente especializado, constituido por un estroma y un epitelio secretor (figura 5). La actividad de las células epiteliales se encuentra asociada al transporte de fluidos y solutos, así como a mecanismos de secreción y reabsorción (Dacheux *et al.*, 2003).

A continuación se resumen las principales características de los tipos celulares que componen el epidídimo.

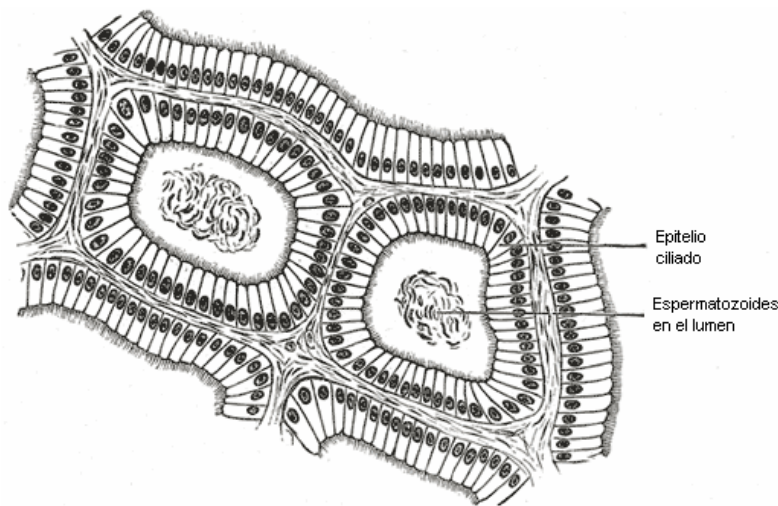
*Células principales.* Corresponden al tipo celular más abundante y son muy activas en funciones de secreción y absorción (Robaire *et al.*, 1995). La mayor parte de los fluidos provenientes del testículo son absorbidos en los conductos eferentes y el resto se absorbe en el epidídimo. Como resultado, tanto los espermatozoides como las secreciones del epidídimo se concentran, los espermatozoides son parcialmente deshidratados y la presión osmótica aumenta dentro del lumen. La presencia de uniones comunicantes entre las células restringe el paso de moléculas grandes de la sangre hacia el lumen y constituye la base anatómica de la barrera hemato-epididimal (Cooper, 1999). En la tabla 2 se resumen los principales productos de secreción del epidídimo y su probable función.

**TABLA 2. PRINCIPALES PRODUCTOS DE SECRECIÓN DEL EPIDÍDIMO**

Nombre	Función probable
Lactoferrina	Proteger membranas de la oxidación, respuesta inmune no específica.
Clusterina	Proteger membranas de la oxidación, respuesta inmune no específica.
GPX	Proteger membranas de la oxidación.
Enzimas (glucosidasas y glucosiltransferasa)	Metabolismo de glucoproteínas de membrana.
Proteasas e inhibidores de proteasas (catepsina, metaloproteasas, enzima convertidora de angiotensina, cres)	Protección del esperma
Baja afinidad	Evitar aglutinación del espermatozoides (cabeza-cabeza).
CRISP ( <i>cysteine rich secretory protein</i> )	Fusión de gametos. Supervivencia del esperma.
Mucoproteínas (Inmobilina)	Inhibir la movilidad <i>in situ</i> de los espermatozoides.
Factor de crecimiento nervioso ( $\beta$ -NGF)	Control del epitelio
Superoxido dismutasa, catalasa	Protección del esperma

Datos tomados de Cooper (1999), Dacheux J L (2003) y Gatti *et al.*, (2004).

*Células peritubulares.* Estas células de músculo liso en disposición circular y longitudinal se encuentran rodeando a los túbulos. Están inervadas por fibras simpáticas provenientes del ganglio mesentérico inferior. La inervación es más abundante hacia la región distal del epidídimo (Cooper, 1999). La estimulación de estas células es muy importante durante la eyaculación, pues permite la expulsión de los espermatozoides.



**FIGURA 5. Tejido epitelial (pseudoestratificado) con estereocilios.** En el lumen se aprecian los espermatozoides almacenados.

*Células basales.* Forman una red por debajo de las células principales. Expresan antígenos de superficie y tienen actividad fagocítica. La presencia de la apolipoproteína E sugiere su participación en el transporte de esteroides, y por lo tanto, en el reciclamiento de lípidos. Estas células también están involucradas en mecanismos de detoxificación debido a sus elevados niveles de glutatión S-transferasa y superóxido dismutasa (Cooper, 1999).

*Células apicales “clear” e inmunocitos.* Estas células se localizan en la región apical del túbulo. Se ha propuesto que la función de estas células es fagocitar materiales del lumen (Robaire *et al.*, 1995). Ambos tipos celulares

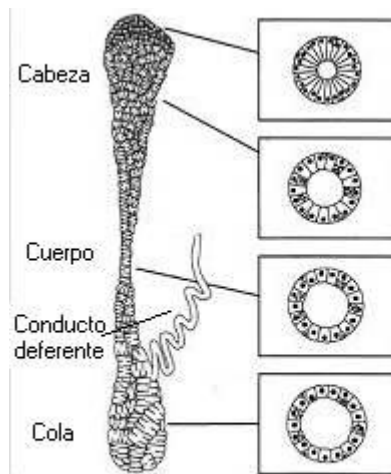
contienen a la enzima anhidrasa carbónica, la cual está involucrada en la acidificación del lumen (Cooper, 1999).

### Aspectos anatómicos y funcionales

El epidídimo es un tejido secretor altamente especializado en el que se lleva a cabo el transporte, la maduración y el almacenamiento de los espermatozoides (Tulsiani, 2003). Es un tejido multi-tubular, formado por una monocapa de células epiteliales que rodean al lumen (figura 6). La composición del lumen cambia a lo largo del epidídimo, y es ésta la que determina la maduración de los espermatozoides. Estructural y funcionalmente el epidídimo se ha dividido en 3 segmentos: cabeza, cuerpo y cola. La cabeza representa la región más próxima al testículo y está conformada por una prolongación de los conductos eferentes. En esta región los espermatozoides no son fértiles y es hasta que llegan a la cola (región distal), que se consideran funcionalmente maduros (Yoshinaga *et al.*, 2003). En los segmentos iniciales (cabeza), la altura del epitelio y la longitud de las microvellocidades es mayor, mientras que el diámetro del lumen es más pequeño. En contraste, hacia la región distal, la altura epitelial se hace más pequeña y el lumen más grande (figura 6).

### Funciones

En los mamíferos, los espermatozoides no son capaces de fertilizar un óvulo cuando salen del testículo, y es en su paso gradual por el epidídimo, que su membrana plasmática sufre remodelaciones (proceso de maduración) y adquieren la capacidad de fertilización. Además el epidídimo produce una gran variedad de compuestos que en conjunto actúan como antioxidantes. Está bien demostrado que estos procesos están mediados por proteínas secretadas por el epitelio del epidídimo, bajo la influencia de los esteroides sexuales (Nixon *et al.*, 2002).



**FIGURA 6. Estructura del epidídimo.** Nótese que en la región de la cabeza, el diámetro del lumen es pequeño, aumentando progresivamente hacia la región distal (cola).

*Maduración.* La maduración se refiere a los cambios en la capacidad funcional que ocurren durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo. Este paso involucra cambios en la fuerza y patrón de movilidad (maduración de la maquinaria flagelar), así como cambios en el estado de condensación de la cromatina y en la metilación del ADN. Asimismo, la habilidad para moverse de forma progresiva y cruzar el cervix, de unirse y penetrar la zona pellucida, y de unirse y fusionarse con la zona libre de vitelo se adquieren durante el tránsito por el epidídimo (Cooper, 1999) . Todo lo anterior contribuye a una mayor capacidad de fertilización y a generar embriones normales después de la fertilización (Gatti *et al.*, 2004). Las secreciones de la zona cercana al testículo incluyen aquellas relacionadas con la remodelación de las membranas y están asociadas a la fusión de los espermatozoides con el huevo, mientras que las proteínas involucradas con los factores de descapacitación se secretan más distalmente (Cooper, 1999).

*Almacenamiento.* La cola del epidídimo constituye un reservorio extra-gonadal, donde se almacenan los espermatozoides en estado latente y se liberan en el momento de la eyaculación a los conductos deferentes y posteriormente a la uretra. En muchas especies, los espermatozoides tienen el potencial para “nadar”, pero se mantienen inmóviles mientras están en la cola del epidídimo. Aunque existe variabilidad entre las especies, los espermatozoides no pueden ser almacenados indefinidamente y se ha descrito que en machos sin actividad sexual, los espermatozoides viejos sufren degeneración intraluminal. Se ha propuesto que el estado latente de los espermatozoides es inducido por una disminución del pH y la secreción de mucoproteínas (inmobilinas) que incrementan la viscosidad del medio. Este material es sintetizado por las *células principales* en la cabeza del epidídimo, y es secretado al lumen, viajando a lo largo del túbulo y se acumulándose en la cola (Robaire *et al.*, 1995). Otros factores involucrados en el control de la movilidad del espermatozoide son el ambiente iónico (calcio, pH,  $\text{HCO}_3^-$ ) y la presencia o ausencia de sustratos energéticos específicos para mantener una baja concentración de ATP (Gatti *et al.*, 2004). También se ha descrito la secreción de factores discapacitantes que estabilizan el acrosoma, o bien agregan a los espermatozoides (contacto cabeza-cabeza). Estos últimos evitan la activación prematura del espermatozoide (Cooper, 1999).

*Transporte.* En la mayoría de las especies el tránsito de los espermatozoides a través del epidídimo dura entre 1 y 2 semanas. Cuando los espermatozoides entran al epidídimo no son móviles, se desplazan a través del lumen por medio de las contracciones peristálticas de los túbulos. La actividad muscular es modulada positivamente por fibras nerviosas adrenérgicas, colinérgicas y purinérgicas y por algunas hormonas como la vasopresina y la oxitocina. En contraste, los andrógenos reducen el tono muscular (Cooper, 1999).

*Protección.* El arreglo epitelial del epidídimo (barrera hemato-epididimal) protege a los espermatozoides del sistema inmune. El daño oxidativo en el

espermatozoide es evitado por la presencia de enzimas (catalasas, glutathion peroxidasa y superóxido dismutasa) del epidídimo. Algunos productos tóxicos pueden ser removidos por la acción de la glutathion  $-S$ -transferasa (Cooper, 1999).

### Control de la función

A través de la secreción de proteínas, glucoproteínas, glucolípidos y fosfolípidos, las células epiteliales del epidídimo crean un ambiente propicio para la maduración y almacenamiento de los espermatozoides. La síntesis de estas sustancias está regulada principalmente por andrógenos (Henderson et al., 2004). Sin embargo, también existen evidencias de la participación de los estrógenos (Wiszniewska, 1998). Los principales andrógenos responsables del mantenimiento de la estructura y función del epidídimo son los metabolitos  $5\alpha$  reducidos de la testosterona: la  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) y el  $5\alpha$ -androstan- $3\alpha,17\beta$  diol ( $3\alpha$ -diol). Se ha demostrado in vitro la capacidad del epidídimo para sintetizar los metabolitos  $5\alpha$  reducidos a través de la actividad de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 1 y 2 (Robaire et al., 1995). Estas enzimas son muy abundantes en el segmento inicial del epidídimo (Pujol et al., 1979, Robaire et al., 1995). La regulación de estas enzimas es segmento-específica. Se ha propuesto que la testosterona modula la actividad principalmente en el cuerpo y la cola, y que en la cabeza la actividad depende de algún otro factor testicular (Robaire et al., 1995). Por otra parte, diversos estudios muestran una alta concentración de sitios de unión a estrógenos (receptores  $\alpha$  y  $\beta$ ) en el epidídimo y los conductos eferentes, sugiriendo una función de estos esteroides en la maduración de los espermatozoides y en la fertilidad masculina. La concentración de estrógenos del testículo es mucho más alta que la de la circulación, y en la rata, esta concentración es aproximadamente 25 veces más alta que el nivel medido en plasma, sugiriendo un papel central de los estrógenos en la función del testículo y el epidídimo (O'Donnell et al., 2001).



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El presente estudio forma parte de una nueva línea del laboratorio que analiza la participación de las HT en el desarrollo, diferenciación y funcionamiento de algunas estructuras del sistema reproductor masculino. Durante mucho tiempo, la T3 fue una hormona a la que no se le consideró dentro de la fisiología reproductiva, debido a sus nulos efectos metabólicos sobre el testículo adulto. Sin embargo, esta concepción cambió a partir de la década de los 80', cuando se reconoció su participación en la maduración de las células de Sertoli y por lo tanto, en la espermatogénesis. Estudios recientes indican que el epidídimo expresa receptores a T3 y que el hipotiroidismo atrofia el epitelio del epidídimo, reduciendo tanto el número de espermatozoides como su movilidad. Dentro de este contexto, estudios realizados en nuestro laboratorio han mostrado que entre las estructuras del sistema reproductor masculino el epidídimo es el tejido que presenta mayor actividad desyodativa, y por lo tanto, en el que ocurre mayor producción local de T3. Además, esta actividad resultó ser altamente sensible a inhibidores específicos, como el PTU, sugiriendo la presencia de D1. En vista de lo anterior, y como un primer acercamiento a este estudio, en el presente proyecto nos propusimos caracterizar por métodos bioquímicos el tipo (s) de actividad desyodativa presente en el epidídimo de rata, y analizar su distribución a lo largo de este conducto. La función del epidídimo depende de hormonas sexuales y cuando menos en el hígado, la desyodación de T4 a T3 parece ser influenciada por la testosterona. Por lo tanto, en este estudio exploramos el patrón de expresión de la actividad desyodativa durante diferentes etapas del desarrollo y particularmente analizamos el efecto de los andrógenos (testosterona y dihidrotestosterona) y de los estrógenos (17- $\beta$ -estradiol) sobre la actividad desyodativa. Con base en lo anterior planteamos la siguiente hipótesis.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Caracterización y regulación hormonal de la actividad desyodativa en extractos de epidídimo de rata.

### **Específicos**

1. Estandarizar las condiciones “óptimas” del ensayo y determinar los parámetros cinéticos de la desyodasa.
2. Caracterizar el patrón enzimático durante la ontogenia.
3. Analizar la distribución regional de la actividad desyodativa.
4. Analizar el papel de los andrógenos (testosterona y dihidrotestosterona) y de los estrógenos (17- $\beta$ -estradiol) sobre la actividad enzimática.

## **HIPÓTESIS**

Proponemos que la actividad desyodativa corresponde al subtipo I (D1) y que la expresión de esta enzima está asociada con la maduración (pubertad) y función del epidídimo (madurez sexual). Suponemos que en los animales adultos la mayor actividad se concentra en la región próxima al testículo (cabeza-cuerpo) y que dicha actividad es regulada por hormonas sexuales.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### Material Biológico

El epidídimo se obtuvo a partir de ratas macho de la cepa Wistar. Todos los animales fueron mantenidos en un cuarto con temperatura ( $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e iluminación controlada (12:12). Tuvieron acceso *ad libitum* al agua y al alimento. Los animales se sacrificaron por decapitación y se obtuvo el epidídimo completo ó en partes (cabeza, cuerpo o cola). La decapitación es un método de eutanasia aceptado por la *American Veterinary Medical Association* (AVMA).

### Diseño Experimental

Exp. 1. Estandarización y caracterización enzimática. Las condiciones “óptimas” del ensayo, y la caracterización cinética se realizaron en extractos de epidídimo, obtenidos a partir de ratas sexualmente maduras (300 g). Los ensayos iniciales se realizaron utilizando  $^{125}\text{I}$ -rT3 (1 nM) como sustrato y una concentración 20 mM de DTT. La reacción enzimática se incubó 3 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en un pH 7.6 Estas condiciones experimentales permiten cuantificar actividad del tipo D1 y D2. Se variaron las concentraciones de proteína, tiempo, temperatura de incubación y pH. La preferencia por el sustrato se determinó realizando ensayos de competencia (rT3 vs T4). La respuesta de la actividad enzimática se analizó en presencia de inhibidores específicos como el propiltiouracilo (PTU). Se determinaron las constantes cinéticas ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) y el tipo de patrón cinético (secuencial vs ping-pong). La eficiencia catalítica se calculó a partir del cociente  $V_{max}/k_m$ .

Exp. 2. Patrón de expresión durante la ontogenia. La actividad desyodativa se analizó en epidídimos de ratas neonatas (1-3 semanas), prepúberes (4-5 semanas), púberes (7-8 semanas), adultas (3 y 8 meses) y seniles (2 años). Las determinaciones se realizaron en ausencia y presencia de PTU (1mM).

Exp. 3. Distribución de la actividad desyodativa en animales sexualmente maduros. Este experimento se diseñó con la finalidad de analizar la distribución de la actividad desyodativa, en los diferentes segmentos del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola). En otro grupo de animales se exploró si la actividad desyodativa se confina al epidídimo y/o a los espermatozoides contenidos en el lumen. El aislamiento de los espermatozoides se llevó a cabo de la siguiente manera: de un grupo de animales adultos (3 meses) se extrajo el epidídimo y se colocó en una caja de Petri con solución salina fisiológica (0.9%). Con una jeringa se realizaron varios lavados al epidídimo y se extrajeron los espermatozoides de la región de la cabeza y de la cola. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm (5 minutos a 4°C) y el sedimento (espermatozoides) se resuspendió en amortiguador Hepes (pH 7.6). Los espermatozoides fueron extractos (sornicación) y posteriormente se determinó su actividad desyodativa.

Exp. 4 Modulación hormonal. En este estudio se exploró el papel de la DHT sobre la regulación de la actividad desyodativa. Se utilizaron animales intactos tratados con finasteride (Proscar, Merck-Sharp). Este fármaco inhibe la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo II y por lo tanto la producción local de DHT, mediada por esta enzima. El finasteride se administró durante 10 días por vía subcutánea (20 mg /kg peso). Los animales control recibieron el vehículo (etanol al 20%, diluido en aceite vegetal). La próstata es una glándula cuyo peso depende primordialmente de DHT (Steers, 2001). Por lo tanto, el peso de este tejido se utilizó como un indicador de la eficacia del tratamiento. El papel de la testosterona (T) y del 17 $\beta$ -Estradiol (E2) fue explorado en animales control (falsos operados) y en animales castrados reemplazados con T (Sostenon 250, Organon) o E2 (Primogyn-Depot, Schering). La T (1.2 mg / rata) y el E2 (20  $\mu$ g / rata) fueron administrados por vía i.m. en una solución oleosa de lenta liberación, durante 10 días. Los tratamientos hormonales comenzaron 1 semana post-cirugía. Los animales control recibieron aceite vegetal como vehículo.

## **Procedimientos quirúrgicos**

La castración bilateral se llevó a cabo utilizando anestesia general con una mezcla de ketamina (70 mg /kg peso) y xilacina (6 mg / Kg peso). Se realizó una incisión a través de la piel del escroto y la *tunica albuginea* para exponer el testículo y al epidídimo. Ambas estructuras se separaron entre sí, cortando el tejido conjuntivo que los une. Antes de extirpar el testículo se hizo un pequeño amarre en la arteria *testicularis*, para evitar la hemorragia en el momento del corte. El epidídimo se dejó intacto. Se contó con un grupo control de animales falsos operados, los cuales se sometieron al mismo procedimiento quirúrgico pero los testículos no fueron removidos.

## **Procesamiento de los tejidos**

Los tejidos se colectaron inmediatamente después de la decapitación y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su procesamiento. Se homogeneizaron en amortiguador Hepes (pH 7.5), adicionado con EDTA (10 mM) y sacarosa (0.05 M), en una proporción peso/volumen 1/10. El homogeneizado se centrifugó (2,500 rpm X 30 min) y el sobrenadante se almacenó en alícuotas ( $-70^{\circ}\text{C}$ ), para posteriormente medir la actividad desyodativa.

## **Métodos Analíticos**

La cuantificación de proteínas se determinó con el método de Bradford (Bradford, 1976) y la actividad desyodativa con la técnica de liberación de radioyodo (Anguiano *et al.*, 1995). Estos métodos se describen ampliamente en el anexo y ambos se encuentran estandarizados en el laboratorio. En colaboración con el Dr. Carlos Romero (UAM-Iztapalapa), se realizó la cuantificación de los niveles circulantes de 17- $\beta$ -estradiol por medio de un radioinmunoanálisis (RIA) (Herrera *et al.*, 1993).

La cuantificación de los niveles circulantes de testosterona se realizó utilizando un ensayo inmunoenzimático (Assay Designs, Inc.).

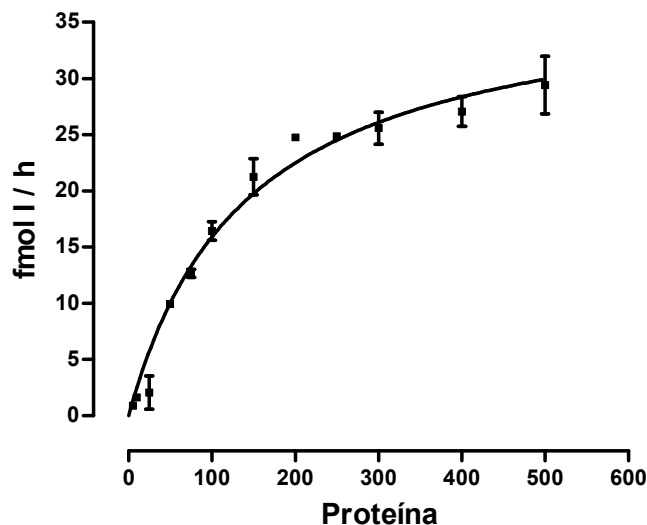
## **Análisis Estadístico**

Los resultados se presentan como la media  $\pm$  error estándar ( $X \pm ee$ ). Los datos se compararon utilizando un análisis de varianza de 1 vía ( $p \leq 0.05$ ). El análisis entre grupos se realizó con la pruebas de Tukey y/o Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS

### Estandarización y caracterización cinética

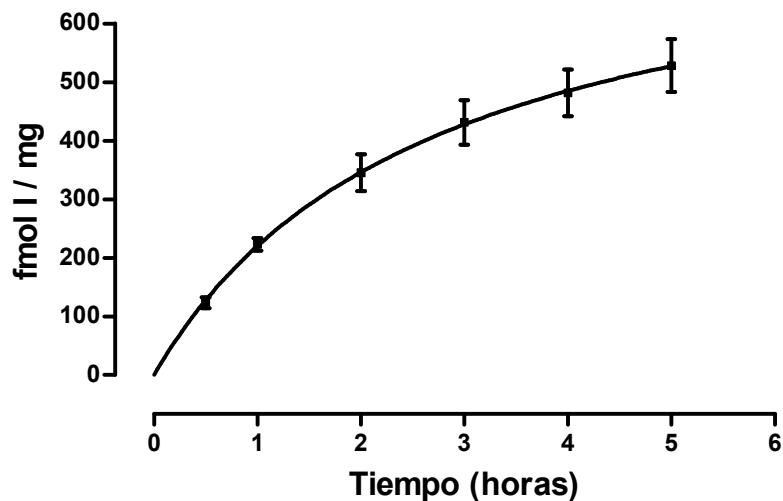
Concentración de proteínas. Este ensayo se realizó con el fin de conocer el intervalo de proteína en el cual la actividad desyodativa presenta un patrón lineal. Los resultados de la gráfica 1 muestran que la actividad fue directamente proporcional a la concentración de proteína hasta 150  $\mu\text{g}$  de proteína. Los ensayos subsiguientes se realizaron utilizando 50-100  $\mu\text{g}$  de proteína.



**GRAFICA 1. Actividad desyodativa total en respuesta a la concentración de proteínas.** Las condiciones del ensayo fueron 1 nM de  $^{125}\text{I}$ -rT3 y 20 mM de DTT. Incubación: 3 h. a 37°C. pH 7.5. Cada punto representa la  $X \pm \text{ee}$ .  $n = 3$  experimentos realizados por duplicado. La actividad se expresa en fmoles de I liberado por hora de incubación (fmol I / h).

Tiempo de incubación. Los resultados de la gráfica 2 muestran que la actividad desyodativa fue directamente proporcional al tiempo de incubación durante las 2

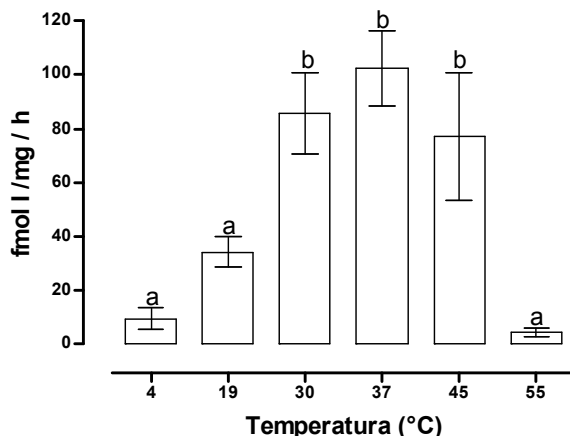
primeras horas. El tiempo de incubación establecido para los ensayos subsecuentes fue de 1.5 horas.



**GRAFICA 2. Actividad desyodativa en función del tiempo de incubación.** Las condiciones de ensayo fueron: 100  $\mu\text{g}$  de proteína, 1 nM de  $^{125}\text{I}$ -rT3 y 20 mM DTT. Incubación: 37°C. pH 7.5. Cada punto representa la  $X \pm \text{ee}$ .  $n = 3$  experimentos realizados por duplicado. Los resultados se expresan en fmoles de I liberado por mg de proteína (fmol I / mg).

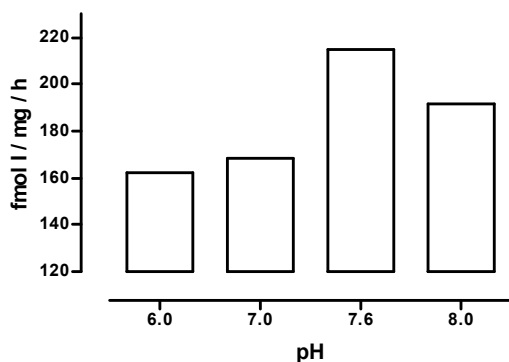
Temperatura de incubación. El efecto de la temperatura se estudió en un intervalo de 4° a 55°C. La máxima actividad se observó entre 30° y 45°C, disminuyendo significativamente hacia los extremos de la curva (Gráfica 3). Los experimentos subsecuentes se siguieron realizando a 37°C.





**GRAFICA 3. Efecto de la temperatura sobre la actividad desyodativa.** Las condiciones del ensayo fueron: 100µg de proteína, 1.0 nM de <sup>125</sup>I-rT3 y 20 mM de DTT. Incubación: 1.5 h. pH 7.5. Cada barra representa la X ± ee. n= 3 experimentos realizados por duplicado. Los resultados se expresan en fmolas de I liberado por mg de proteína por hora (fmol I / mg/ h). Letras diferentes representan diferencias significativas (Tukey, p<0.05).

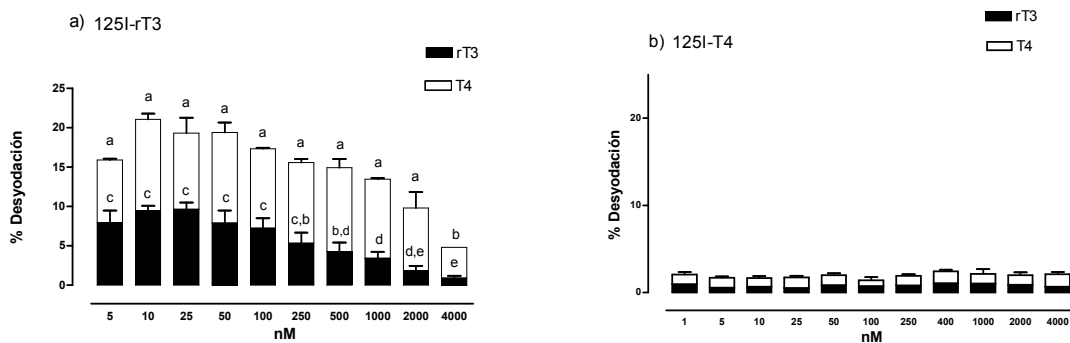
Efecto del pH. La actividad enzimática se analizó en un intervalo de pH de 6 a 8 utilizando amortiguador HEPES, (pk = 7.5). Los resultados mostraron que la actividad enzimática alcanzó su máximo en un pH de 7.6 (gráfica 4).



**GRAFICA 4. Efecto del pH sobre la actividad desyodativa.** Las condiciones de ensayo fueron: 100 µg de proteína, 1nM de <sup>125</sup>I-rT3 y 20 mM de DTT. Incubación: 1.5 h a 37°C. Se muestra un ensayo representativo realizado por duplicado.

Sustrato preferencial. Estos ensayos se realizaron con el fin de determinar la preferencia por el sustrato (rT3 vs T4). El primer ensayo consistió en analizar la desyodación de <sup>125</sup>I-rT3 en respuesta a concentraciones variables de rT3 o T4 frías (gráficas 5a y 5b respectivamente). Los resultados mostraron un descenso significativo del porcentaje de desyodación a partir de 500 nM de rT3 y 4000 nM

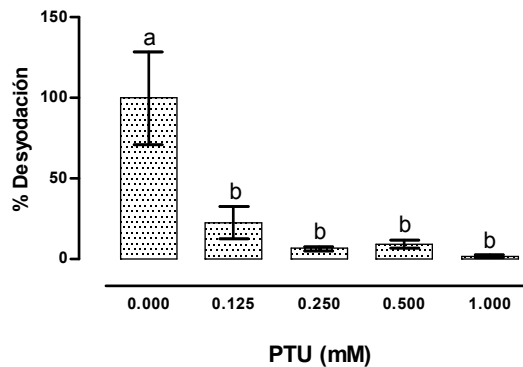
de T4. Estos resultados indican que se requieren concentraciones 8 veces menores de rT3 fría que de T4 para comenzar a desplazar a la  $^{125}\text{I}$ -rT3. En un segundo ensayo, se analizó la desyodación de  $^{125}\text{I}$ -T4 en respuesta a concentraciones variables de rT3 o T4 frías (gráfica 5b). Los resultados mostraron un porcentaje de desyodación 6 veces menor cuando se utiliza  $^{125}\text{I}$ -T4 en comparación con  $^{125}\text{I}$ -rT3 (1.5 vs 7.0). El porcentaje de desyodación con  $^{125}\text{I}$ -T4 se encontró en el límite inferior de sensibilidad del método y no fue posible observar cambios al administrar las hormonas frías. En conjunto, todas estas evidencias sugieren fuertemente que la rT3 es el sustrato preferencial de la actividad desyodativa del epidídimo.



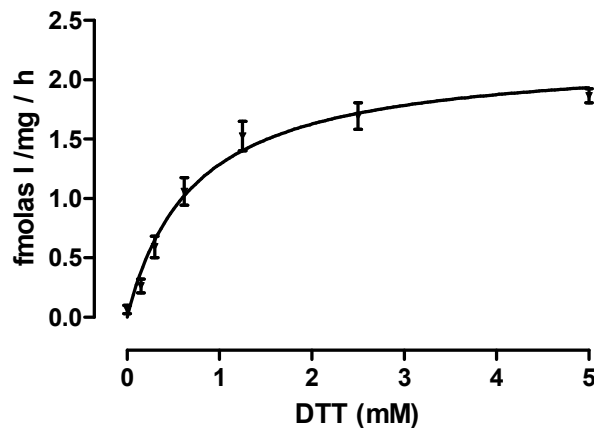
**GRAFICA 5. Determinación de la actividad desyodativa utilizando 2 diferentes tipos de sustratos (rT3 y T4).** Las condiciones de ensayo fueron: 100  $\mu\text{g}$  de proteína y una solución isotópica 1.0 nM de  $^{125}\text{I}$ -rT3 o  $^{125}\text{I}$ -T4 combinada con hormona no marcada. 20 mM DTT. Incubación: 1.5 h a 37°C. pH 7.5. Cada barra represente la  $X \pm \text{ee}$ .  $n = 3$  experimentos realizados por duplicado. Los resultados se expresan como % de desyodación. Letras diferentes representan diferencias significativas (Bonferroni,  $p \leq 0.05$ ).

Efecto de la administración de PTU. Se analizó el efecto dosis-respuesta del PTU sobre la actividad desyodativa. Prácticamente más del 90 % de la actividad enzimática se inhibió a partir de 0.25 mM de PTU (gráfica 6). Debido a que este agente inhibe preferentemente la actividad de la D1, los resultados sugieren fuertemente la presencia de este subtipo enzimático en el epidídimo de rata.

Cinética de cofactor (DTT). La actividad se analizó en respuesta a diferentes concentraciones de DTT (0 – 5 mM) y manteniendo una concentración fija de sustrato ( $^{125}\text{I}$ -rT3). Los resultados mostraron un aumento gradual de la actividad entre 0.1 y 0.6 mM, alcanzando la saturación a partir de 1.25 mM (gráfica 7).

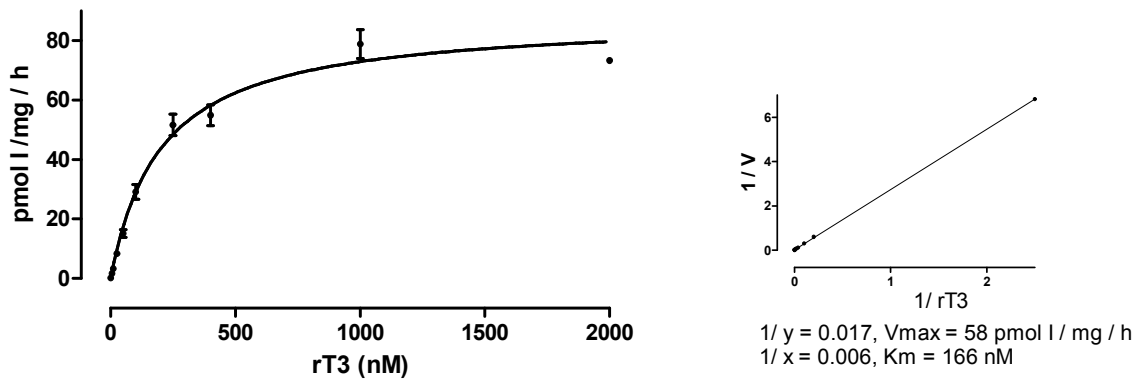


**GRAFICA 6. Efecto del PTU sobre la actividad desyodativa.** La actividad se expresa como % de desyodación. Los valores se normalizaron respecto al 100 % del grupo control (ausencia de PTU). Las condiciones del ensayo fueron: 100 $\mu\text{g}$  de proteína, 1.0 nM de  $^{125}\text{I}$ -rT3 y 20 mM de DTT. pH 7.5. Incubación: 1.5 h a 37°C. Las barras muestran la  $X \pm e.e$  de  $n = 3$  experimentos realizados por duplicado. Letras distintas denotas diferencias significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).



**GRAFICA 7. Cinética de la actividad desyodativa en función de la concentración de DTT.** Las condiciones de ensayo fueron: 100  $\mu\text{g}$  de proteína, 1.0 nM de  $^{125}\text{I}$ -rT3; 0-5 mM DTT; pH 7.5. Incubación: 1.5 h a 37°C. Cada punto representa la  $X \pm ee$ .  $n = 3$  experimentos realizados por duplicado.

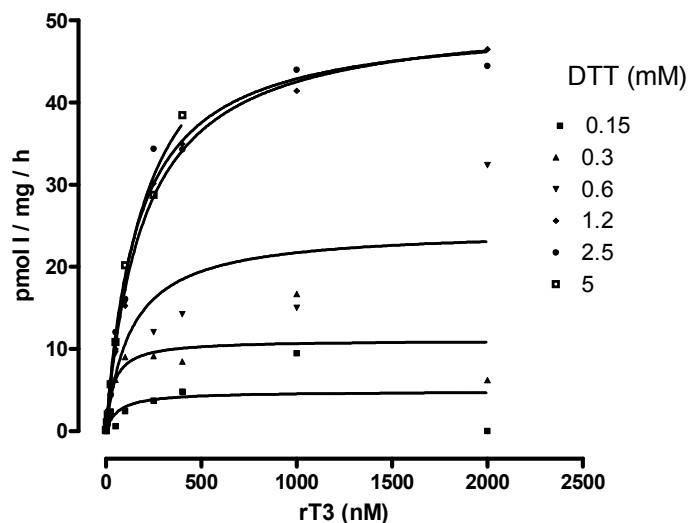
Cinética de sustrato (rT3). En experimentos previos mostramos que en condiciones *in vitro* existe una mayor afinidad de la actividad enzimática por la rT3 que por la T4. Por lo tanto, el análisis cinético se realizó utilizando esta hormona como sustrato. La actividad desyodativa se analizó en respuesta a diferentes concentraciones de sustrato (0.5 – 2000 nM), manteniendo una concentración fija del cofactor (DTT, 20 mM). Los resultados mostraron un típico patrón de saturación, aumentando la actividad enzimática gradualmente entre 0.5 y 400 nM. Las constantes de Michaelis-Menten para el sustrato se calcularon a partir de los interceptos resultantes de las gráficas doble recíprocas (Lineweaver-Burk, inserto). Se obtuvo un valor de  $V_{max}$  para el sustrato de 58 pmol I / mg / h y una  $K_m$  de 166 nM (gráfica 8).



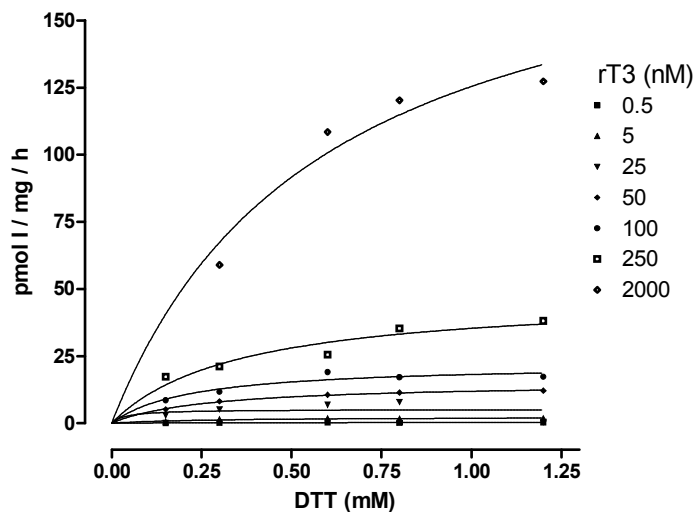
**GRAFICA 8. Cinética de la actividad desyodativa en función de la concentración de sustrato.** El recuadro muestra la gráfica Lineweaver-Burk. Las condiciones de ensayo fueron: 100  $\mu$ g de proteína, 1.0 nM de  $^{125}$ I-rT3 y el resto de rT3 no marcada. 5 mM de DTT. Incubación: 1.5 horas a 37°C. pH 7.5. Cada punto representa la  $X \pm ee$ .  $n = 3$  experimentos independientes realizados por duplicado.

Determinación de los parámetros cinéticos. Debido a que la desyodación de tironinas implica un mecanismo enzimático bi-sustrato (hormona-cofactor), la determinación de los parámetros cinéticos verdaderos ( $V_{max}$  y  $K_m$ ), se realizó variando simultáneamente tanto las concentraciones del sustrato (0.5 – 2000 nM) como las del cofactor (DTT, 0.15 – 5 mM). Los resultados mostraron un aumento

gradual de la actividad desyodativa, así como el típico patrón de saturación, en respuesta a ambas variables (gráficas 9 y 10).

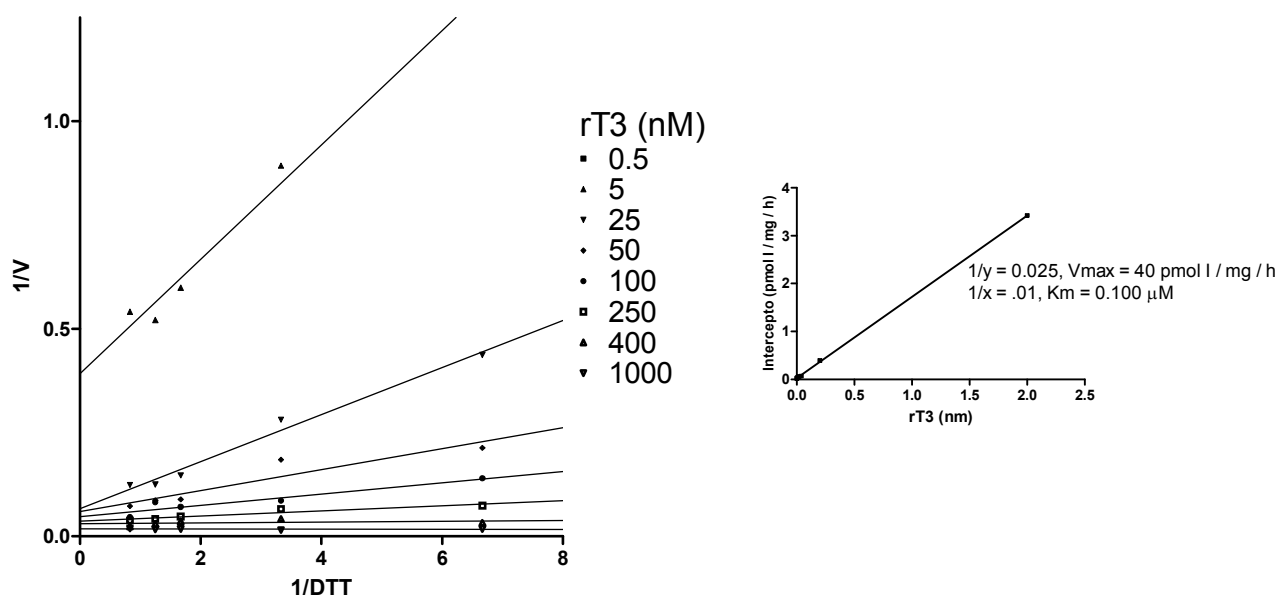


**GRAFICA 9. Cinética de sustrato utilizando diferentes concentraciones de cofactor.** Las condiciones del ensayo fueron: 50  $\mu\text{g}$  de proteína y un solución isotópica de 1.0 nM  $^{125}\text{I}$ -rT3 y el resto de hormona no marcada. Incubación: 1.5 horas a 37°C. pH 7.5. n = 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Se muestra una gráfica representativa de un ensayo.



**GRAFICA 10 Cinética de cofactor utilizando diferentes concentraciones de sustrato.** Este ensayo se realizó con 50  $\mu\text{g}$  de proteína y un solución isotópica de 1.0 nM  $^{125}\text{I}$ -rT3 y el resto de hormona no marcada. Incubación: 1.5 horas a 37°C. pH 7.5. Este ensayo se realizó 3 veces de manera independiente. Se muestra una gráfica representativa.

Los parámetros cinéticos se calcularon a partir de los interceptos del análisis de Lineweaver-Burk (dobles recíprocas). Los resultados mostraron un patrón de líneas paralelas, semejante al descrito para las cinéticas tipo ping-pong (gráfica 11a). Los valores verdaderos de  $K_m$  y  $V_{max}$  se obtuvieron a partir de graficar los interceptos en  $y$  ( $1/V$ ), en función de la concentración de sustrato ( $1/rT3$ ). Se obtuvo un valor de  $K_m \approx 0.100 \mu M$  y un valor de  $V_{max} \approx 40 \text{ pmol l / mg / h}$  (gráfica 11b). En la tabla 2 se resumen los valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  para el sustrato a partir de 3 ensayos independientes. El cociente  $V_{max} / K_m$  se considera un indicador de la eficiencia catalítica de la enzima. Para el caso del epidídimo fue de 400. En la tabla 3 se compara la eficiencia catalítica del epidídimo respecto a otros tejidos de rata con actividad D1.



**GRAFICA 11. Análisis de la cinética enzimática para sustrato.** a) Transformación de Lineweaver-burk; b) interceptos de los dobles recíprocos. Las condiciones del ensayo fueron:  $100 \mu g$  de proteína, solución isotópica de  $1.0 \text{ nM}$  de  $^{125}I$ -rT3 y el resto de hormona no marcada. Incubación: 1.5 horas a  $37^\circ C$ . pH. 7.5. El ensayo se realizó 3 veces de manera independiente. Se muestra una gráfica representativa.

**TABLA 3. RESUMEN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS PARA SUSTRATO**

ENSAYOS	Km ( $\mu$ M)	Vmax (pmol l / mg / h)
1	0.126	37
2	0.112	40
3	0.111	58
X $\pm$ e.e.	0.112 $\pm$ .01	45 $\pm$ 11

**TABLA 4. EFICIENCIA CATALÍTICA DEL EPIDÍDIMO RESPECTO A OTROS TEJIDOS**

Tejido	Km (mM)	Vmax (pmol l/mg/ h)	Vmax/Km
Hígado <sup>1</sup>	2.2	36600	160000
Riñón <sup>1</sup>	0.8	17700	22000
Glándula mamaria <sup>2</sup>	0.5	9.73	20
Glándula sublingual <sup>3</sup>	0.4	34.4	86
<b>Epidídimo</b>	<b>0.1</b>	<b>45</b>	<b>450</b>

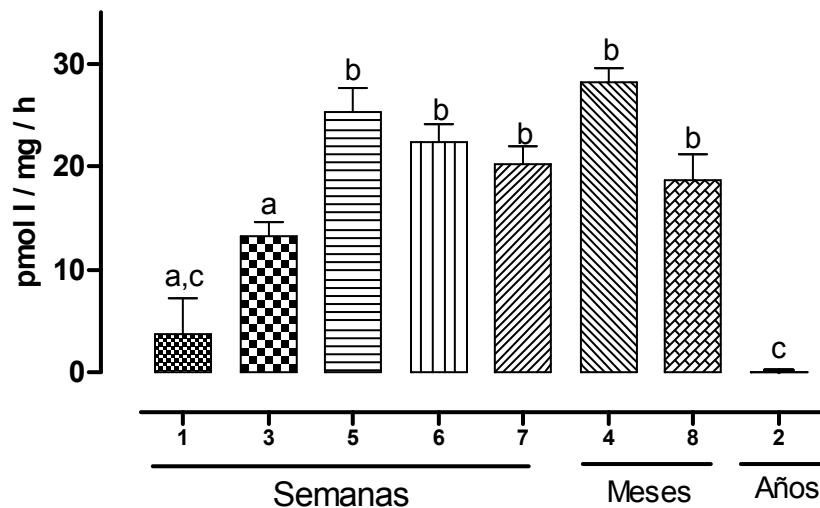
Datos tomados de (1) Sabatino *et al.*, (2000), (2) Aceves *et al.*, (1995) y (3) Tanaka *et al.*, (1993). Todos los ensayos se realizaron en tejidos de rata utilizando extractos semicrudos.

En resumen, la alta susceptibilidad de la enzima a inhibirse con PTU, la mayor afinidad por rT3, la cinética tipo ping-pong, los bajos requerimientos de cofactor (DTT), y los valores de Km para el sustrato ( $\approx 0.1 \mu$ M), indican la presencia de la actividad D1 en el epidídimo de rata.

### **Ontogenia de la actividad D1**

Los resultados de la gráfica 12 muestran que la actividad se encuentra presente desde el periodo neonatal hasta la madurez sexual. Durante el envejecimiento, la actividad disminuyó hasta niveles prácticamente indetectables. En un ensayo independiente se midió la sensibilidad a PTU, y se observó una fuerte inhibición de la actividad enzimática en todas las etapas del desarrollo. Estos resultados indican

la presencia de D1 en los diferentes estados de desarrollo y funcionalidad del epidídimo.



**GRAFICA 12. Ontogenia de la actividad D1 del epidídimo.** La actividad se expresa como pmol I/mg/hr. Las condiciones del ensayo fueron: 100µg de proteína, 1.0 nM de <sup>125</sup>I-rT3 y el resto de hormona no marcada (0.2 µM). 5 mM de DTT. pH 7.5. Incubación: 1.5 h a 37°C. Las barras muestran la X ± e.e de n = 5/grupo. Letras diferentes representan diferencias significativas (Tukey, p ≤ 0.05).

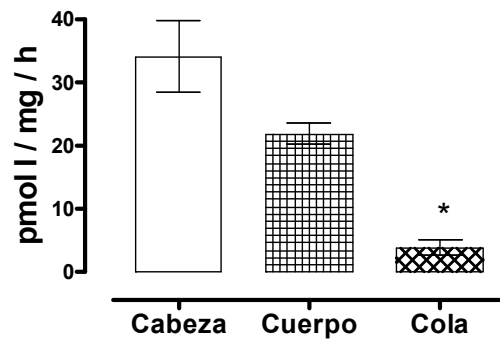
### Distribución regional de la actividad D1

Por otra parte, y debido a que los segmentos del epidídimo se encuentran asociados a funciones diferentes, resultó necesario definir si la actividad D1 se distribuía homogénea ó diferencialmente. Los resultados de la gráfica 13 mostraron una actividad de 3 a 5 veces mayor en la región próxima al testículo (cuerpo-cabeza), que en la región distal (cola).

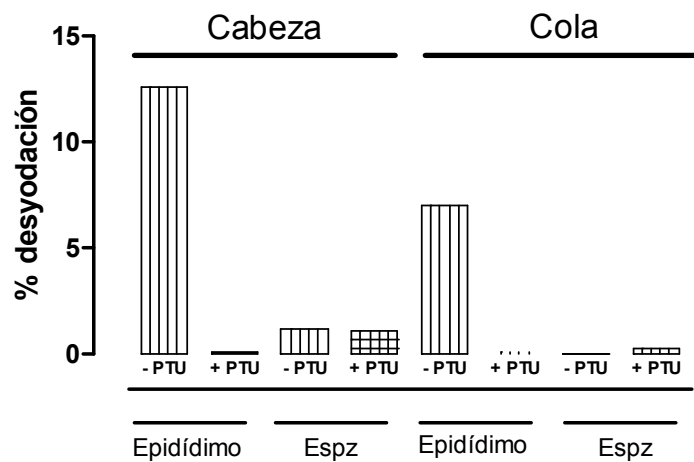
La presencia de D1 en etapas muy tempranas del desarrollo sugería que esta enzima podría estar ausente en los espermatozoides. Sin embargo, y debido a que la caracterización de la enzima se realizó en extractos crudos de epidídimo, resultaba necesario realizar un experimento para identificar si en los animales adultos la actividad desyodativa se restringía al epidídimo y/o a los espermatozoides contenidos en el lumen. Los resultados de la gráfica 14 mostraron que los espermatozoides de la cabeza presentaron un porcentaje de



desyodación 5 veces menor al reportado para el epidídimo. La administración de PTU inhibió la actividad del epidídimo, pero no tuvo ningún efecto sobre la actividad desyodativa del espermatozoide. Estos resultados descartan la presencia de D1 en los espermatozoides. Los espermatozoides de la región caudal prácticamente no presentaron actividad desyodativa.



**GRAFICA 13. Regionalización de la actividad desyodativa en el epidídimo de rata.** Este ensayo se realizó con 100 µg de proteína y una solución isotópica de 1.0 nM <sup>125</sup>I-rT3 y el resto de hormona no marcada (0.2 µM). 5mM DTT. pH 7.5. Incubación: 1.5 horas a 37°C. Los resultados muestran la media ± e.e. n = 6 segmentos / grupo. \*P ≤ 0.001 con la prueba de Tukey.



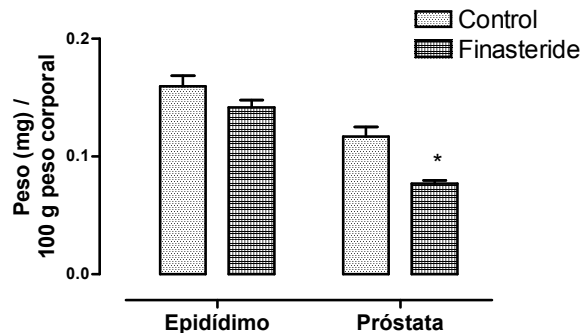
**GRÁFICA 14. Caracterización de la actividad desyodativa en epidídimo y espermatozoides (espz).** La actividad de los espermatozoides se determinó en presencia y ausencia de PTU (1mM) y se comparó con la del epidídimo. El ensayo se realizó con 100 µg de proteína y una solución 1.0 nM <sup>125</sup>I-rT3, 20 mM DTT. pH 7.5 Incubación: 1.5 h a 37 °C. n = 3 / grupo.

## Influencia de las hormonas sexuales en la regulación de la actividad D1

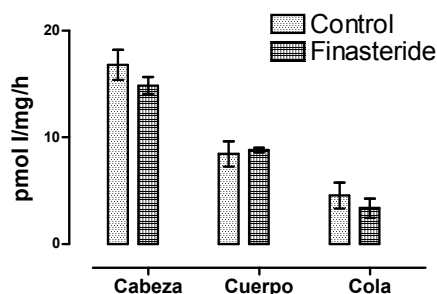
El propósito de estos experimentos fue analizar el papel de la DHT, de la T y del E2 sobre la actividad D1.

### Dihidrotestosterona (DHT)

La participación de DHT se analizó en ratas intactas tratadas con finasteride. Los resultados de la gráfica 15 mostraron una disminución parcial del peso del epidídimo. En contraste y como era de esperarse, el peso de la próstata disminuyó significativamente (40 %), corroborando la eficacia del tratamiento. Sin embargo, nuestros resultados muestran que el finasteride no tuvo ningún efecto sobre la actividad D1, sugiriendo que la DHT no participa en su modulación (gráfica 16).



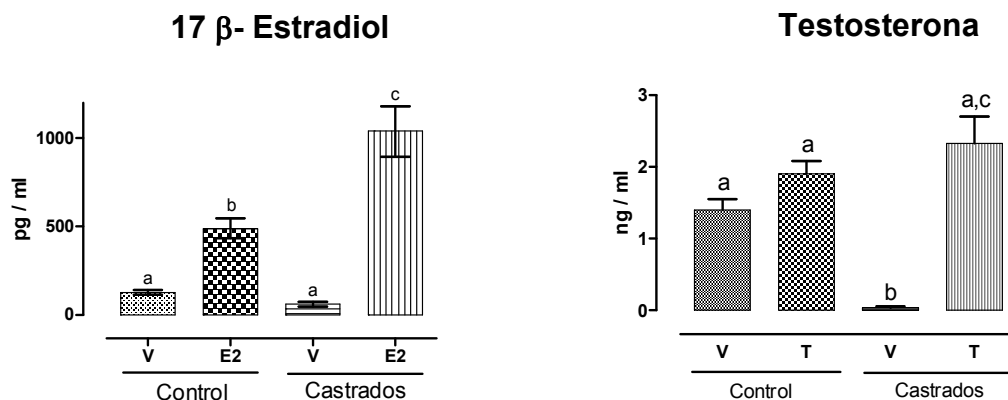
**GRAFICA 15. Efecto del finasteride sobre el peso del epidídimo y de la próstata.** El peso de los tejidos se normalizó a 100 g de peso corporal. Cada barra representa la  $X \pm$  e.e.  $n = 5$  / grupo.  $p < 0.05$  (Tukey).



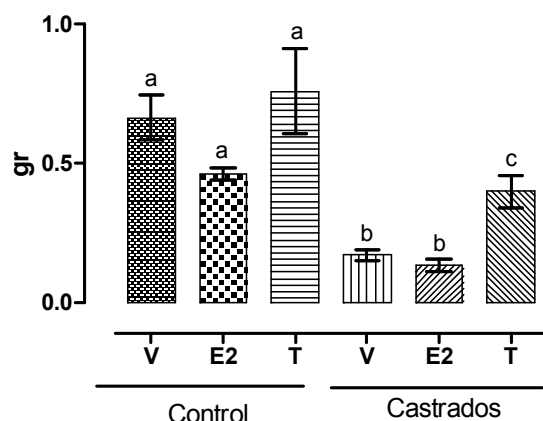
**GRAFICA 16. Efecto del finasteride sobre la actividad D1 en el epidídimo.** El ensayo se realizó con 100 µg de proteína y una solución isotópica de 1.0 nM <sup>125</sup>I-rT3 y 0.2 µM de hormona no marcada. 5 mM de DTT. pH. 7.5. Incubación: 1.5 h a 37°C. Cada barra representa la X ± e.e. n = 5 /grupo.

Testosterona (T) y 17-β-estradiol (E2).

En este estudio evaluamos los efectos de la castración (CX) y del reemplazo hormonal (T y/o E2) sobre la actividad desyodativa. Como era de esperarse, la castración se acompañó de una disminución significativa de los niveles circulantes de E2 y T (gráfica 17), así como del peso del epidídimo (gráfica 18). En contraste, el reemplazo con estas hormonas aumentó significativamente sus niveles circulantes en los animales castrados, pero únicamente el reemplazo con T recuperó el peso.

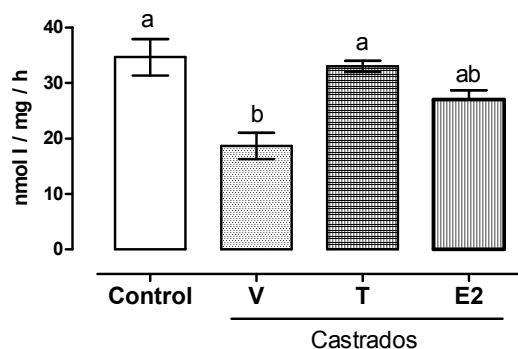


**GRAFICA 17. Efectos de la castración y del reemplazo hormonal sobre los niveles circulantes.** n = 5 /grupo. Letras diferentes representan diferencias significativas (p<0.05, Tukey). V, vehículo; T, testosterona; E2, estradiol.



**GRAFICA 18. Efectos de la castración y del reemplazo hormonal sobre el peso del epidídimo.** n = 5. Letras diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ , Tukey). V, vehículo; T, testosterona; E2, estradiol.

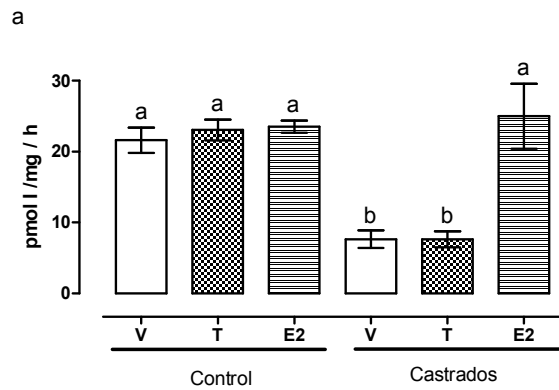
El hígado es un tejido que fue utilizado como control positivo, debido a que su actividad D1 es modulada positivamente por T. Como era de esperarse, los resultados mostraron una disminución de la actividad post-castración, la cual fue recuperada con la administración de T (gráfica 18).



**Gráfica 19. Efecto de la castración y del reemplazo hormonal sobre la actividad D1 hepática.** Condiciones de ensayo: 50  $\mu\text{g}$  de proteína. Se utilizó una solución isotópica de 1.0 nM  $^{125}\text{I}$ -rT3 y el resto de rT3 no marcada (0.5  $\mu\text{M}$ ). pH 7.5 Incubación: 1 h a 37°C. Cada barra representa la  $\bar{X} \pm \text{e.e}$  n = 5. Letras diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ , Tukey). V, vehículo; T, testosterona; E2, estradiol.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que la castración disminuyó significativamente la actividad D1 del epidídimo. Sin embargo, a diferencia del hígado, el reemplazo con T no tuvo ningún efecto sobre dicha enzima. En

contraste, el reemplazo con E2, retornó la actividad a niveles semejantes a los del grupo control (gráfica 19).



**GRAFICA 20. Efectos de la castración y del reemplazo hormonal sobre la actividad D1 del epidídimo.** Las condiciones del ensayo fueron las siguientes: 100  $\mu$ g de proteína y una solución isotópica de 1.0 nM  $^{125}$ I-rT3 y el resto de hormona no marcada (0.2  $\mu$ M). PH 7.5. Incubación: 1.5 h a 37°C. n = 5. Cada barra representa la  $X \pm$  e.e. Letras diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ , Tukey).

## DISCUSIÓN

En este estudio caracterizamos por primera vez la actividad de la desyodasa tipo 1 (D1) en el epidídimo de rata. Mostramos la presencia de esta enzima a lo largo de la ontogenia, alcanzando la máxima actividad durante el período peripuberal y disminuyendo significativamente durante el envejecimiento. En los animales adultos la mayor actividad D1 se encontró en la región de la cabeza, y nuestros resultados sugieren una posible modulación positiva por E2.

### Caracterización del subtipo enzimático

Hasta el momento las desyodasas no han sido purificadas, por lo tanto, la mayoría de los estudios se han realizado a partir de fracciones microsomales y extractos semicrudos. Algunos de los parámetros bioquímicos que permiten discriminar entre los diferentes subtipos enzimáticos incluyen la afinidad por el sustrato, la sensibilidad a inhibidores específicos y las constantes cinéticas, son. La afinidad 8 veces mayor de la desyodasa por rT3 que por T4, la alta susceptibilidad a inhibirse por PTU (0.2 mM) y los bajos requerimientos del cofactor (DTT, 2.5 mM), sugirieron inicialmente que la actividad desyodativa exhibía características típicas de una enzima D1 (Köhrle, 1999). La cinética tipo ping-pong (líneas paralelas) y el valor de Km para el sustrato (0.1  $\mu$ M), corroboraron dicha sospecha. Con las reservas del caso, nuestros resultados sugieren que el epidídimo presenta una eficiencia catalítica entre 35 y 50 veces menor a la del hígado y el riñón (Sabatino *et al.*, 2000); y entre 5 y 20 veces mayor respecto a la glándula sublingual y el tejido mamario lactante (Tanaka *et al.*, 1993, Aceves *et al.*, 1995).

A diferencia de otros tejidos con actividad D1 en mamíferos, en el epidídimo la máxima actividad se encontró en un intervalo de temperatura de entre 30° y 37°C. Efectivamente, en el hígado, el riñón y glándula tiroides, la actividad D1 opera en un intervalo de temperatura cercano a los 37°C (Sabatino *et al.*, 2000).

Es probable que esta característica esté relacionada con el hecho de que el epidídimo funciona en un intervalo de temperatura de 3 a 5 °C menor a la temperatura corporal (Cooper, 1999).

### **Modulación por hormonas sexuales**

Los hallazgos de este estudio confirman y amplían estudios previos, sobre la modulación de la actividad D1 por hormonas sexuales. El interés del estudio surgió de la noción de que el epidídimo recibe altas concentraciones de T y E2 provenientes del testículo (Hess *et al.*, 1997). Mas aún, la T puede ser convertida localmente a su forma más potente, la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT), por medio de la 5- $\alpha$ -reductasa tipo 1 y 2 (Henderson *et al.*, 2004). Nuestros datos sugieren que la falta de respuesta de la D1 al finasteride podría deberse a que la DHT no participa en la modulación de esta enzima. Estrictamente, estos resultados no son concluyentes, debido a que el finasteride inhibe selectivamente a la 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2, pero no a la tipo 1 (Occhiato *et al.*, 2004). Por lo tanto, y dado que el epidídimo expresa ambas isoenzimas, el bloqueo de la conversión de T a DHT debió ser parcial (Henderson *et al.*, 2004). Sin embargo, el hallazgo de que el reemplazo con T a los animales castrados no revitió la actividad D1 a valores basales, sustenta la noción de que los andrógenos no participan en dicha modulación. Aunque en este estudio no medimos los niveles intracelulares de estos esteroides, descartamos que el nulo efecto de T pudiera deberse a un efecto de dosis, pues existen evidencias de que en los animales tratados con finasteride, las concentraciones tisulares de T aumentan hasta tres veces (George 1997), y aún así en este estudio no observamos efectos. La T y la DHT actúan por medio de su interacción con el receptor de andrógenos, siendo la afinidad o potencia de la DHT mayor con respecto a la de T (Wilson y French, 1976). Estos resultados contrastan con el bien conocido efecto estimulador de T sobre la actividad D1 hepática, indicando una modulación órgano-específica (Miyashita *et al.*, 1995; Lisbôa *et al.*, 2001). Sorprendentemente, el reemplazo con E2 no tuvo ningún efecto en animales intactos, pero aumentó la actividad D1 en los castrados.

Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio sugieren que la T inhibe el efecto estimulador del E2 sobre la actividad D1 prostática (Anguiano *et al.*, 2004). Proponemos que el balance T/E2 podría jugar un papel importante en la modulación de dicha enzima, no podemos descartar la posibilidad de que algún otro factor testicular inhiba la respuesta a E2. En este estudio el reemplazo con E2 no tuvo ningún efecto sobre la actividad D1 hepática, si bien se ha reportado previamente un efecto estimulador en la hipófisis y en el hígado de ratas hembras (Lisbôa *et al.*, 2001). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el E2 modula la actividad D1 de manera órgano y género-específica. Nuestros resultados no permiten discernir si el efecto del E2 sobre la actividad D1 es generalizado o si se restringe a un segmento del epidídimo. Sin embargo, es probable que el E2 actúe sobre la actividad D1 de la cabeza, ya que esta región expresa la mayor actividad enzimática y contiene la mayor concentración de receptores a estrógenos (Hess *et al.*, 1997). En esta región del epidídimo, la función del E2 está relacionada con la reabsorción del fluido testicular (Hess *et al.*, 1997). Aunque desconocemos los mecanismos, proponemos que la T y el E2 modulan la actividad D1 de manera indirecta, ya que en el gen que codifica a esta enzima no se ha mostrado la presencia de elementos responsivos a estrógenos o andrógenos.

### **Posibles implicaciones funcionales de la producción de T3**

Existen evidencias de que el epidídimo de ratas adultas expresa receptores a T3 y que este tejido se atrofia en respuesta al hipotiroidismo (Del Río *et al.*, 2000; 2001). Sin embargo, se desconoce el posible significado funcional de la D1 en etapas tempranas del desarrollo. La presencia de actividad D1 a partir de la primera semana post-natal, sugiere que la T3 producida localmente podría estar asociada a la formación de la barrera hemato-epididimaria (Agarwal y Hoffer, 1989). A este respecto se ha documentado que el hipotiroidismo neonatal disminuye los niveles de una proteína (conexina 43), asociada a la formación de uniones comunicantes (St-Pierre *et al.*, 2003). Además la presencia de D1 en etapas posteriores, sugiere su participación en la proliferación, diferenciación



celular (3<sup>a</sup> - 6<sup>a</sup>. semana) y crecimiento (7-12 semanas). En otros tejidos, la actividad D1 se ha asociado con la maduración del pulmón, (Ruiz de Ona *et al.*, 1991), del intestino (Bates *et al.*, 1999) y de la glándula mamaria lactante (Aceves *et al.*, 1995). En contraste, la actividad D 2 está relacionada con la maduración del sistema nervioso central (Bianco *et al.*, 2002) y del testículo (Wagner *et al.*, 2003).

Nuestros resultados descartan la presencia de D1 en los espermatozoides, pero sugerimos que la T3 participa de manera indirecta en su proceso de maduración. Está bien establecido que la maduración de los espermatozoides ocurre en la región próxima al testículo (cabeza-cuerpo) (Cooper, 1999), y es precisamente en este sitio en donde se expresa la mayor actividad D1 y consecuentemente donde mayor producción de T3 ocurre. Una de las funciones con las que la D1 podría estar asociada es con la reabsorción de líquidos y el transporte de iones (Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, H<sup>+</sup>), lo cual contribuye a formar el ambiente luminal necesario para la maduración, transporte y almacenamiento de los espermatozoides. Ya se mencionó previamente que estos procesos se llevan a cabo primordialmente en la cabeza del epidídimo (prolongación de los conductos eferentes) y que dependen, entre otros factores, de la presencia de E2 (Hess *et al.*, 1997). Además, las similitudes estructurales y funcionales que el epitelio del epidídimo comparte con el epitelio renal e intestinal, son congruentes con la presencia de D1 en estos tejidos (Hinton & Turner 1988; Leonard *et al.*, 1991; Sabatino *et al.*, 2000).

Por otra parte, es bien conocido que el epidídimo presenta un gradiente descendente de temperatura que va de los 35° a los 32°C, en una dirección cabeza-cola (Cooper, 1999). La temperatura de la cabeza se asemeja a la del testículo y es 2°C menor a la temperatura corporal. Existen evidencias de que un aumento de temperatura se acompaña de alteraciones en la espermatogénesis (testículo) y en la sobrevivencia de los espermatozoides (epidídimo). La región caudal del epidídimo es el sitio en donde se lleva a cabo el almacenamiento de los espermatozoides (Cooper, 1999) y un incremento de temperatura aumenta el

estrés oxidativo (daño al DNA) e induce apoptosis (Jara *et al.*, 2002; Banks *et al.*, 2005). Se ha propuesto que en estas estructuras, la regulación local de temperatura se controla mediante un sistema vascular de contracorriente (Einer-Jensen y Hunter, 2005). Sin embargo, es posible proponer que la baja actividad D1 observada en la región caudal podría asociarse a una menor producción de T3 y consecuentemente a un menor metabolismo y temperatura.

Además, y debido a la naturaleza exócrina del epidídimo, existe la posibilidad de que este tejido secrete la T3 producida al lumen, y esta sea posteriormente transportada a la uretra como parte del plasma seminal. Aunque se desconoce su procedencia, existen estudios que muestran actividad D2 en el semen de cerdos (Brzezinska- Slebodzinska *et al.*, 2000). Mas aún, estudios preliminares de nuestro laboratorio sugieren la presencia de actividad D1 (sensible a PTU) en el semen de ratas. En el semen se ha reportado la existencia de unas estructuras membranales denominadas epididimosomas, cuyo contenido incluye enzimas con actividad catalítica (Gatti *et al.*, 2004), sugiriendo un posible mecanismo por medio del cual la D1 es secretada al semen. Se ha reportado la presencia de actividad D1 en otro tipo de secreciones como la leche (Lisboa *et al.*, 2003).

## CONCLUSIONES

1. Los parámetros bioquímicos encontrados para la actividad desyodativa en el epidídimo de rata corresponden a la D1.
2. La actividad D1 está presente prácticamente en todos los periodos de la ontogenia, disminuyendo significativamente en los animales seniles.
3. En los animales sexualmente maduros, la enzima presenta un patrón de expresión segmento-específico, siendo mayor en la región de la cabeza y disminuyendo gradualmente hacia la cola.
4. La regulación de la actividad D1 por hormonas sexuales es órgano-específica. A diferencia del hígado, cuya actividad desyodativa es dependiente de testosterona, la del epidídimo es dependiente de E2.
5. Los espermatozoides no presentan actividad D1.

Nuestros resultados sugieren que la actividad D1 pudiera estar asociada con la diferenciación y funcionalidad del epidídimo. Proponemos una posible participación de la T3 producida en la región próxima al testículo (cabeza), en el proceso de maduración de los espermatozoides.

## BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Aceves C, Rondón F, Ramírez C, Wilson S, Pineda C, López B, Mancillar R & Valverde RC (1995). Mammary 5' deiodinase (5'D) during the breeding cycle of the rat: indirect evidence that 5'D type is specific to the alveolar epithelium. *Endocrinology*; **3**: 95-99.
- ❖ Agarwal A, Hoffer AP (1989). Ultrastructural studies on the development of the blood-epididymis barrier in immature rats. *J Androl*; **10** :425-431.
- ❖ Anderson G, Mariash C & Oppenheimer J (2000) Molecular actions of thyroid hormone. En the Thyroid. A fundamental and clinical text. Braverman, Lewis & Utiger, Robert. Lippincott Williams & Wilkins, octava edición.
- ❖ Anguiano B, Quintanar A, Luna M, Navarro L, Ramírez del Ángel A, Pacheco P & Valverde C (1995). Neuroendocrine regulation of adrenal gland and hypothalamus 5'deiodinase activity. II. Effects of splanchnicotomy and hypophysectomy. *Endocrinology*; **136**: 3346-3352.
- ❖ Anguiano B, López-Juárez A, Romero V, Delgado G y Aceves C. Type I deiodinase activity (D1) in prostate gland. Modulation by sex hormones. 76<sup>th</sup> *Annual Meeting of the American Thyroid Association*. Vancouver, Canadá. Octubre 2004.
- ❖ Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT (2005). Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction*; **129** :505-514.
- ❖ Bates JM, St Germain DL, Galton VA. (1999). Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. *Endocrinology*; **140**: 844-851.
- ❖ Bianco A, Salvatore D, Gereben B, Berry M & Larsen P (2002). Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeionidases. *Endocr Rev*; **23**: 38-89.

- ❖ Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; **72**: 248-254.
- ❖ Brzezinska-Slebodzinska E, Slebodzinski AB, & Kowalska K (2000). Evidence for the presence of 5'-deiodinase in mammalian seminal plasma and for the increase in enzyme activity in the prepubertal testis. *Int J Androl.*; **23**: 218-24.
- ❖ Chopra, I (1996). Nature, source and relative significance of circulating thyroid hormones. Capítulo 7: *The Thyroid, a fundamental and clinical text.*, EUA. Págs. 111-124.
- ❖ Cooke PS, Holsberger DR, Witorsch RJ, Silvestre PW, Meredith JM, Treien KA & Chapin RE (2004). Thyroid hormone, glucocorticoids, and prolactin at the nexus of physiology, reproduction, and toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol* **194**: 309-335.
- ❖ Cooper (1999). Epididymis. *Encyclopedia of Reproduction*. Volumen 2. Editado por Ernst Knobil & Jimmy D. Neill, Academic Press, EUA. Págs. 1-17.
- ❖ Dacheux J, Gatti JL & Dacheux F (2003). Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech.*; **61**:7-17.
- ❖ Del Río AG, Palaoro LA, & Blanco AM (2001). Epididymal scanning in electron microscopy study in hypothyroid rats. *Arch Andro*; **46**: 73-77.
- ❖ Del Rio AG, Blanco AM, Niepomniszcz H, Burgos M & Fornes WN (2000). Changes in the epididymal ultrastructure in hypothyroid rats. *Arch Androl.*; **43**: 197-201.
- ❖ Einer-Jensen N, Hunter R (2005). Counter-current transfer in reproductive biology. *Reproduction*; **129**:9-18.
- ❖ Gatti, J-L, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Métayer S, Thimon V & Dacheux J-L (2004). Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sc*; **82-83**; 321-339.
- ❖ George F (1997). Androgen metabolism in the prostate of the finasteride-treated, adult rat: a possible explanation for the differential action of

testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone during development of the male urogenital tract. *Endocrinology*; **138**: 871-877.

- ❖ Henderson N A, Cooke G M & Robaire B (2004). Effects of PNU157706, a dual 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, on gene expression in the rat epididymis. *J Endocrinol*; **181**: 245-261.
- ❖ Herrera D. MR, Luna MM, Romero RC (1993). Obtención de anticuerpos contra progesterona y estradiol, estandarización del radioinmunoanálisis y validación en suero de rumiantes. *Vet Met*; **24**: 223-229.
- ❖ Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS & Lubahn DB (1997). A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature*, 4;390: 509-512.
- ❖ Hughes IA (2001). Sex differentiation. *Endocrinology*; **142**: 3281-3287.
- ❖ Hulbert AJ (2000). Thyroid hormones and their effects: a new perspective. *Biol Rev Camb Philos Soc*; **75**: 519-631.
- ❖ Jansen J, Friesema E, Milici C, & Visser T (2005). Thyroid hormone transporters in health and disease. *Thyroid*; **15**:757-768.
- ❖ Jara M, Esponda P & Carballada R (2002). Abdominal temperature induces region-specific p53-independent apoptosis in the cauda epididymidis of the mouse. *Biol Reprod.*; **67**: 1189-1196.
- ❖ Jones R (1998). Evolution of the vertebrate epididymis. *J Reprod Fert Supplement*; **53**: 163-181.
- ❖ Köhrle J (1999). Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Moll Cell Endocrinol*; **151**: 103-19.
- ❖ Köhrle J (2000). The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell Mol Life Sci*; **57**: 1853-63.
- ❖ Köhrle J (2002). Iodothyronine deiodinases. *Methods Enzymol*; **347**:125-67.
- ❖ Leonard JL, Ekenbarger DM, Frank SJ, Farwell AP & Koehrle J (1991). Localization of type I iodothyronine 5'-deiodinase to the basolateral plasma membrane in renal cortical epithelial cells. *J Biol Chem.*; **266**: 11262-69.

- ❖ Lisboa P.C., Curty F. H., Moreira, R. M., Oliveira K. J. & Pazos-Moura C.C (2001). Sex steroids modulate rat anterior pituitary and liver iodothyronine deiodinase activities. *Horm Metab Res*; **33**: 532-535.
- ❖ Lisboa PC, Passos MC, Dutra SC, Santos RS, Bonomo IT, Cabanelas AP, Pazos-Moura CC, Moura EG (2003). Increased 5'-iodothyronine deiodinase activity is a maternal adaptive mechanism in response to protein restriction during lactation. *J Endocrinol*; **177**: 261-267.
- ❖ Miyashita K, Murakami M, Iriuchijima T, Takeuchi T & Mori M. (1995). Regulation of rat liver type 1 iodothyronine deiodinase mRNA levels by testosterone. *Mol Cell Endocrinol*; **115**: 161-167.
- ❖ Munira M, Baqui A, Gereben B, Harney JW, Larsen PR, & Bianco AC (2000). Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology*, **141**: 4309-4312.
- ❖ Nixon B, Jones RC, Hansen LA & Holland MK (2002). Rabbit epididymal secretory proteins. I. Characterization and hormonal regulation. *Biol Reprod.*; **67**:133-139.
- ❖ Norris, David (1980). The Molecular Bases for Chemical Regulation. Capítulo 2: *Vertebrate Endocrinology*. Academic Press, tercera edición. EUA. Pág. 73-76.
- ❖ O'Donnell L, Robertson KM, Jones M & Simpson E (2001). Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev.*; **22(3)**: 289-318.
- ❖ Occhiato EG, Guarna A, Danza G, Serio M. (2004). Selective non-steroidal inhibitors of 5 alpha-reductase type 1. *J Steroid Biochem Mol Biol.*; **88**: 1-16.
- ❖ Pujol A & Bayard F (1979). Androgen receptors in the rat epididymis and their hormonal control. *J Reprod Fertil.*; **56**: 217-222.
- ❖ Robaire B & Viger RS (1995). Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod.*, **52**: 226-236.
- ❖ Robbins J (2000) Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. En the Thyroid. A fundamental and clinical text. Braverman, Lewis & Utiger, Robert. Lippincott Williams & Wilkins, octava edición.

- ❖ Ruiz de Ona C, Morreale de Escobar G, Calvo R, Escobar del Rey F & Obregón MJ (1991). Thyroid hormones and 5'-deiodinase in the rat fetus late in gestation: effects of maternal hypothyroidism. *Endocrinology*; **128**: 422-432.
- ❖ Sabatino L, Iervasi G, Ferrazzi P, Francesconi D & Chopra I (2000). A study of iodothyronine 5'-monodeiodinase activities in normal and pathological tissues in man and their comparison with activities in rat tissues. *Life Sci.*; **68**; 191-202.
- ❖ Steers WD (2001) 5 alpha-reductase activity in the prostate. *Urology*; **58**: 17-24.
- ❖ St-Pierre N, Dufresne J, Rooney AA, Cyr DG (2003). Neonatal hypothyroidism alters the localization of gap junctional protein connexin 43 in the testis and messenger RNA levels in the epididymis of the rat. *Biol Reprod.*; **68**:1232.
- ❖ Tanaka K, & Imura H (1993). Iodothyronine 5'-deiodinase is present in mouse sublingual gland. *Endocrinology*; **132**: 1195-1198.
- ❖ Taurog A (2000) Hormone synthesis: thyroid iodine metabolism. En the Thyroid. A fundamental and clinical text. Braverman, Lewis & Utiger, Robert. Lippincott Williams & Wilkins, octava edición.
- ❖ Tulsiani DR (2003). Glycan modifying enzymes in luminal fluid of rat epididymis: are they involved in altering sperm surface glycoproteins during maturation?. *Microsc Res Tech.*; **61**: 18-27.
- ❖ Wagner MS, Morimoto R, Dora JM, Benneman A, Pavan R & Maia AL (2003). Hypothyroidism induces type 2 iodothyronine deiodinase expression in mouse heart and testis. *J Mol Endocrinol.*; **31**: 541-550.
- ❖ Wilson E & French F (1976). Binding properties of androgen receptors. *J Biol Chem.*; **251**: 5620-5629.
- ❖ Wiszniewska B (1998). Steroidogenesis in epithelial cells of rat epididymis. *Ann Acad Med Stetin.*; **40**:1-66.



- ❖ Yoshinaga K & Toshimori K (2003). Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. *Microsc Res Tech.*; **61**: 39-45.

## ANEXO

### Método de Bradford

En estudios bioquímicos, a menudo resulta necesario tener una estimación del contenido proteico total de una muestra. Uno de los métodos más sencillos para obtener esta estimación es el método de Bradford. El fundamento del método se basa en el cambio de color que ocurre cuando el reactivo azul brillante de Coomassie se une a los residuos de arginina en un medio ácido. En ausencia de proteínas el reactivo presenta una tonalidad café, y cambia a tonalidades azules dependiendo de la concentración de proteínas. La absorbancia se determina a una longitud de onda  $\lambda = 595 \text{ nm}$  con un espectrofotómetro (Beckman DU C40).

En la tabla se muestra el protocolo que se utilizó para la cuantificación de proteínas en los extractos de epidídimo. Se utilizaron  $5.0 \mu\text{l}$  de la muestra problema y albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. La curva se construyó en un intervalo de 5 a  $80 \mu\text{g}$  de proteína. A cada uno de los tubos se le adicionó 3 ml de reactivo de Bradford (dilución 1:5) previamente filtrado (papel whatman número 41).

	Proteína ( $\mu\text{g}$ )	Estándar ( $\mu\text{l}$ )	Problema ( $\mu\text{l}$ )	H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{l}$ )	Bradford (ml)
Curva estándar	0	0	0	100	3
	5	5	0	95	3
	10	10	0	90	3
	20	20	0	80	3
	40	40	0	60	3
	60	60	0	40	3
	80	80	0	20	3
	problema	0	5	95	3

## Técnica de liberación de radioyodo

La técnica tiene su fundamento en el hecho de que las desyodasas tipo 1 y 2 remueven los átomos de yodo del anillo externo de las HT. En nuestro estudio utilizamos  $^{125}\text{I-rT3}$  como sustrato, y el yodo radioactivo liberado por producto de la acción enzimática fue medido con un contador de emisiones gamma (Packard 5002).

## Procedimiento

Todos los ensayos se realizaron por duplicado y con un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ .

1. La mezcla radioactiva contiene tanto al sustrato marcado ( $^{125}\text{I-rT3}$ ), como al cofactor (DTT, 5 mM). Ambos se diluyen en amortiguador HEPES (pH 7.5) adicionado con sacarosa (0.32 M) y EDTA (1 mM).
2. El homogeneizado se diluye en amortiguador HEPES (pH 7.5) a una concentración aproximada 50-100  $\mu\text{g}$  / 50  $\mu\text{l}$ .
3. El tiempo de incubación es de 1.5 horas a 37°C.
4. La reacción se detiene agregando una solución de suero normal bovino (50%) y PTU (1.0 mM). Posteriormente se adiciona ácido tricloroacético (TCA, 10%) para precipitar proteínas.
5. Las muestras problemas y el daño\* se centrifugan a 12,000 rpm durante 4 minutos. El sobrenadante es filtrado a través de columnas de intercambio catiónico (Dowex W-50X2), previamente equilibradas con ácido acético al 10%. La muestra se eluye con 2 ml de ácido acético (10%); el eluido es colectado en tubos de ensaye y la radiación emitida es cuantificada en el contador de emisiones gamma.

\* El daño se define como la cantidad de yodo radioactivo liberado de manera inespecífica, y no como producto de la acción enzimática.

6. El resultado proporcionado por el contador está dado en cuentas por minuto (CPM) y a partir de estas se calcula el cociente de desyodación:

$$CD = \frac{cpm_{muestra} - cpm_{daño}}{cpm_{totales}}$$

7. Posteriormente se calcula la actividad específica de la enzima ( $V$ ), y se reporta como fmol ó pmol  $^{125}\text{I}$  liberado/ mg proteína/ tiempo de incubación:

$$V = \frac{CD \times CH \times 1.25 \times 2}{CP \times t}$$

Donde:  $CD$  es el cociente de desyodación obtenido del ensayo enzimático,  $CH$  es la cantidad de sustrato ( $^{125}\text{I}$ -rT3) utilizado en el ensayo expresado en fmol ó pmol,  $CP$  es la cantidad de proteína presente en el ensayo y  $t$  es el tiempo de incubación. Además, es necesario multiplicar por 1.25 para corregir el 20% de yodo radioactivo que se pierde debido al 80% de eficiencia de las columnas, y por 2 para tomar en cuenta la posibilidad de desyodar la posición 3' o 5' del anillo fenilo.